



Uema
UNIVERSIDADE ESTADUAL
DO MARANHÃO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
TESE DE DOUTORADO

CARLOS ALAILSON LICAR RODRIGUES

BIOMARCADORES EM POPULAÇÕES DE *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1766) (TESTUDINES: KINOSTERNIDAE) COMO INDICADORES DE IMPACTO AMBIENTAL EM UMA ÁREA PROTEGIDA NA AMAZÔNIA MARANHENSE, SÍTIO RAMSAR BRASILEIRO

São Luís

2023

CARLOS ALAILSON LICAR RODRIGUES

BIOMARCADORES EM POPULAÇÕES DE *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1766) (TESTUDINES: KINOSTERNIDAE) COMO INDICADORES DE IMPACTO AMBIENTAL EM UMA ÁREA PROTEGIDA NA AMAZÔNIA MARANHENSE, SÍTIO RAMSAR BRASILEIRO

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal (PPGCA/UEMA), como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Alana Lislea de Sousa.

Coorientadora: Profa. Dra. Raimunda Fortes de Carvalho-Neta.

São Luís

2023

Rodrigues, Carlos Alailson Licar.

Biomarcadores em populações de *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1766) (Testudines: Kinosternidae) como indicadores de impacto ambiental em uma área protegida na Amazônia maranhense, Sítio Ramsar Brasileiro / Carlos Alailson Licar Rodrigues. – São Luís, 2023.

159 f

Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual do Maranhão, 2023.

Orientadora: Profa. Dra. Alana Lislea de Sousa.

1. Enzimas. 2. Micronúcleo. 3. Maranhão. 4. Tartaruga-do-lodo. I.Título.

CDU: 504.3(812.1)

CARLOS ALAILSON LICAR RODRIGUES

BIOMARCADORES EM POPULAÇÕES DE *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1766) (TESTUDINES: KINOSTERNIDAE) COMO INDICADORES DE IMPACTO AMBIENTAL EM UMA ÁREA PROTEGIDA NA AMAZÔNIA MARANHENSE, SÍTIO RAMSAR BRASILEIRO

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **ALANA LISLEA DE SOUSA**
Data: 27/01/2024 20:38:09-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Alana Lislea de Sousa
Universidade Estadual do Maranhão - UEMA
(Orientadora)

Documento assinado digitalmente
 **DEBORA BATISTA PINHEIRO SOUSA**
Data: 27/01/2024 21:08:17-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Débora Batista Pinheiro Sousa
Universidade Federal do Maranhão - UFMA,
Campus Balsas
(1ª Examinadora)

Documento assinado digitalmente
 **RAIMUNDA NONATA FORTES CARVALHO NETA**
Data: 28/01/2024 13:34:01-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Raimunda Nonata Fortes de Carvalho-Neta
Universidade Estadual do Maranhão-UEMA
(2ª Examinadora)

Documento assinado digitalmente
 **ALCINA VIEIRA DE CARVALHO NETA**
Data: 28/01/2024 17:56:47-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Alcina Vieira de Carvalho-Neta
Universidade Estadual do Maranhão-UEMA
(3ª Examinadora)

Documento assinado digitalmente
 **DIEGO CARVALHO VIANA**
Data: 28/01/2024 21:08:05-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Diego Carvalho Viana
Universidade Estadual da Região Tocantina do
Maranhão - UEMASUL
(4º Examinador)

Os nossos sonhos fazem-nos sorrir, mas lutar e
conquistá-los, fazem-nos chorar de alegria.

(Autor desconhecido)

Dedico este trabalho a Deus e família, especialmente aos meus pais Gracilene Licar Rodrigues e Antônio Mendes Rodrigues (*in memoriam*) e irmãos.

AGRADECIMENTOS

- A Deus, ser supremo e criador de todo o universo;
- Aos familiares, especialmente minha mãe Gracilene Licar Rodrigues e irmãos Dayana Licar e Dennys Licar pelo suporte emocional, apoio e acompanhamentos durante os meus estudos pós-graduados;
- A Valdenê Buzar, Júlio Buzar, Juliana Buzar, Nathalia Buzar, Júlia Buzar e Rita Buzar que muito contribuíram por estar aqui e por sempre acreditarem em mim, concedendo todo apoio necessário.
- Aos amigos que estiveram comigo em todos os momentos, permitindo a continuação dessa jornada, estimulando-me a não desistir. Gratidão!
- Aos amigos da pós-graduação que, juntos, adquirimos forças e persistência na busca por bons resultados e pela finalização deste doutorado;
- Aos colegas do Grupo de Estudos em Anatomia (GRANATO) pelo acompanhamento e compartilhamento de conhecimentos nas reuniões e conversas diárias no laboratório. Especialmente à Almerinda Medeiros, Elizângela Pereira, Danielle Isis e Karol Calixto pela amizade e suporte nas viagens à Baixada Maranhense;
- Aos colegas do Grupo de Pesquisa em Ecotoxicologia e Monitoramento de Ambientes Aquáticos (GPEMAAq) pelo acolhimento e acompanhamento durante os experimentos, especialmente ao Luan, Gerson Protázio, Wanda Batista, Suelen Sampaio, Katherine Noleto, Débora Batista e aos demais que ajudaram direta e indiretamente;
- À orientadora Profa. Alana Lislea de Sousa e coorientadora Profa. Raimunda N. F. Carvalho-Neta pelo suporte científico e acompanhamentos nas pesquisas, pela confiança, carinho e amizade;
- Ao Prof. Danilo Lopes da UFMA e o Engenheiro Paulo Menezes pelo apoio nas expedições de campo;
- Aos pescadores de Pinheiro, São Bento, São João Batista e Viana que nos ajudaram sem medir esforços durante as coletas, especialmente ao Senhor João, Carlinhos, “Bitinho”, Raimundinho, Fernando e suas famílias pelo suporte e carinho em nos receber muito bem durante as viagens de coleta;
- À UEMA pelo suporte nas pesquisas e formação acadêmica e;
- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo suporte financeiro por meio de recursos PROAP/CAPES (Finanças Código 001).

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivo geral.....	14
2.2 Objetivos específicos.....	14
<u>CAPÍTULO 1</u>	
INTRODUÇÃO.....	16
O uso de quelônios em estudos de biomonitoramento.....	19
Biomarcadores bioquímicos e mutagênicos: alterações na atividade da	
Glutathione S-Transferase, Catalase e Teste do Micronúcleo.....	22
Glutathione S-Transferase (GST).....	23
Catalase (CAT).....	24
Teste de micronúcleo.....	25
CONCLUSÃO.....	26
REFERÊNCIAS.....	27
<u>CAPÍTULO 2</u>	
1. Introdução.....	35
2. Material e métodos.....	38
2.1. Área de estudo.....	38
2.2. Caracterização do criadouro e manejo dos animais.....	40
2.3. Captura dos animais e obtenção de amostra biológica <i>in situ</i>	40
2.4. Parâmetros ambientais da água e solo.....	42
2.5. Análise das enzimas Catalase e da Glutathione S-Transferase.....	42
2.6. Análise estatística.....	43
3. Resultados.....	44
3.1. Biometria dos animais.....	44
3.2. Parâmetros ambientais da água e solo.....	46
3.3. Parâmetros biológicos e atividade enzimática.....	49
4. Discussão.....	51
5. Agradecimentos.....	61
Referências.....	61
<u>CAPÍTULO 3</u>	
1. Introdução.....	76
2. Material e Métodos.....	77

2.1. Área de estudo.....	77
2.2. Parâmetros ambientais de água e solo.....	79
2.3. Teste de micronúcleos e anormalidades nucleares eritrocitárias em <i>K. scorpioides</i>	80
2.4. Análise de dados.....	81
3. Resultados.....	81
3.1. Parâmetros ambientais de água e solo da Baixada Maranhense.....	81
3.2. Micronúcleos e anormalidades nucleares nos eritrócitos de <i>K.</i> <i>scorpioides</i>	84
4. Discussão.....	89
5. Conclusão.....	97
6. Agradecimentos.....	98
Referências.....	98
Anexos.....	108

RESUMO

Os biomarcadores são necessários em estudos de biomonitoramento para detectar respostas biológicas a partir da análise dos níveis de exposição de espécies aquáticas a poluentes em seu ambiente natural. O objetivo do estudo foi analisar respostas bioquímicas e mutagênicas em *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1766) como indicadores da qualidade ambiental de uma Área de Proteção Ambiental localizada na Amazônia Oriental do Maranhão. Examinamos alterações nas enzimas Glutathione S-Transferase (GST) e Catalase (CAT), bem como análises citológicas de esfregaços sanguíneos de espécimes de *K. scorpioides* coletados em uma região urbanizada (A1) e vegetada (A2) em uma área protegida na Amazônia maranhense, além do criadouro científico (A3). Encontramos correlações lineares positivas entre as atividades de GST e CAT e a biometria. A concentração da GST foi maior em indivíduos de criadouro do que aqueles *in situ*, não observando diferenças estatísticas entre as atividades das enzimas de animais das áreas A1 e A2. Ao contrário do sexo, o ambiente e o período sazonal afetaram simultaneamente as atividades das enzimas. Em relação às reações mutagênicas, registramos anormalidades nucleares como micronúcleos (n=91), eritrócitos binucleados (n=14), núcleos entalhados (n=81), lobulados (n=35), segmentados (n=16) e deslocados (n=253). Os animais de criadouro não apresentaram anomalia nuclear. A média e desvio padrão ($1,13 \pm 0,47$) de micronúcleos foram diferentes de outras espécies de quelônios de ambiente natural. Núcleos deslocados e binucleados obtiveram maior frequência (51,63%) e menor frequência (2,85%), respectivamente. Os núcleos lobulados mostraram diferenças significativas entre os ambientes ($p=0,02839$), enquanto os segmentados ($p=0,02949$) e deslocados ($p=0,0008336$) mostraram diferenças significativas nos períodos de estiagem e chuvoso. A quantidade de micronúcleos encontrada em *K. scorpioides* não foi significativa. Nosso estudo forneceu dados pioneiros sobre as respostas bioquímicas e mutagênicas de uma espécie de tartaruga amazônica, mostrando que as respostas enzimáticas e anomalias nucleares mudam conforme o tipo de ambiente e estação climática, indicando como a manutenção de áreas protegidas é vital para a conservação das tartarugas de água doce na Amazônia.

Palavras-chave: enzimas, micronúcleo, Maranhão, tartaruga-do-lodo.

ABSTRACT

Biomarkers are necessary in biomonitoring studies to detect biological responses based on the analysis of exposure levels of aquatic species to pollutants in their natural environment. The objective of the study was to analyze biochemical and mutagenic responses in *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1766) as indicators of environmental quality in an Environmental Protection Area located in the Eastern Amazon of Maranhão. We examined changes in the enzymes Glutathione S-Transferase (GST) and Catalase (CAT), as well as cytological analyzes of blood smears from *K. scorpioides* specimens collected in an urbanized (A1) and vegetated (A2) region in a protected area in the Maranhão Amazon, in addition to the scientific breeding site (A3). We found positive linear correlations between GST and CAT activities and biometrics. The GST concentration was higher in breeding individuals than in situ, with no statistical differences being observed between the enzyme activities of animals from areas A1 and A2. Unlike sex, environment and seasonal period simultaneously affected enzyme activities. Regarding mutagenic reactions, we recorded nuclear abnormalities such as micronuclei (n=91), binucleated erythrocytes (n=14), notched (n=81), lobulated (n=35), segmented (n=16) and displaced (n=253). Breeding animals did not present nuclear anomalies. The mean and standard deviation (1.13 ± 0.47) of micronucleus were different from other species of chelonians from the natural environment. Displaced and binucleated nuclei had the highest frequency (51.63%) and lowest frequency (2.85%), respectively. The lobulated nucleus showed significant differences between environments ($p=0.02839$), while the segmented ($p=0.02949$) and displaced ($p=0.0008336$) showed significant differences in the dry and rainy periods. The amount of micronucleus found in *K. scorpioides* was not significant. Our study provided pioneering data on the biochemical and mutagenic responses of an Amazonian turtle species, demonstrating that enzymatic responses and nuclear anomalies change depending on the type of environment and climatic season, indicating how maintaining protected areas is vital for turtle conservation freshwater in the Amazon.

Keywords: enzymes, micronucleus, Maranhão, scorpion mud turtle.

LISTA DE ABREVIATURAS

AN	-	Anormalidade Nuclear
ANEs	-	Anormalidades Nucleares Eritrocitárias
ANOVA	-	Análise de Variância
APA	-	Área de Proteção Ambiental
CAT	-	Catalase
CDNB	-	Cloro-2-4 di-nitrobenzeno
CEEA	-	Comitê de Ética e Experimentação Animal
CONAMA	-	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CTC	-	Capacidade de Troca Catiônica
DNA	-	Ácido Desoxirribonucleico
EROs	-	Espécies Reativas de Oxigênio
GSH	-	Glutathiona Reduzida
GST	-	Glutathiona S-Transferase
IBAMA	-	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente
IBGE	-	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INMET	-	Instituto Nacional de Meteorologia
MANOVA	-	Análise Multivariada da Variância
MMA	-	Ministério do Meio Ambiente
MN	-	Micronúcleo
OMS	-	Organização Mundial de Saúde
PCA	-	Análise de Componentes Principais
PNAP	-	Plano Estratégico Nacional de Áreas Protegidas
SISBIO	-	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
UEMA	-	Universidade Estadual do Maranhão

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Georreferenciamento dos pontos de amostragem na Baixada Maranhense e Criadouro (UEMA), Maranhão, Brasil.....	39
Tabela 2 - Descrição do número amostral (N) dos animais (macho e fêmea) correspondentes aos grupos A1 e A2 na Amazônia maranhense e A3 (criadouro científico) capturados entre os meses de agosto e outubro/2021; abril, junho, outubro e dezembro/2022 e março/2023 nos períodos de estiagem e chuvoso.....	41
Tabela 3 - Estatística sumária das variáveis biométricas (cm) por sexo e ponto de coleta dos espécimes de <i>K. scorpioides</i> amostrados entre os meses de agosto e outubro/2021; abril, junho, outubro e dezembro/2022 e março/2023 nos períodos de estiagem e chuvoso nas áreas A1 e A2 na Baixada Maranhense e A3 (criadouro científico)	45
Tabela 4 - Variáveis físico-químicas da água; concentrações dos elementos químicos, de micronutrientes e granulométricas dos solos correspondentes ao habitat dos exemplares de <i>K. scorpioides</i> na Baixada Maranhense, coletadas nos meses de agosto e outubro/2021; abril, junho, outubro e dezembro/2022 e março/2023 nos períodos de estiagem e chuvoso na Baixada Maranhense (A1 e A2)	47

CAPÍTULO 3

Tabela 1 - Estatística sumária das variáveis físico-químicas da água de diferentes ambientes (A1 e A2) de captura de <i>K. scorpioides</i> na Baixada Maranhense nos meses de agosto e outubro/2021; abril, junho, outubro e dezembro/2022 e março/2023 nos períodos de estiagem e chuvoso na Baixada Maranhense. DP = desvio padrão; pH = potencial hidrogeniônico; OD = oxigênio dissolvido.....	81
Tabela 2 - Concentrações dos elementos químicos e de micronutrientes presentes no solo correspondente aos diferentes ambientes (A1 e A2) de captura de <i>K. scorpioides</i> na Baixada Maranhense nos meses de agosto e outubro/2021; abril, junho, outubro e dezembro/2022 e março/2023 nos períodos de estiagem e chuvoso na Baixada Maranhense.....	82
Tabela 3 - Granulometria do solo correspondente ao habitat dos exemplares amostrados de <i>K. scorpioides</i> , durante as coletas entre os meses de agosto e outubro/2021; abril, junho, outubro e dezembro/2022 e março/2023 nos períodos de estiagem e chuvoso na Baixada Maranhense (A1 e A2)	83
Tabela 4 - Análise quantitativa dos tipos de Anomalias Nucleares Eritrocitárias (ANE's) registradas em amostras de <i>K. scorpioides</i> capturados em A1 e A2 na Baixada Maranhense, Maranhão, Brasil.....	87
Tabela 5 - Estatística sumária das frequências de Micronúcleos e Anormalidades Nucleares Eritrocitárias (ANE's) em machos e fêmeas de <i>K. scorpioides</i> (N = 60) da Baixada Maranhense (A1 e A2), em diferentes períodos (estiagem e chuvoso), nos meses de agosto e outubro/2021; abril, junho, outubro e dezembro/2022 e março/2023.....	88
Tabela 6 - Comparação entre Médias e Desvio Padrão (DP) de micronúcleos encontrados em eritrócitos de <i>K. scorpioides</i> com outras espécies de quelônios em ambientes marinho e dulcícola do Brasil.....	89

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Espécime adulto de <i>Kinosternon scorpioides</i>	17
--	----

CAPÍTULO 2

Fig.1. Mapa das áreas com localização dos pontos de captura dos animais agrupados em A1 = área urbanizada) e A2 = área vegetada dos municípios de Pinheiro, São Bento e São João Batista, na APA da Baixada Maranhense, Maranhão, Brasil e A3 = criadouro científico.....	39
Fig. 2. - Análise de Componentes Principais entre as atividades enzimáticas e biometria para o primeiro e segundo fator (A) e primeiro e terceiro fator (B) em <i>K. scorpioides</i> de ambiente natural e criadouro. Onde: [CAT] = atividade de catalase; [GST] = atividade de Glutathione S-Transferase; CC = comprimento da carapaça; LC = largura da carapaça; CP = comprimento do plastrão; LP = largura do plastrão e Alt = altura.....	49
Fig. 3. Comparações entre as médias de concentração de Glutathione S-Transferase (GST) em espécimes de <i>K. scorpioides</i> em função do tipo de ambiente (A1, A2 e A3)	50
Fig. 4. Comparações entre as médias de atividade enzimática nos espécimes de <i>K. scorpioides</i> em função do período sazonal. A - catalase (CAT) e B - Glutathione S-Transferase (GST).....	50
Fig. 5. Comparações entre as médias de atividade enzimática nos espécimes de <i>K. scorpioides</i> em função do tipo de ambiente e período sazonal por ANOVA fatorial ($p < 0,05$). A - catalase (CAT) e B - Glutathione S-Transferase (GST).....	51

CAPÍTULO 3

Figura 1. Localização dos pontos de captura dos animais agrupados em Área Urbanizada (1, 3 e 7) e Vegetada (2, 4, 5, 6, 8 e 9) em Pinheiro, São Bento e São João Batista na Baixada Maranhense, além do Criadouro Científico UEMA, São Luís, Maranhão, Brasil.....	78
Figura 2. Eritrócitos de <i>K. scorpioides</i> . Apresentação de MN e ANE's em eritrócitos de espécimes capturados nas áreas A1 e A2 na Baixada Maranhense com a utilização de corante Giemsa 10% e visualização em objetiva de 100x: as setas pretas indicam em A - Eritrócitos Normais; B - Eritrócito com Micronúcleo; C - Eritrócito Binucleado; D - Núcleo Entalhado; E - Núcleo Lobulado; F - Núcleo Segmentado e G - Núcleo Deslocado.....	85

1 INTRODUÇÃO

Kinosternon scorpioides (Linnaeus, 1766) é uma espécie de quelônio comum no Brasil e em todo o mundo. É conhecido como “jurarã” ou “muçua”, com hábito semiaquático, e vive em locais terrestres e alagados (Cabrera; Colantonio, 1997; Castro, 2006). Pertence à família Kinosternidae com 22 espécies já descritas (Fritz; Havas, 2007; Lopez-Luna et al., 2018; Loc-Barragán, et al., 2020; Uetz et al., 2022). Kinosternidae é uma das famílias de quelônios menos estudada, apesar de sua grande variedade.

Na Área de Proteção Ambiental (APA) da Baixada Maranhense, a exploração do *K. scorpioides* tem sido potencializada pelas atividades antrópicas através da pesca artesanal, queimadas, extração de madeira e criação de animais, principalmente búfalos. Essas ações têm um grande efeito na estabilidade e sobrevivência dos organismos nesses locais. Comumente observado, comportamentos como esses prejudicam a fauna local e para preservar os recursos naturais da região, medidas mitigadoras são necessárias para promover estratégias de preservação e conservação da APA.

Nesse contexto, os estudos de biomonitoramento ambiental no meio aquático são cruciais porque ajudam a preservar a fauna, particularmente os quelônios. Nesse ponto de vista, a ecotoxicologia serve como ferramenta para gerar respostas por meio de análises ambientais com o uso de espécies bioindicadoras como peixes, quelônios e invertebrados (Venancio, 2012). Além de permitir a implementação de políticas ambientais que melhorem os ecossistemas e ajudam a identificar contaminação, perda e mudanças de habitat, que afetam as condições biológicas e fisiológicas dos animais (Venancio, 2012).

A eliminação dos efeitos da poluição, da perda de habitat e degradação é difícil na Baixada Maranhense. Portanto, o incentivo de práticas ambientais e de proteção do ecossistema a partir da cooperação com o governo e a comunidade, bem como parcerias com as universidades, resulta em benefícios diretos para a sociedade e para o meio ambiente.

Investigações ambientais que se concentram na qualidade dos ecossistemas e na saúde dos animais fornecem informações importantes sobre o estado do conhecimento dos ambientes e das espécies de interesse ambiental, particularmente *K. scorpioides*, um táxon vital para muitas famílias ribeirinhas na APA da Baixada Maranhense. É notável que esses animais são constantemente expostos a estressores ambientais causados pela intensa atividade antrópica, o que causa mudanças sutis no DNA. Alterações genéticas como essas têm consequências permanentes para o organismo, incluindo mutações e aberrações cromossômicas agressivas, que permitem o desenvolvimento de doenças (Costa; Menk,

2000). Nessa linha, o uso de biomarcadores em sistemas hídricos em áreas impactadas é fundamental para fornecer respostas seguras para o meio ambiente.

Através de sua eficácia, os biomarcadores propostos nesta pesquisa permitirão diagnósticos precisos e confiáveis da qualidade ambiental da APA e da saúde de *K. scorpioides*. Os dados podem ajudar nas abordagens para conservar e gerenciar esse táxon *in situ*, além de fornecer novos dados sobre a espécie usando as enzimas Glutathione S-Transferase (GST), Catalase (CAT) e testes de micronúcleos como biomarcadores essenciais, fornecendo dados pioneiros para o Maranhão. Esses biomarcadores, a partir do desenvolvimento de testes bioquímicos e genéticos, são comumente utilizados antes ou depois de um evento de poluição ocorrer. São ferramentas preditivas de impactos ambientais que ajudam a investigar como uma substância afeta a biota, os ecossistemas e a saúde animal e ambiental (Magalhães; Filho, 2008).

Diante disso, este trabalho está organizado em três capítulos. No Capítulo 1 apresentamos o estado do conhecimento sobre os biomarcadores como recursos para o uso em estudos de conservação e biomonitoramento de uma espécie do gênero *Kinosternon*. Nesse caso, esse táxon pode ser usado como um biomonitor em ambientes impactados. No Capítulo 2 analisamos as respostas bioquímicas de Glutathione S-Transferase e Catalase em *K. scorpioides* (Testudines: Kinosternidae) como biomarcadores do impacto ambiental em uma área protegida na Amazônia maranhense, Sítio Ramsar Brasileiro. Os resultados foram obtidos a partir de um estudo com sangue de 106 espécimes de *K. scorpioides* oriundos de áreas urbanizadas e vegetadas da Baixada Maranhense e criadouro em diferentes estações climáticas. Finalmente, no Capítulo 3, investigamos a presença de micronúcleos (MN) e outras Anormalidades Nucleares Eritrocitárias (ANE's) em esfregaços sanguíneos de populações naturais e em cativeiro de *K. scorpioides*, comparando suas frequências com o ambiente, sexo e sazonalidade.

2 OBJETIVOS

2.3 Objetivo geral

- Analisar respostas bioquímicas e mutagênicas em *K. scorpioides* como indicadores da qualidade ambiental de uma Área de Proteção Ambiental na Amazônia Oriental Maranhense.

2.4 Objetivos específicos

- Utilizar a espécie *K. scorpioides* como biomonitor em estudos de avaliação dos efeitos da contaminação ambiental por meio do uso de biomarcadores bioquímicos e genéticos;
- Identificar respostas bioquímicas por meio das enzimas Glutathione S-Transferase e Catalase em sangue de *K. scorpioides* de ambiente natural e controlado;
- Determinar a frequência genética de micronúcleos e alterações nucleares nos eritrócitos de *K. scorpioides*;
- Comparar as respostas bioquímicas frente às variações sazonais, biometria e sexo dos animais oriundos de ambiente natural e controlado e;
- Quantificar os elementos químicos, micronutrientes e granulometria presentes nos solos da Baixada Maranhense, assim como variáveis abióticas da água.

CAPÍTULO 1

Biomarcadores bioquímicos e genotóxicos em tartarugas (Reptilia: Testudines):
abordagem metodológica para uma espécie do gênero *Kinosternon*

Capítulo publicado no e-Book:

Monitoramento Ambiental: metodologias e estudos de casos¹

¹Rodrigues, C. A. L., Medeiros, A. M., Pereira, E. P., Carvalho-Neta, R. N. F., Sousa, A. L. Biomarcadores bioquímicos e genotóxicos em tartarugas (Reptilia: Testudines): abordagem metodológica para uma espécie do gênero *Kinosternon*. In: Sousa, D. B. P.; Castro, J. S.; Jesus, W. B. (Orgs). **Monitoramento Ambiental:** Metodologias e Estudos de Casos. 1 Ed. São Luís: i-EDUCAM, 2022. p. 81-97. DOI: <https://doi.org/10.29327/576562>. (Anexo A).

BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS E GENOTÓXICOS EM TARTARUGAS (REPTILIA: TESTUDINES): ABORDAGEM METODOLÓGICA PARA UMA ESPÉCIE DO GÊNERO *Kinosternon*

Carlos Alailson Licar Rodrigues^{1*}, Almerinda Macieira Medeiros², Elizângela Pinheiro Pereira², Raimunda Nonata Fortes Carvalho Neta^{2,3} & Alana Lislea de Sousa¹

¹ Programa de Pós-graduação em Ciência Animal - Universidade Estadual do Maranhão.

² Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE.

³ Departamento de Biologia - Universidade Estadual do Maranhão.

Doi: 10.29327/576562.1-6

View online: <https://doi.org/10.29327/576562>

*e-mail do autor correspondente: carlos_licar@hotmail.com

INTRODUÇÃO

Apresentamos o estado da arte sobre 3 (três) principais biomarcadores bioquímicos e genotóxicos que podem ser utilizados numa abordagem de biomonitoramento para uma espécie do gênero *Kinosternon*. Esse gênero apresenta 22 espécies, conforme informações disponíveis no Banco de Dados de Répteis do mundo (UETZ et al., 2022).

Reino Animalia

Filo Chordata

Subfilo Vertebrata

Classe Reptilia

Ordem Testudines

Família Kinosternidae

Subfamília Kinosterninae

Gênero *Kinosternon* (Spix, 1824)

Kinosternon acutum (Gray, 1831)

Kinosternon alamosae (Berry; Legler, 1980)

Kinosternon angustipons (Legler, 1965)

Kinosternon arizonense (Gilmore, 1923)

Kinosternon baurii (Garman, 1891)

Kinosternon chimalhuaca (Berry; Seidel; Iverson, 1996)

Kinosternon cora (Loc-Barragán et al., 2020)

Kinosternon creaseri (Hartweg, 1934)

Kinosternon dunni (Schmidt, 1947)
Kinosternon durangoense (Iverson, 1979)
Kinosternon flavescens (Agassiz, 1857)
Kinosternon herrerae (Stejneger, 1925)
Kinosternon hirtipes (Wagler, 1830)
Kinosternon integrum (LeConte, 1854)
Kinosternon steindachneri (Siebenrock, 1906)
Kinosternon leucostomum (Duméril; Bibron, 1851)
Kinosternon oaxacae (Berry; Iverson, 1980)
Kinosternon scorpioides (Linnaeus, 1766)
Kinosternon sonoriense (LeConte, 1854)
Kinosternon abaxillare (Baur, 1925)
Kinosternon subrubrum (Bonnaterre, 1789)
Kinosternon vogti (López-Luna et al., 2018)

Kinosternon scorpioides (Linnaeus, 1766) é um cágado Kinosternidae, gênero *Kinosternon* (Fig. 1). Apresenta ampla distribuição geográfica com registros desde o México à Argentina, incluindo a Região Amazônica, Escudo das Guianas e Guianas. No território brasileiro, o táxon ocorre em vários estados, sobretudo no domínio amazônico até os biomas cerrado e mata atlântica no nordeste do país (COSTA; BÉRNILS, 2018). Entre as espécies do gênero, apenas *K. scorpioides* ocorre no Brasil. No presente contexto, indicamos a possibilidade de uso desse táxon como biomonitor de ambientes impactados.



Figura 1. Espécime adulto de *Kinosternon scorpioides*.

Fonte: acervo dos autores (2019).

A espécie é conhecida pelos maranhenses como “jurarã” e paraenses de “muçã”. Possui hábito semiaquático e sobrevive em locais secos e alagados (CABRERA; COLANTONIO, 1997). O epíteto específico “*scorpioides*” surgiu a partir da morfologia da cauda, pois se apresenta no formato do ferrão de escorpião. A morfologia da cauda facilita

a inserção do pênis na cloaca da fêmea, possibilitando o apoio com maior precisão e eficácia durante o acasalamento entre macho e fêmea (CASTRO, 2006).

O acasalamento pode ocorrer no período chuvoso e é ausente no período de estiagem, fase em que as fêmeas realizam a ovipostura. A cópula acontece na água, com o macho cortejando a fêmea, seguida da perseguição, domínio e monta, apoiando as quatro patas sobre a carapaça e com movimentos da cauda em busca da abertura cloacal até a introdução do pênis (CHAVES, 2011).

Kinosternon scorpioides tem dimorfismo sexual evidente, sendo os machos maiores que as fêmeas, com tamanho médio de 16,5 cm de comprimento de carapaça, enquanto as fêmeas possuem 13,8 cm. Elas possuem carapaça mais arredondada enquanto os machos, alongadas. Em machos, o plastrão é côncavo e nas fêmeas, ele é reto. A cauda é diferenciada nesses animais e em machos apresenta-se maior que nas fêmeas (ACUNÃ-MESEN, 1994).

Outro aspecto notável é a sazonalidade, que exerce forte influência na reprodução de *K. scorpioides*, podendo o ciclo ser sincronizado por fatores climáticos, alimentares e hormonais, com destaque para a temperatura, que influencia a incubação dos ovos e, conseqüentemente, a determinação sexual desses animais (FERREIRA-JÚNIOR, 2009; VIANA et al., 2013). A diferenciação no sexo é evidente e ocorre nas primeiras fases do desenvolvimento embrionário, correspondendo ao primeiro terço (1ª à 9ª semana de incubação). Nesse momento, o processo de definição do sexo ainda pode ser reversível (BULL; VOGT, 1981; MROSOVSKY; PIEAU, 1991; MOELLER, 2013). É destacado por Ferreira-Júnior (2009) que os machos se originam a uma temperatura próxima de 26 °C e as fêmeas, a 30 °C.

Populações de *K. scorpioides* costumam viver em grupos e compartilhar o mesmo nicho. Deslocam-se em movimentos lentos e colonizam diferentes espaços para se alimentar e reproduzir. Estudos têm mostrado que a morfologia do casco dos machos e das fêmeas pode sofrer modificações de acordo com o ambiente, cujas características ecológicas são diferenciadas frente à sazonalidade regional (ROCHA; MOLINA, 1987; DELDUQUE, 2000).

Como característica ecológica, na estiagem, quando as condições climáticas e alimentares são desfavoráveis à espécie, enterram-se no solo como estratégia fisiológica que caracteriza um estado de baixo metabolismo e gasto energético. Esse mecanismo é conhecido como “estivação” e está relacionado às oscilações de calor no ambiente, regulando assim, a temperatura corporal, de modo a evitar o estresse térmico (PEREIRA et al., 2007).

Por habitar áreas úmidas, *K. scorpioides* são conhecidos como “tartaruga-do-lodo” e são capazes de liberar substâncias odoríferas através da superfície corporal quando se sentem ameaçados ou diante da presença humana (ROCHA; MOLINA, 1990). A espécie possui hábito alimentar carnívoro e são ovíparas, tendo uma dieta variada, se alimentando de girinos, peixes, matéria orgânica e vegetais (PRITCHARD, 1979).

K. scorpioides possui grande importância ecológica e ambiental para as comunidades tradicionais, principalmente aquelas de pescadores e ribeirinhas que comumente as utilizam como recurso alimentar, além de contribuir com a renda de muitas famílias por meio da venda clandestina desses animais, que é considerada proibida pela Lei nº 5.197, de 03 de janeiro de 1967 que dispõe sobre a proteção à fauna e dá outras providências. A fauna silvestre tem a sua proteção assegurada pela Lei de Crimes Ambientais (Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998). Diante da importância e valor ambiental para as populações, *K. scorpioides* pode ser utilizado em abordagens de biomonitoramento, visto que apresenta muitos requisitos necessários a um biomonitor adequado para análises de biomarcadores bioquímicos e genotóxicos na indicação de ambientes poluídos, além de sua manutenção nos ecossistemas para as atuais e futuras gerações.

Nesse âmbito, esse trabalho constitui-se de uma breve revisão de literatura que destaca aspectos importantes sobre o uso de biomarcadores em espécies de tartarugas da ordem Testudines. O estudo é de cunho descritivo e bibliográfico, com consulta às principais bases de dados científicos como PubMed, Scientific Electronic Library Online - Scielo, Portal de Periódicos Capes, Directory of Open Access Journals – DOAJ, Repositórios Científicos de Acesso Aberto de Portugal – RCAAP e Google Acadêmico.

O objetivo principal foi discutir o uso de biomarcadores bioquímicos e genotóxicos em tartarugas com foco em uma abordagem metodológica para uma espécie do gênero *Kinosternon*.

O uso de quelônios em estudos de biomonitoramento

A contaminação dos sistemas aquáticos nos últimos anos tem se intensificado através de ações antrópicas que contribuem de forma expressiva para os desequilíbrios nos ecossistemas. Os impactos antrópicos causados ao meio ambiente têm despertado a atenção dos pesquisadores, pois fontes poluidoras podem contribuir para a contaminação dos sistemas aquáticos, entre as quais destacam-se as oriundas do ar e do solo. Os contaminantes, conhecidos como “estressores ambientais” podem agregar-se no ambiente em sua forma

original ou como resultado do processo de biotransformação (BERTOLETTI, 1990; CAJARAVILLE et al., 2000). Para elucidar o conhecimento e obter respostas a determinados fenômenos ao nível biológico e ambiental, ensaios ecotoxicológicos são capazes de avaliar os efeitos nocivos gerados por contaminantes, sejam eles originados pela ação humana ou não, em indivíduos, populações e/ou comunidade animal (AZEVEDO; CHASIN, 2003).

É válido destacar diferenças importantes entre organismos biomonitores e bioindicadores. Biomonitores são utilizados frequentemente em estudos de biomonitoramento, que estão pautados em um acompanhamento constante dos organismos de um determinado local. Esse monitoramento de área fornece informações importantes sobre mudanças ocorridas no ambiente, em consequência da poluição ou agressão antropogênica e, isso, pode acarretar sérios riscos aos animais de um dado ecossistema (ANDREA, 2008).

Já os bioindicadores correspondem a uma espécie, grupos de espécies ou comunidades biológicas relacionando-se diretamente com a presença, abundância e distribuição delas, indicando o nível dos impactos gerados no ambiente (CALLISTO; GONÇALVES JÚNIOR, 2002). Nesse contexto, animais são utilizados como biomonitores em estudos de monitoramento ambiental a partir do uso de biomarcadores, que respondem a medidas de exposição ou à dose dos agentes poluentes. Entre esses animais, destacam-se os moluscos, crustáceos e peixes, que são de uso comum, e grande parte dos estudos são com a utilização deles como biomonitores de qualidade ambiental em áreas poluídas ou que recebem grande impacto ambiental (SOUSA; NETA, 2014; CASTRO et al., 2014; RIBEIRO et al., 2016; CARVALHO NETA et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2019).

Diante desse cenário, os quelônios são um grupo entre os vertebrados, que também são estudados com o intuito de gerar respostas frente às interações constantes entre os espaços terrestres e aquáticos. Esses organismos sofrem influência do ambiente externo, que refletem no comportamento fisiológico e ecológico, regido, em muitas vezes, pelo ciclo hidrológico local, pela sazonalidade regional, e por ser um grupo diversificado que vive em locais diversos. Essa flexibilidade de sobrevivência em vários ambientes faz deles um grupo essencial para estudos de biomonitoramento ambiental (MOLL; MOLL, 2004).

Algumas espécies de quelônios sofrem forte pressão de caça e pesca, e com isso, são vulneráveis aos impactos antrópicos. Os contaminantes muitas vezes são prejudiciais à saúde animal e geram influências sobre as populações, ocasionando declínio populacional e grandes efeitos que, muitas vezes, são irreversíveis. Isso pode agravar ainda mais a

situação de vulnerabilidade desses animais frente aos estressores ambientais (KELLER et al., 2004b). A sensibilidade dos quelônios aos contaminantes pode variar entre espécies, mas elas respondem aos potenciais riscos dos estressores à reprodução, fisiologia, comportamentos e sobretudo, à saúde humana (GOLET; HAINES, 2001; STORELLI; MARCOTRIGIANO, 2003; KELLER et al., 2004a; KELLER et al., 2004b).

Apesar das pesquisas envolvendo a contaminação por poluentes em quelônios serem ainda pouco desenvolvidas e difundidas no Brasil, há relatos na literatura da utilização de quelônio como biomonitor em análises de contaminação por agrotóxicos e mercúrio na Bacia do Rio Xingu (Pará) e com a tartaruga de água doce *Podocnemis unifilis* (PIGNATI, 2017). A abordagem e avaliação do impacto geraram respostas úteis à comunidade, uma vez que essa espécie é um recurso alimentar das comunidades tradicionais da região de entorno do estudo. Isso vem ao encontro dos relatos sobre *K. scorpioides* oferecidos nesta revisão, pois é uma espécie que também possui importância alimentar para muitas famílias em municípios da Baixada Maranhense, estado do Maranhão (CASTRO, 2006). Devido ao valor que esses animais apresentam para as comunidades, sobretudo do consumo tradicional, torna-se fundamental o conhecimento dos efeitos que os contaminantes causam nesses animais.

O estudo de Silva (2011) também complementa as informações com dados sobre alterações bioquímicas e hematológicas em resposta aos estressores ambientais em *Phrynops geoffroanus* (cágado-de-barbicha). Os achados revelaram que a exposição dessa espécie a contaminantes geraram respostas seguras acerca da qualidade ambiental e da saúde animal, pois constatou-se o potencial citotóxico dos compostos presentes no ambiente urbano e o aumento da capacidade antioxidante e atividades de enzimas funcionais de várias vias de detoxificação de compostos químicos. Dessa forma, esses relatos são fundamentais para o entendimento de que a contaminação ambiental pode aumentar os danos oxidativos e fornecer respostas importantes por meio de alterações fisiológicas e comportamentais em uma espécie de testudíneo de água doce. *Phrynops geoffroanus* tem sido considerado um modelo para ecotoxicologia evolutiva num estudo com abordagem sobre contaminação ambiental, condição e variabilidade genética, sendo demonstrada uma possível adaptação à contaminação ambiental (VENANCIO, 2012).

Pesquisas com quelônios de água doce são menos frequentes e destacam-se as desenvolvidas por Oliveira (2020) que avaliou o efeito potencial de agrotóxicos em indivíduos recém-eclodidos de tartaruga *Podocnemis expansa* (tartaruga-da-amazônia); os resultados comprovaram a influência direta dos agrotóxicos nas populações e evidenciou

que pouco se sabe sobre os reais efeitos desses estressores ao meio ambiente e/ou à saúde humana em longo prazo.

Assim sendo, frente aos poucos trabalhos disponíveis, essa revisão oferece perspectivas de novas pesquisas e contribuições científicas sobre aspectos biológicos dos quelônios, numa abordagem detalhada e útil dos processos de contaminação e influência ambiental na fisiologia, comportamentos e reprodução de espécies de ambiente dulcícola. Isso pode gerar informações úteis para o monitoramento ambiental, especialmente a partir de abordagens com biomarcadores bioquímicos e genotóxicos nos animais.

Biomarcadores bioquímicos e mutagênicos: alterações na atividade da Glutathione S-Transferase, Catalase e Teste do Micronúcleo

A ecotoxicologia é uma área do conhecimento capaz de contribuir com avaliação dos níveis de impactos nos ecossistemas, especialmente no que se refere a: identificar os efeitos adversos de poluentes a partir de fenômenos que ocorrem antes ou depois de um evento de poluição e investigar as consequências que uma substância ou a mistura delas podem causar às comunidades biológicas em um corpo hídrico, podendo ser utilizados diversos testes para avaliação do grau de toxicidade sobre a biota aquática (MAGALHÃES; FILHO, 2008). Esses conhecimentos podem ser empregados como instrumentos de controle e vigilância contínuos capazes de detectar, a curto e em longo prazo, os reais impactos ambientais em uma região (MAGALHÃES; FILHO, 2008).

O biomonitoramento da contaminação em um determinado local pode ser efetivado a partir do uso de metodologias de cunho biológico, capazes de fornecer respostas acerca da qualidade do ambiente, além de mensurar os efeitos que os poluentes podem causar. Entre as abordagens metodológicas destacam-se os biomarcadores, que consistem em alterações biológicas (moleculares, fisiológicas, comportamentais, celulares, fluídos, tecidos ou órgãos) de um organismo e indicam uma possível exposição a um estressor ambiental, como poluentes químicos, industriais, domésticos, dentre outros (RYAN et al., 2007).

Nas análises de biomonitoramento, sugere-se a utilização de diversos biomarcadores, uma vez que uma única resposta não reflete com precisão os efeitos causados aos organismos em ambiente impactado, assim como escolher a melhor espécie indicadora, capaz de fornecer resultados seguros sobre o que está sendo avaliado. Nesse contexto, é necessário ter o conhecimento das funções biológicas dos organismos, da dinâmica vital, das variações naturais locais e da influência de fatores ambientais como sazonalidade e parâmetros abióticos. Esses elementos ajudam a diferenciar os efeitos da

poluição, daqueles relacionados à influência de outros parâmetros ambientais, fisiológicos e sazonais de um biomarcador (LINKS; GROOPMAN, 2010).

A Organização Mundial de Saúde - OMS (1993) recomenda que os biomarcadores podem ser utilizados para vários fins, e destaca os objetivos principais de seu uso: avaliar a exposição do organismo a um xenobiótico, bem como o efeito deles e a suscetibilidade dos organismos. A utilização dos indicadores biológicos tem por finalidade responder a relação causa-efeito e dose-efeito em estudos de riscos, monitoramento ambiental e diagnóstico clínico.

Segundo a OMS (1993) e Rudiger (1999), independente da finalidade e aplicabilidade, os biomarcadores podem ser classificados em 3 tipos principais:

- **Biomarcadores de exposição:** utilizados para avaliar a exposição individual ou coletiva de um organismo a dada substância, estabelecendo relação entre exposição externa e quantificação interna da substância;
- **Biomarcadores de efeito:** usados para identificar alterações pré-clínicas ou demais efeitos à saúde frente à exposição a uma substância e;
- **Biomarcadores de suscetibilidade:** elucidam o nível de resposta da exposição de uma substância em um determinado indivíduo.

Entre os biomarcadores comumente empregados nos estudos de campo, pode-se destacar as alterações nos níveis das enzimas Glutathione S-Transferase e Catalase, bem como o teste de micronúcleo. Sugere-se que todas essas técnicas podem ser aplicáveis em estudos com *K. scorpioides*.

Glutathione S-Transferase (GST)

Um biomarcador bioquímico bastante abordado na literatura tem sido a alteração na atividade da GST (RUDIGER, 1999; CARVALHO-NETA et al., 2012; PINHEIRO-SOUSA et al., 2021). Essa enzima possui um papel fundamental na detoxificação de compostos endobióticos e xenobióticos e são essenciais no processo de catalisação e conjugação com outras moléculas (CHELVANAYAGAM et al., 2001). A GST recebe esse nome por atuar na catálise em conjugação de compostos eletrofílicos com o tripeptídeo Glutathione Reduzida (GSH), diminuindo as chances de associação desses elementos às células (HUGGETT et al., 1992).

As GSTs ocorrem em todos os organismos procariotos e eucariotos, como plantas, moluscos, crustáceos, insetos, peixes, anfíbios, répteis e mamíferos. Nos vertebrados, de modo geral, elas estão presentes em maior nível no fígado (VAN DER OOST et al., 2003;

SANTOS, 2013). É encontrada no citosol e matriz mitocondrial e, juntamente com a catalase, são um dos mais importantes antioxidantes já estudados e atuam fortemente na eliminação de produtos primários de oxigênio parcialmente reduzidos, prevenindo a peroxidação lipídica e defesa antioxidante (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; BAKER et al., 2007; LIMONPACHECO; GONSEBATT, 2009).

Trabalhos têm demonstrado a elevação da atividade de GST em tecidos de vários organismos, desde invertebrados e vertebrados, entre os quais cita-se os crustáceos, peixes e répteis (SILVA, 2015; OLIVEIRA, 2018; CARVALHO NETA et al., 2019). Em quelônios, há estudos com *Chelonia mydas* (tartaruga-verde) onde analisaram a atividade das enzimas GST e CAT, vistas como principais biomarcadores de estresse oxidativo presentes no sangue de animais vítimas de ingestão de lixo plástico e foi possível detectar taxa de mortalidade de alguns deles em decorrência da debilidade do sistema de defesa antioxidante ocasionadas pelo estresse oxidativo relacionado ao processo de isquemia-reperfusão do trato gastrointestinal (YOSHIDA, 2012). Frossard (2020) também realizou uma avaliação ecotoxicológica de metais em ovos e filhotes recém eclodidos de espécies de testudines como *Podocnemis expansa*, *Chelonia mydas* e *Caretta caretta* como bioindicadores da presença de metais nos ambientes marinho e dulcícola. Constatou-se que os dois ambientes são afetados por metais a partir da identificação desses compostos em ovos e filhotes, sendo, portanto, áreas impactadas por ações antrópicas.

Diante dos estudos já realizados com o uso de determinadas espécies de tartarugas e da ausência de dados sobre essa temática com o *K. scorpioides*, esta investigação traz novos saberes sobre o táxon, sendo, portanto, uma abordagem nova para os ecossistemas maranhenses.

Catalase (CAT)

As catalases são um conjunto de enzimas capazes de auxiliar as células na detoxificação de espécies que reagem ao oxigênio disponível, atuando na catálise, convertendo o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio (BELO; SOUZA, 2016). É uma enzima antioxidante capaz de atuar na decomposição do H_2O_2 quando produzidos em grandes quantidades nos processos de biotransformação nos peroxissomos, sendo considerada uma das mais importantes enzimas já encontradas nos vertebrados (VENTURA et al., 2002).

Quando expostas a xenobióticos, as células desenvolvem meios que as protegem dos danos oxidativos e a CAT exerce uma função essencial na defesa das células e órgãos contra

os danos gerados pela ação do H_2O_2 (DONG et al., 2018). Quando, por exemplo, o sistema de defesa é insuficiente para proteger as células contra os danos causados pelas Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), isso gera estresse oxidativo, seguido da oxidação de lipídios, proteínas e DNA. A CAT atua na defesa do organismo durante os processos fisiológicos normais e em casos de estresse oxidativo (CARVALHO-NETA; ABREU-SILVA, 2010). Dessa maneira, estudos com análises de CAT em quelônios de água doce, a exemplo de *P. geoffroanus* têm sido conduzidos no Brasil (SILVA, 2011; SILVA; SILVA; ALMEIDA, 2016). Entretanto, são necessárias mais informações para adicionar novos saberes para o biomonitoramento em ambientes dulcícolas, especialmente com uso de *K. scorpioides*.

Teste de micronúcleo

O Teste do Micronúcleo (MN) é uma abordagem genotóxica que identifica possíveis alterações cromossômicas utilizando-se como parâmetros, o aumento de frequência de eritrócitos policromáticos com presença de micronúcleos quando as células estão expostas a determinados agentes químicos (CARRARD et al., 2007). A compreensão e entendimento desse teste é essencial para identificar alterações celulares relacionadas à frequência de mutações quando expostas a diversas fontes poluidoras, sobretudo, aos agentes genotóxicos que afetam diretamente o núcleo da célula (UCHÔA; MAGALHÃES, 2020).

A formação dos micronúcleos é resultante da quebra de cromossomos acêntricos ou do atraso deles em relação aos outros cromossomos durante a divisão celular, e podem se formar a partir da exposição a agentes que provocam a quebra da molécula de DNA (BUCKER; CARVALHO; ALVES-GOMES, 2006). Heddle et al., (1991) apontam para quatro situações em que os micronúcleos podem surgir: (1) perda de fragmento mitótico acêntrico, (2) variedade mecânica de quebra e troca de cromossomos, (3) perda de cromossomos mitóticos internos e (4) apoptose.

O teste do micronúcleo é vantajoso, pois é uma técnica citogenética conhecida e de fácil aplicabilidade, além de ser muito indicada em estudos de avaliação de danos nos cromossomos causados pela exposição a estressores ambientais. É uma metodologia de fácil desenvolvimento, sendo necessário apenas o uso de microscópio óptico para leitura das lâminas e contagem dos eritrócitos com presença de um ou mais micronúcleos (BOLOGNESI et al., 2006; VIARENGO et al., 2007).

Análises de micronúcleos já foram documentadas para uma espécie de jabuti, *Chelonoidis carbonarius* (CASTRO, 2020) e *P. geoffroanus* (SILVA, 2011). Vários são os relatos que confirmam a eficácia do teste como um importante indicador citogenético, de

baixo custo, rápido, não invasivo, que pode ser replicado com o intuito de avaliar possíveis danos e monitorar a exposição de indivíduos a agentes genotóxicos, sobretudo aos carcinogênicos (CARVALHO et al., 2002). Assim, sugere-se que *K. scorpioides* possa também ser utilizado como espécie biomonitora para análises de biomarcadores genotóxicos.

CONCLUSÃO

Os biomarcadores bioquímicos e genotóxicos apresentados nesta investigação (GST, CAT e Teste do Micronúcleo) são instrumentos práticos que sinalizam respostas úteis em nível biológico e ambiental acerca dos impactos gerados por fontes poluidoras e substâncias nocivas à fauna e aos ecossistemas marinho e dulcícola. O *status* do conhecimento apresentado demonstrou que o uso desses biomarcadores em testudíneos, entre eles o *K. scorpioides* é possível e contribuem com novos conhecimentos no âmbito da temática, além de oferecer opções para o estabelecimento de medidas protetivas e de conservação que implicam diretamente em melhorias na saúde do ambiente e dos animais, mitigando possíveis impactos, a extinção de espécies e desequilíbrios nos ecossistemas. Os estudos com biomarcadores em quelônios de regiões amazônicas ainda são considerados insuficientes e por isso, é imprescindível o desenvolvimento de pesquisas que trazem novas informações científicas para a área e que promovam o incentivo aos hábitos sustentáveis e de conservação das tartarugas *in situ*.

REFERÊNCIAS

- ACUNÃ-MESEN, R. A. Variación morfométrica y características del habitat de a tortuga candado *Kinosternon scorpioides* em Costa Rica (Chelonia, Kinosternidade). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 54, n. 3, p. 537-547, 1994.
- ANDREA, M. M. Bioindicadores ecotoxicológicos de agrotóxicos. Disponível em: http://www.infobibos.com/Artigos/2008_4/Bioindicadores/index.htm. Acesso em: 9 de ago. 2022.
- AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. As bases toxicológicas da ecotoxicologia. São Carlos: **RIMA**; São Paulo: Intertox, 2003. 340 p.
- BAKER, P.J.; COSTANZO, J. P.; LEE JR, R. E. Oxidative stress and antioxidant capacity of a terrestrially hibernating hatchling turtle. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 177, n. 8, p. 875–883, 2007.
- BELO, M. F. R. F.; SOUZA, A. L. F. Estudo cinético da enzima catalase (E.C. 1.11.1.6) de extrato bruto de bata doce (*Impomoea batatas*). **Scientia Plena**, v. 12, n. 07, p. 1 – 7, 2016.
- BERTOLETTI, E. Toxicidade e Concentração de Agentes Tóxicos em Efluentes Industriais. **Revista Ciência e Cultura**, v. 43, n. 3/4, p. 271-277, 1990.
- BOLOGNESI, C.; PERRONE, E.; ROGGERI, P.; PAMPANIN, D. M.; SCIUTTO, A. Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 78 Suppl 1, p. S93-8, 2006.
- BUCKER, A.; CARVALHO, W.; ALVES-GOMES, J. A. Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno, **Acta Amazonica**, v. 36, n. 3, p. 357-364, 2006.
- BULL, J. J.; VOGT, R. C. Temperature-sensitive periods of sex determination in Emydid turtles. **Journal of Experimental Zoology**, v. 218, p. 435-440. 1981.
- BRASIL. **Lei nº 5.197, de 03 de janeiro de 1967**. Dispõe sobre a proteção à fauna e dá outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, DF, v. 1, 05 de janeiro de 1967. Seção 1, p. 177.
- BRASIL. **Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998**. Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providências. Brasília, DF, 12 de fevereiro de 1998. 177º da Independência e 110º da República.
- CABRERA, M. R.; COLANTONIO, S. E. Taxonomic revision of the South American subspecies of the turtle *Kinosternon scorpioides*. **Journal Herpetology**, v. 31 n.4, p. 507-513, 1997.
- CAJARAVILLE, M. P.; BEBIANNO, J. M.; BLASCO, J.; PORTE, C.; SARASQUETE, C.; VIARENGO, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **Science of the Total Environment**, v. 247, p. 295-311, 2000.
- CALLISTO, M.; GONÇALVES JÚNIOR, J. F. 2002. A vida nas águas das montanhas. **Ciência Hoje**, v. 31, n. 182, p: 68 – 71.

CARRARD, V. C.; COSTA, C. H.; FERREIRA, L. A.; LAUXEN, I. S.; RADOS, P. V. "Teste dos Micronúcleos - Um Biomarcador de Dano Genotóxico em Células Descamadas da Mucosa Bucal". **Revista da Faculdade de Odontologia**, v. 48, n. 1/3, p. 77-81. 2007.

CARVALHO NETA, R. N. F.; ANDRADE, T. S. O. M.; OLIVEIRA, S. R. S.; JUNIOR, A. R. T.; CARDOSO, W. S.; SANTOS, D. M. S.; BATISTA, W. S.; SERRA, I. M. R. S.; BRITO, N. M. Biochemical and morphological responses in *Ucides cordatus* (Crustacea, Decapoda) as indicators of contamination status in mangroves and port areas from northern Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 16, 2019.

CARVALHO, M. B.; RAMIREZ, A.; GATTÁS, G. J. F.; GUEDES, A. L.; AMAR, A.; RAPOPORT, A.; NETO, J. C. B.; CURIONI, O. A. Correlação entre a Evolução Clínica e a Frequência de Micronúcleos em Células de Pacientes Portadores de Carcinomas Orais e Orofaringeas. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 48, n. 4, p. 317-322, 2002.

CARVALHO-NETA, R. N. F.; ABREU-SILVA, A. L. *Sciades herzbergii* oxidative stress biomarkers: An in situ study of an estuarine ecosystem (São Marcos, Maranhão, Brazil). **Brazilian Journal Oceanography**, v. 58, p. 11–17, 2010.

CARVALHO-NETA, R. N. F.; TORRES JR., A. R.; ABREU-SILVA, A. L. Biomarkers in Catfish *Sciades herzbergii* (Teleostei: Ariidae) from Polluted and Non-polluted Areas (São Marcos Bay, Northeastern Brazil). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.166, p.1-12, 2012.

CASTRO, A. B. **Biologia reprodutiva e crescimento do muçuã *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1776) em cativeiro**. Belém. 2006. 101 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Pará (UFPA), Centro de Ciências Agrárias, Núcleo de Estudos em Ciência Animal, Belém, 2006.

CASTRO, G. S. **Influência da sazonalidade e do sexo na hematologia, na citoquímica e na bioquímica do estresse oxidativo e metabólico de '*Chelonoidis carbonarius*' (Spix, 1824), mantidos em cativeiro**. 2020. 125 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, 2020.

CASTRO, J. S.; SILVA, J. S.; FREITAS, L. C.; CARVALHO-NETA, R. N. F. Biomarcadores histopatológicos na espécie *Hoplias malabaricus* (Pisces, Osteichthyes, Erythrinidae) em uma Unidade de Conservação de São Luís (MA). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 6, p. 1687–1694, 2014.

CHAVES, L. P. F. A. **Morfologia dos órgãos genitais masculinos e níveis séricos de testosterona de jurará (*Kinosternon scorpioides*, Linnaeus, 1766) criado em cativeiro na região da baixada maranhense no estado do Maranhão**. 2011. 92 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), Centro de Ciências Agrárias, São Luís, 2011.

CHELVANAYAGAM, G.; PARKER, M.W.; BOARD, P.G. Fly fishing for GSTs: a unique nomenclature for mammalian and insect glutathione transferases. **Chemico-Biological Interactions**, v. 133, n.1-3, p. 256–260, 2001.

COSTA, H. C.; BÉRNILS, R. S. Répteis do Brasil e suas Unidades Federativas: lista de espécies. **Herpetologia Brasileira**, v. 7, n. 1, p. 11-57. 2018.

DELDUQUE, M. Ficha do bicho; muçuã. **Globo Rural**. n°. 176, p. 83-84, 2000.

- DONG, H. K.; LU, G. H.; YAN, Z. H.; LIU, J. C.; NKOOM, M.; YANG, H. H. Responses of antioxidant and biotransformation enzymes in *Carassius carassius* exposed to hexabromocyclododecane. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 62, p. 46–53, 2018.
- FERREIRA-JÚNIOR, P. D. Aspectos ecológicos da determinação sexual em tartarugas. **Acta Amazonica**, v.39, n. 1, p. 139-154, 2009.
- GOLET, W. J.; HAINES, T. A. Snapping turtles (*Chelydra serpentina*) as monitors for mercury contamination of aquatic environments. **Environmental Monitoring Assessment**, v. 71, p. 211-220, 2001.
- HEDDLE, J. A.; CIMINO, M. C.; HAYASHI, M.; ROMAGNA, F.; SHELBY, M. D.; TUCKER, J. D.; VANPARYS, P.; MACGREGOR, J. T. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 18, n. 4, p. 277-91, 1991.
- HUGGETT, R. J.; KLIMERLE, R. A.; MEHRLE, P. M.; JR, H. L. B. Biomarkers: biochemical, physiological, and histological marker of antropogenic stress. USA: **Lewis Publishers**, 1992.
- KELLER, J. M.; KUCKLICK, J. R.; ANDREW STAMPER, M.; HARMS, C. A.; MCCLELLAN-GREEN, P. D. Associations between organochlorine contaminant concentrations and clinical health parameters in loggerhead sea turtles from North Carolina, U.S.A. **Environmental Health Perspectives**, v. 112, n. 10, p. 1074-1079, 2004a.
- KELLER, J. M.; KUCKLICK, J. R.; MCCLELLAN-GREEN, P. D. Organochlorine contaminants in loggerhead sea turtle blood: extraction techniques and distribution among plasma and red blood cells. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 254-264, 2004b.
- LIMÓN-PACHECO, J.; GONSEBATT, M. E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. **Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 674, p. 137-147, 2009.
- LINKS, J. M.; GROOPMAN, J. D. Biomarkers of exposure, effect, and susceptibility. In: McQueen, C.A. (Ed.). **Comprehensive Toxicology**. Amsterdam: Elsevier, p. 225-243, 2010.
- MAGALHÃES, D. P.; FILHO, A. S. F. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 355-381, 2008.
- MOLL, D.; MOLL, E.O. The ecology, exploitation and conservation of river turtles. **New York: Oxford University Press**, 2004. 393p.
- MOLLER, K. T. Temperature-Dependent Sex Determination in Reptiles. Embryo Project Encyclopedia. Disponível em: <http://embryo.asu.edu/handle/10776/4214>. Acesso em: 27 de ago. 2022.
- MOROSOVSKY, N.; PIEAU, C. Transitional range of temperature, pivotal temperatures and thermosensitive stages for sex determination in reptiles. **Amphibia-Reptilia**, v. 12, p. 169 – 179. 1991.
- OLIVEIRA, F. G. **Biomonitoramento do Rio Perequê, Porto Belo – SC, utilizando a espécie de peixe *Geophagus brasiliensis***. 2018. 88 p. Dissertação (Mestrado) –

Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, Paraná, 2018.

OLIVEIRA, J. S. P. **Efeitos toxicológicos da contaminação por agrotóxicos em recém-eclodidos de *Podocnemis expansa* (Testudines: Podocnemidae)**. 2020. 35 p. Dissertação (Mestrado) – Instituto Federal Goiano, Campus Urutaí, 2020.

OLIVEIRA, S. R. S.; BATISTA, W. S.; SOUSA, J. B. M.; NOLETO, K. S.; LIMA, I. M. A.; ANDRADE, T. S. O. M.; CARDOSO, W. S.; CARVALHO-NETA, R. N. F. C. Enzymatic and Histological Biomarkers in *Ucides cordatus* (Crustacea, Decapoda) in an Industrial Port on the North Coast of Brazil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 102, n. 6, p. 802-810, 2019.

PEREIRA, L. A.; SOUSA, A. L.; CUTRIM, M. V. J.; MOREIRA, E. G. Características ecológicas do habitat de *Kinosternon scorpioides* Linnaeus, 1766 (Reptilia, Chelonia, Kinosternidae) no município de São Bento - Baixada maranhense (Maranhão, Brasil). **Boletim do Laboratório de Hidrobiologia**, v. 20, p. 9-14, 2007.

PIGNATI, M. T. **Contaminação de *Podocnemis unifilis* (Testudines: Podocnemididae) por agrotóxicos e mercúrio na bacia do Rio Xingu, Brasil**. 2017. 109p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Belém, 2017.

PINHEIRO-SOUSA, D. B.; DA COSTA SOARES, S. H.; TORRES, H. S.; DE JESUS, W. B.; DE OLIVEIRA, S. R. S.; BASTOS, W. R.; DE OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; CARVALHO-NETA, R. N. F. Sediment contaminant levels and multibiomarker approach to assess the health of catfish *Sciades herzbergii* in a harbor from the northern Brazilian Amazon. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 208, p. 111540, 2021.

PRICHARD, P. C. H. Encyclopedia of turtles. New Jersey: T.F.H, 1979. p. 326.

RIBEIRO, E. B.; BASTOS, L. S.; GALENO, L. S.; MENDES, R. S.; GARINO JR, F.; CARVALHO-NETA, R. N. F.; COSTA, F. N. Integrated assessment of biomarker responses and microbiological analysis of oysters from São Luís Island, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 113, n. 1–2, p. 182–186, 2016.

ROCHA, M. B.; MOLINA, F. B. Algumas observações sobre a biologia e manejo do muçua. **Aquacultura**, v. 2, p. 25-26, 1987.

ROCHA, M. B.; MOLINA, F. B. Reproductive biology of *Kinosternon scorpioides* (Testudines: Kinosternidae) in captivity. **Tortoises and Turtles**. 1990.

RÜDIGER, H. W. Biomonitoring in occupational medicine. In: MARQUART, H.; SCHÄFER, S. G.; MCCLELLAN, R.; WELSCH, F. (eds.). **Toxicology**. San Diego: Academic Press; 1999. p.1027-39.

RYAN, P. B.; BURKE, T. A.; HUBAL, E. A. C.; CURA, J. J.; MCKONE, T. E. Using biomarkers to inform cumulative risk assessment, **Environmental Health Perspectives**, v. 155, n. 5, p. 833840, 2007.

SANTOS, G. S. **Biomonitoramento das baías de Guanabara e Paranaguá através de biomarcadores de contaminação ambiental**. 2013. 120 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, Setor de Ciências Biológicas, Paraná, 2013.

SILVA, M. I. A. **Alterações hematológicas e bioquímicas em uma população de *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) em resposta a estressores ambientais**. 2011.

127p. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Programa de Pós-Graduação em Genética, São José do Rio Preto, 2011.

SILVA, M. I. A. **Estudo das alterações bioquímicas em sangue e diferentes órgãos de *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) (Testudines: Chelidae) coletados em ambiente contaminado ou expostos ao benzo[a]pireno.** 2015. 115 p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, 2015.

SILVA, M. I. A.; SILVA, T. L.; ALMEIDA, E. A. Study of biochemical changes in blood and various organs of *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) (Testudines: Chelidae) collected in contaminated environment or exposed to benzo[a]pyrene. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 1: gmr. 15018568, 2016.

SOUSA, D. B. P.; NETA, R. N. F. C. Micronucleus frequency and hematologic index in *Colossoma macropomum* (Pisces, Ariidae) for environmental impact assessment at a protected area in Brazil. **AIP Conference Proceedings**, v. 1618, n. September, p. 606–608, 2014.

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

UCHÔA, I. S.; MAGALHÃES, M. A. V. Teste de Micronúcleo um importante Biomarcador Celular. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 2, p. 3851-3857, 2020.

UETZ, P.; FREED, P.; AGUILAR, R.; HOSEK, J. (eds.) (2022). The Reptile Database. Disponível em: <http://www.reptile-database.org>. Acesso em: 30 de ago. 2022.

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

VENÂNCIO, L. P. R. **Cágado-de-barbelas (*Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812), Testudines: Chelidae) como modelo para a ecotoxicologia evolutiva: relacionamento entre contaminação ambiental e, condição e variabilidade genética.** 2012. 169 p. Tese (Doutorado em Genética) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, São José do Rio Preto, 2012.

VENTURA, E. C.; GAELZER, L. R.; ZANETTE, J.; MARQUES, M. R.; BAINY, A. C. Biochemical indicators of contaminant exposure in spotted pigfish (*Orthopristis ruber*) caught at three bays of Rio de Janeiro coast. **Marine Environmental Research**, v. 54, n. 3–5, p. 775–779, 2002.

VIANA, D. C.; RUI, L. A.; MIGLINO, M. A.; ARAÚJO, L. P. F.; OLIVEIRA, A. S.; SOUSA, A. L. Morphological study of epididymides the scorpion mud turtle in natural habitat (*Kinosternon scorpioides* – Linnaeus, 1766). **Biotemas**, v. 26, n. 2, p. 153-162, 2013.

VIARENGO, A.; LOWE, D.; BOLOGNESI, C.; FABBRI, E.; KOEHLER, A. The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 146, p. 281-300, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY (IPCS) – **Environmental Health Criteria 155: Biomarkers and risk assessment: concepts and principles.** Geneva, 1993.

YOSHIDA, E. T. E. Avaliação da influência da ingestão de lixo plástico nos indicadores de estresse oxidativo no sangue de tartarugas verdes (*Chelonia mydas*). 2012. 59 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de PósGraduação em Ecologia, Florianópolis, 2012.

CAPÍTULO 2

Respostas bioquímicas em *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1766) (Testudines: Kinosternidae) como indicadores de impacto ambiental em uma área protegida na Amazônia maranhense, Sítio Ramsar Brasileiro²

²Artigo Científico a ser submetido à **Revista Chemosphere**, Qualis A1 e já se encontra nas normas do periódico (Anexo B).

Respostas bioquímicas em *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1766) (Testudines: Kinosternidae) como indicadores de impacto ambiental em uma área protegida na Amazônia maranhense, Sítio Ramsar Brasileiro

Carlos A. L. Rodrigues^a, Almerinda M. Medeiros^b, Wanda B. Jesus^b, Suelen R. S. de Oliveira^b, Paulo A. Menezes^c, Danilo F. C. Lopes^d, Raimunda N. F. Carvalho-Neta^c, Débora Batista Pinheiro-Sousa^f, Alana L. de Sousa^a

- ^a Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGCA), Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), CEP 65055-970, São Luís, MA, Brasil.
- ^b Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE (PPG-BIONORTE), Universidade Estadual do Maranhão, CEP 65055-970, São Luís, MA, Brasil.
- ^c Engenheiro de Pesca, Universidade Federal do Maranhão (UFMA), Universidade Federal do Maranhão, Campus Pinheiro, CEP 65200-000, Pinheiro, MA, Brasil.
- ^d Docente do Curso de Engenharia de Transportes, Universidade Federal do Maranhão (UFMA), Campus Pinheiro, CEP 65080-805, Pinheiro, MA, Brasil.
- ^e Departamento de Biologia, Universidade Estadual do Maranhão, CEP 65055-970, São Luís, MA, Brasil.
- ^f Coordenação de Engenharia Ambiental, Universidade Federal do Maranhão (UFMA), Campus Balsas, CEP 65800-000, Balsas, MA, Brasil.

RESUMO

Espécies de quelônios são conhecidas por estarem constantemente expostas à contaminação ambiental. A avaliação da saúde das populações de tartarugas amazônicas é primordial porque são animais habitualmente usados como fonte proteica pelas comunidades ribeirinhas da região amazônica maranhense. O presente estudo analisou respostas bioquímicas de Glutathione S-Transferase e Catalase em *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1766) (Testudines: Kinosternidae) como biomarcadores de impacto ambiental em uma área protegida na Amazônia maranhense, Sítio Ramsar Brasileiro. Analisamos alterações nas atividades das enzimas presentes no sangue de 106 espécimes de *K. scorpioides* capturados em área urbanizada (A1), vegetada (A2) e criadouro científico (A3). Desse modo, nosso

estudo gerou dados pioneiros sobre o uso de biomarcadores em uma espécie de tartaruga de água doce de região amazônica e criadouro. O sexo não interferiu nas respostas bioquímicas dos animais. A ocorrência de correlações lineares positivas da biometria e atividades de GST e CAT foram evidentes. Em indivíduos de criadouro, a concentração da GST foi superior àqueles *in situ*, não constatando diferenças estatísticas entre as atividades nos animais de área urbanizada e vegetada. O ambiente e período sazonal influenciaram simultaneamente nas atividades das enzimas. Nosso estudo gerou dados pioneiros sobre o uso de biomarcadores em uma tartaruga de água doce da região amazônica, fornecendo uma síntese geral das respostas bioquímicas, que podem ser úteis em ensaios ecotoxicológicos futuros com outras espécies de quelônios amazônicos. Além disso, os dados fornecem informações biológicas e ambientais para os órgãos gestores e fiscalizadores que elaboram políticas públicas para a conservação de tartarugas, garantindo assim a saúde das pessoas que consomem esses animais. Essas respostas biológicas mostram novas evidências da correlação entre enzimas e tipos de ambientes e estações climáticas nos animais da Baixada Maranhense, uma Unidade de Conservação de Uso Sustentável no Maranhão.

Palavras-chave: Baixada Maranhense, biomarcadores, enzimas, tartaruga-do-lodo.

1. Introdução

A Baixada Maranhense é uma Área de Proteção Ambiental (APA) localizada na Amazônia Oriental do Maranhão. Foi reconhecida e incluída na Lista Ramsar em 29 de fevereiro de 2000 (MMA, 2000). Corresponde a um dos Sítios Ramsar Brasileiros mais importantes do Brasil, sendo uma das áreas que fazem parte do Plano Estratégico Nacional de Áreas Protegidas (PNAP) aprovado pelo Decreto n.º 5.758/06, e também é uma zona úmida de importância internacional. A APA compõe a Amazônia Legal, que é composta pelos Estados do norte do Brasil (Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins), centro-oeste (Mato Grosso) e nordeste (parte do Maranhão) (IBGE, 2021).

No Brasil, considera-se como Sítio Ramsar, zonas úmidas preservadas, rica em biodiversidade, com importância ecológica de reconhecimento e validade internacional, sendo aspectos fundamentais a serem considerados para a valorização dessas áreas. Os atributos ecológicos conferidos a essas regiões devem ser preservados com o intuito de garantir suas funções e serviços ambientais (ICMBio, 2021).

A espécie *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1766), é um quelônio amazônico conhecido pelos maranhenses como “jurarã”. Ele distribui-se em uma variedade de países, incluindo a Colômbia, Panamá, Costa Rica, Nicarágua, Honduras, El Salvador, bem como Estados brasileiros como Maranhão, Pará, Minas Gerais, Amazonas, Alagoas e Ceará (Berry e Iverson, 2011). No Maranhão, é encontrado em municípios que abrangem a APA da Baixada Maranhense que incluem Pinheiro, São Bento, São João Batista, Cajari, e outros (Cabrera e Colantonio, 1997; Berry e Iverson, 2011; IUCN, 2012; Rodrigues et al., 2017).

A aplicação de biomarcadores na fauna aquática é fundamental porque fornece informações sobre os níveis de resposta biológica dos animais à poluição ambiental. Neste contexto, os dados apresentados são positivos e podem ajudar a elaborar políticas ambientais que melhorem os ecossistemas, principalmente na APA da Baixada Maranhense.

O uso do solo, o descarte de resíduos químicos e orgânicos, as pastagens e as queimadas aumentam a degradação da APA, afetando a flora e fauna local. Além disso, é importante enfatizar os efeitos nocivos de estressores físicos, químicos e/ou biológicos, especialmente aqueles que podem causar danos permanentes aos organismos aquáticos.

Espécies de quelônios amazônicos são conhecidas, como *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758), *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz, 1829) e *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812), por estarem constantemente expostas a poluentes químicos, industriais e antrópicos em seus habitats naturais (Labrada-Martagón, 2011; Herrera e Baena, 2017). Assim, pesquisas têm sido conduzidas no Brasil com o intuito de avaliar a qualidade dos

ecossistemas e com foco na utilização de técnicas bioquímicas e mutagênicas que empregam enzimas Catalase (CAT) e Glutathione S-Transferase (GST) e teste de micronúcleos para analisar a exposição das espécies a agentes tóxicos. A maioria dos estudos foi realizada com espécies da ictiofauna brasileira (Freire et al., 2008; Bueno et al., 2017).

Sobre as enzimas, a GST é um biomarcador de suscetibilidade que desempenha um papel importante na detoxificação de componentes endobióticos e xenobióticos essenciais, bem como na catalisação e conjugação com outras moléculas. Além disso, a GST atua na catálise e conjugação de compostos eletrofílicos com o tripeptídeo Glutathione Reduzida - GSH (Huggett et al., 1992; Chelvanayagam et al., 2001). Por outro lado, a CAT compõe um conjunto de enzimas capazes de auxiliar as células na inibição de Espécies Reativas de Oxigênio - EROs, atuando na catálise, convertendo o Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio (Belo e Souza, 2002). É uma enzima antioxidante que atua na decomposição do H_2O_2 quando produzidos em grandes quantidades nos processos de biotransformação nos peroxissomos, sendo considerada uma importante enzima já encontrada em vertebrados (Ventura et al., 2002).

Os testes de ecotoxicidade com o uso de biomarcadores bioquímicos, como os citados acima, são essenciais para avaliar não apenas a saúde dos animais, mas também a contaminação global dos ecossistemas. Eles podem detectar várias fontes de poluição, como efluentes agrícolas, domésticos, industriais, químicos, medicamentos e outros, que agredem diretamente os corpos hídricos e consequentemente a saúde da fauna aquática (Lombardi, 2004).

Kinosternon scorpioides é classificado na categoria de ameaça "Menos Preocupante – LC" pelo Sistema de Avaliação do Risco de Extinção – SALVE (ICMBio, 2023). Assim, diante das constantes ameaças aos quelônios, é imperativo desenvolver técnicas de conservação e proteção da fauna que usem biomarcadores bioquímicos integrados aos parâmetros ambientais. Essas técnicas permitirão uma análise profunda do assunto. A

utilização de enzimas para avaliar as respostas bioquímicas é essencial porque servem como ferramentas de controle e vigilância ao nível ambiental, que podem ser usadas a curto, médio e longo prazo para identificar impactos nos ecossistemas (Magalhães e Filho, 2008).

A espécie *K. scorpioides* foi escolhida como biomonitor principalmente porque é um animal comumente usado como fonte de proteína pelas comunidades ribeirinhas da região amazônica maranhense, tem dimorfismo sexual aparente e é a única espécie registrada na APA entre as 22 descritas para o gênero *Kinosternon* (Spix, 1824) (Rodrigues et al., 2022). Assim, as informações sobre os biomarcadores bioquímicos estão alinhadas com as descrições iniciais do táxon *in situ* e de criadouro. Logo, o objetivo deste estudo foi analisar respostas bioquímicas de Glutathione S-Transferase e Catalase em *K. scorpioides* (Testudines: Kinosternidae) como biomarcadores de impacto ambiental em uma área protegida na Amazônia maranhense, Sítio Ramsar Brasileiro.

2. Material e Métodos

2.1. Área de estudo

As áreas selecionadas localizam-se na extensão da APA da Baixada Maranhense, Amazônia maranhense, Estado do Maranhão, nordeste brasileiro. Para melhor caracterização dos dados, agrupamos os pontos de coleta em três grandes áreas diferenciadas, sendo elas A1 = área urbanizada, A2 = área vegetada (Região Protegida - Baixada Maranhense) e A3 = criadouro científico para *K. scorpioides* (localizado na Universidade Estadual do Maranhão - UEMA), grupo controle deste estudo (Fig. 1 e Tabela 1).

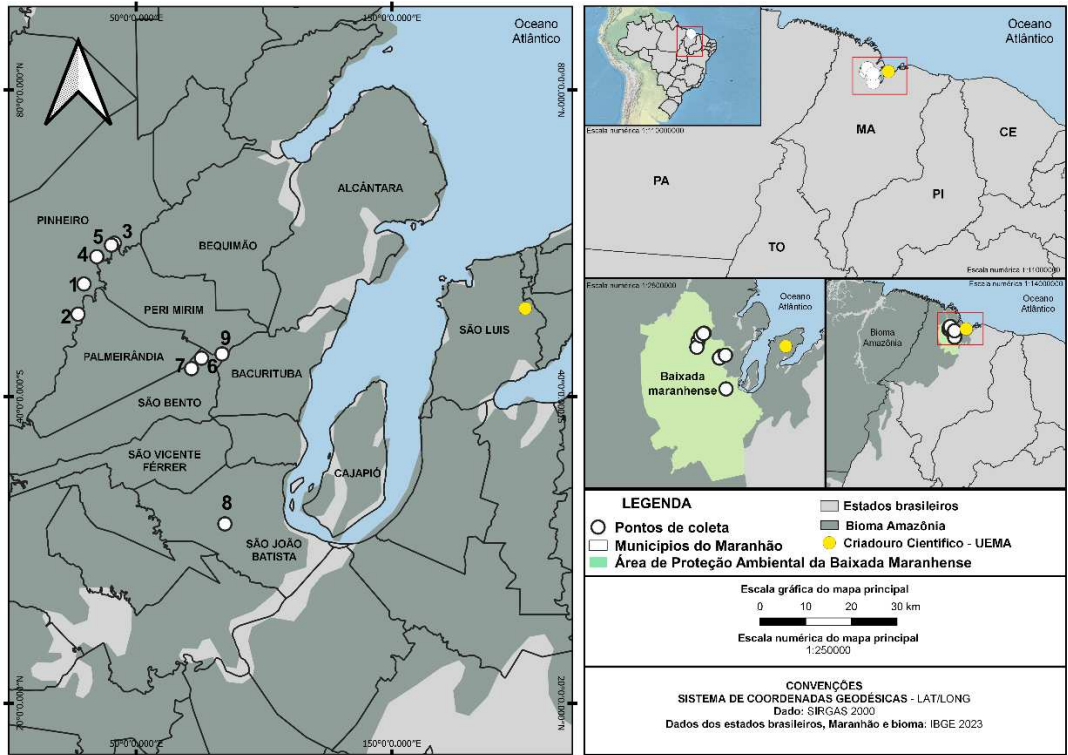


Fig.1. Mapa das áreas com localização dos pontos de captura dos animais agrupados em A1 = área urbanizada) e A2 = área vegetada dos municípios de Pinheiro, São Bento e São João Batista, na APA da Baixada Maranhense, Maranhão, Brasil e A3 = criadouro científico.

Tabela 1

Georreferenciamento dos pontos de amostragem na Baixada Maranhense e Criadouro (UEMA), Maranhão, Brasil.

Pontos	Cidade	Ambiente	Local	Coordenadas geográficas	
				S	W
1 (A1)	Pinheiro	Urbanizada	Maria Santa	2°32'5"	45°4'19"
2 (A2)	Pinheiro	Vegetada	Alto Pericumã	2°35'38"	45°5'1"
3 (A1)	Pinheiro	Urbanizada	Comporta	2°27'16"	45°0'44"
4 (A2)	Pinheiro	Vegetada	Baixo Pericumã	2°28'51"	45°2'48"
5 (A2)	Pinheiro	Vegetada	Médio Pericumã	2°27'29"	45°1'5"
6 (A2)	São Bento	Vegetada	Campo do Chagas	2°40'49"	44°50'26"
7 (A1)	São Bento	Urbanizada	Campo do Alegre	2°42'3"	44°51'37"
8 (A2)	São Bento	Vegetada	Defunto	2°40'20"	44°48'1"
9 (A2)	São J. Batista	Vegetada	Pução do Meio	3°0'22"	44°47'41"
10 (A3)	São Luís	Grupo Controle	Criadouro Científico	2°34'56.255"	44°12'28.033"

2.2. Caracterização do criadouro e manejo dos animais

O grupo controle, identificado como A3, é formado pelos espécimes de *K. scorpioides* do criadouro científico, situado no Campus Paulo VI da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), licenciado pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA (n.º 1899339/2008/IBAMA), sendo mantidos sob monitoramento diário 79 animais (24 machos e 55 fêmeas). O espaço possui extensão de 159,92 m², composto de cinco baias de paredes teladas em ferro galvanizado, incluindo o teto. Cada baia apresenta 13,94 m², sendo parte de uma área construída de aproximadamente 91 m², tendo ainda uma região livre com 68 m² e um tanque de alvenaria revestido em cerâmica, rampa de acesso aos animais, água disponível e drenagem. Internamente ao recinto, há árvores, cascalho, areia e ampla área aberta com ventilação natural de modo a permitir uma ambiência próxima ao habitat natural. Os animais adultos são manejados em dias alternados para a renovação da água dos tanques, alimentados e acompanhados continuamente quanto a sua sanidade. Eles apresentam marcação individual e são alimentados com ração balanceada, com proteína de peixe e enriquecida com vitaminas e minerais, com frequência de uma vez ao dia, preferencialmente pela manhã. Durante os procedimentos de higienização do recinto, evitou-se utilizar produtos de limpeza e todos os animais foram retirados das baias para esse fim.

2.3. Captura dos animais e obtenção de amostra biológica *in situ*

O manejo dos animais e a coleta de amostra biológica foram feitos cuidadosamente de modo a evitar o estresse para não comprometer os resultados. Para isso, considerou-se todos os aspectos éticos e legais referentes aos protocolos e procedimentos propostos pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual do Maranhão (CEEa/UEMA), protocolo n.º 10/2021 (Anexo C). O estudo possuiu permissão via licenciamento do Sistema de Informação e Autorização em Biodiversidade – SISBIO para coleta de animais *in situ*, registro n.º 85805-1 (Anexo D).

Capturamos espécimes adultos de *K. scorpioides* em ambiente natural (Tabela 2) com auxílio de armadilha de pesca artesanal circular do tipo covo (*hoop traps*) com aros metálicos que sustentam uma rede de náilon ou metal em seu entorno (Bernhard et al., 2016), entre os meses de agosto e outubro/2021, abril, julho, outubro e dezembro/2022 e março/2023 para coleta de amostra sanguínea e aferição das medidas biométricas. Além disso, eles foram marcados por meio de método tradicional de marcação de quelônios a partir de cortes nos escudos marginais da carapaça com codificação numérica estabelecida a partir dos cortes nos escudos marginais da carapaça com cada escudo recebendo até duas numerações (Cagle, 1939). Esse método foi seguido como forma de controle de possíveis recapturas. Após isso, foram devolvidos ao ambiente. Realizou-se duas coletas semestrais em diferentes estações climáticas (períodos estiagem e chuvoso). Segundo o Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), no Maranhão as 4 estações climáticas não são bem definidas, sendo caracterizadas em dois períodos: estiagem e chuvoso.

Tabela 2

Descrição do número amostral (N) dos animais (macho e fêmea) correspondentes aos grupos A1 e A2 na Amazônia maranhense e A3 (criadouro científico) capturados entre os meses de agosto e outubro/2021; abril, junho, outubro e dezembro/2022 e março/2023 nos períodos de estiagem e chuvoso.

Sexo	Grupos			Total
	A1 (N=33)	A2 (N=50)	A3 (N=23)	
Macho	12 (36,37%)	24 (48,00%)	11 (47,83%)	47 (44,34%)
Fêmea	21 (63,63%)	26 (52,00%)	12 (52,17%)	59 (55,66%)
Total				106 (100%)

Durante as coletas, ainda em campo, aferiu-se medidas corporais dos animais, considerando o Comprimento de Carapaça (CC), Comprimento do Plastrão (CP), Largura de Carapaça (LC), Largura do Plastrão (LP), peso, altura e identificação do sexo (Legler, 1990). Aferiu-se a biometria com auxílio de paquímetro digital de precisão 1 milímetro. Esses procedimentos foram realizados rotineiramente durante a captura dos espécimes nos locais de coleta. Para análise bioquímica, 2 mL de sangue foi coletado com auxílio de seringa

com agulha hipodérmica, 3 mL de calibre 22 mm na região occipital da cabeça, estando o animal com a musculatura relaxada. O sangue foi armazenado em tubos com heparina, identificados e congelados em freezer.

2.4. Parâmetros ambientais da água e solo

Verificou-se em campo, variáveis abióticas da água: pH, temperatura (T) e oxigênio dissolvido (OD) com auxílio de Medidor Multiparâmetro AK88[®]. Além disso, de modo a complementar os resultados das análises bioquímicas e genéticas com os biomarcadores, amostras de solo dos pontos foram coletadas para verificação granulométrica (silte, argila e areia) e química completa, com leitura das seguintes variáveis: potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), alumínio (Al), H + Alumínio (H + Al), saturação por bases (SB), capacidade de troca catiônica (CTC) e micronutrientes como ferro (Fe), manganês (Mn), cobre (Cu) e zinco (Zn), além de matéria orgânica (MO). Essas análises foram necessárias, pois complementaram os resultados dos biomarcadores ao nível ambiental. As aferições de todos os parâmetros, incluindo os de água e solo, ocorreram nos períodos estiagem e chuvoso. Para obtenção do solo e maior precisão nas análises, coletou-se 5 amostras em cada ponto amostral seguindo um formato zigue-zague com auxílio de um trado manual numa profundidade de 20 cm no solo. Após isso, misturou-se todas as amostras para a produção de uma mistura homogênea final única. 600 g dessa mistura foi considerada representativa do local conforme metodologia proposta por Martinhão e Lobato (2004). Em seguida, ela foi armazenada em saco plástico em temperatura ambiente, fechada, identificada e encaminhadas para análise conforme recomendações de laboratório especializado.

2.5. Análise das enzimas Catalase e da Glutathione S-Transferase

Nos procedimentos bioquímicos, diluiu-se em água MilliQ, alíquotas de sangue na proporção de 1:5. Determinou-se a atividade da catalase a partir da decomposição do Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2 10 mM) em espectrofotômetro (UV-M51, UV – Visible Spectrophotometer Bel Engineering[®]) com absorvância de 240 nm em 120 segundos

através da enzima presente na amostra, expressa em U/mg prot conforme Aebi (1984) e Silva (2011) com adaptações para a espécie *K. scorpioides* (Anexo F). A atividade da GST foi determinada também em espectrofotômetro em absorbância de 340 nm em 120 segundos, expressa em U/mg prot de acordo com Aebi (1984) com adaptações. Utilizou-se GSH e 1 Cloro-2-4 di-nitrobenzeno (CDNB 100 mM) como substrato. Esse método se baseia na reação do CDNB ao grupo -SH de Glutathiona Reduzida catalisada e pela GST. A quantificação de proteínas totais foi determinada considerando o método de coloração do biureto e albumina (Proteínas Totais Monorreagente 250 mL - Bioclin®) com padronização de leitura em espectrofotômetro em 545 nm em 10 segundos seguindo protocolo do fabricante.

2.6. Análise estatística

As relações entre as atividades de CAT e GST e as variáveis biométricas foram testadas pela Análise de Componentes Principais (PCA) e para verificação do padrão de relação entre as atividades enzimáticas com o sexo, período sazonal e os ambientes foi utilizada a Análise de Variância Main-effects. Previamente, foram testados os pressupostos de homogeneidade de variâncias (Teste de Levene) e normalidade dos dados (Teste de Shapiro-Wilk). Como pós-técnica, empregou-se os testes de Tukey (amostras com variâncias presumidas) e Games-Howell (amostras de variâncias não presumidas). Para avaliar os possíveis efeitos de interação entre as médias das atividades enzimáticas em função do período e ambiente, realizou-se o teste de Análise de Variância Fatorial (ANOVA fatorial). Os mesmos pressupostos do teste acima também foram testados. Comparações entre as médias das variáveis abióticas do solo e da água em função do tipo de ambiente (A1 e A2) foram realizadas pelo teste de MANOVA. Organizou-se os dados em tabelas e/ou gráficos descritivos para melhor visualização e interpretação a partir dos softwares estatísticos SPSS v. 23 e Statistica v. 7.0, com um nível de significância de 5% ($p < 0,05$) nas análises.

3. Resultados

3.1. Biometria dos animais

As áreas A1 e A2 compõem a Baixada Maranhense e apresentam características diversificadas. A1 apresenta pontos localizados dentro do perímetro urbano dos municípios de coleta, com residências em seu entorno e visíveis impactos antrópicos nos corpos hídricos e no solo, com despejo de resíduos sólidos e intensas atividades agropecuárias com a criação de bubalinos, porcos e/ou outros animais. A2 refere-se a zonas vegetadas, adjacentes ao perímetro urbano das cidades, afastadas a uma distância de 9-18km das cidades e apresenta uma ampla vegetação que caracterizam a flora típica da Baixada Maranhense.

A estatística sumária dos parâmetros biométricos dos animais dos pontos de coleta e sexo estão descritos na Tabela 3. A2 apresentou as aferições da biometria superiores, com exceção da LP, cujo maior valor médio e desvio padrão foi de $7,77 \pm 0,92$ cm em A1, $7,74 \pm 0,86$ cm em A2 e $7,37 \pm 1,39$ cm em A3. Separando-se a biometria em relação ao sexo em cada ponto amostral, as fêmeas do grupo A3 obtiveram as maiores médias.

Tabela 3

Estatística sumária das variáveis biométricas (cm) por sexo e ponto de coleta dos espécimes de *K. scorpioides* amostrados entre os meses de agosto e outubro/2021; abril, junho, outubro e dezembro/2022 e março/2023 nos períodos de estiagem e chuvoso nas áreas A1 e A2 na Baixada Maranhense e A3 (criadouro científico).

Sexo	Ponto/Variável	Pontos de coleta								
		A3			A1			A2		
		N = 12			N = 21			N = 26		
		Média ± DP	Máximo	Mínimo	Média ± DP	Máximo	Mínimo	Média ± DP	Máximo	Mínimo
Fêmea	CC	14,13 ± 1,40	16,50	12,70	13,68 ± 1,15	15,50	11,40	14,64 ± 1,30	17,70	12,00
	LC	9,60 ± 0,45	10,50	9,20	9,30 ± 1,42	13,50	7,60	9,67 ± 0,99	11,70	7,60
	CP	13,33 ± 1,43	16,00	12,00	12,43 ± 1,62	15,00	8,00	13,28 ± 2,36	17,00	3,00
	LP	7,37 ± 1,39	9,50	5,70	7,77 ± 0,92	9,60	6,00	7,74 ± 0,86	9,00	6,30
	Alt	5,04 ± 0,45	5,70	4,20	4,98 ± 0,42	5,80	4,20	5,43 ± 0,66	6,80	4,10
	Peso (g)	418,33 ± 108,61	615	310	344,48 ± 67,68	455	234	441,73 ± 125,11	770	215
Macho		N = 11			N = 12			N = 24		
	CC	13,72 ± 0,90	14,50	11,40	14,27 ± 0,80	15,40	13,20	14,96 ± 1,63	17,70	11,20
	LC	8,99 ± 0,32	9,50	8,30	9,00 ± 1,19	12,50	7,90	9,26 ± 0,78	11,10	7,60
	CP	12,10 ± 0,68	13,00	11,00	12,35 ± 1,33	14,00	9,00	13,01 ± 1,39	15,00	10,00
	LP	6,21 ± 0,44	6,70	5,50	7,49 ± 0,62	8,30	6,40	7,09 ± 0,88	8,70	5,50
	Alt	4,46 ± 0,22	5,00	4,20	4,58 ± 0,52	5,80	3,90	4,95 ± 0,42	5,70	4,10
	Peso (g)	304,55 ± 44,19	375	225	344,58 ± 44,95	415	290	375,42 ± 104,88	545	165

N = Número Amostral; CC = Comprimento da Carapaça, LC = Largura da Carapaça; CP = Comprimento do Plastrão; LP = Largura do Plastrão; Alt = Altura do Espécime e Peso = Peso do Espécime.

3.2. Parâmetros ambientais da água e solo

Os parâmetros físico-químicos da água e solo dos ambientes podem ser visualizados na Tabela 3. Em A1 foram observadas médias elevadas de OD, pH e temperatura. Os valores de OD foram maiores em período de estiagem para os dois ambientes ($4,24 \pm 1,41$ e $3,71 \pm 1,86$, A1 e A2 respectivamente). O pH apresentou média superior em A1 ($6,28 \pm 0,82$) na estiagem, enquanto em A2 essa variável foi superior no período chuvoso ($6,70 \pm 0,82$) (Tabela 4). Apesar da estatística descritiva demonstrar maiores médias dos parâmetros ambientais da água em A1, essas diferenças não foram significativas (Wilks lambda = 0,93136; $F(3, 17) = 0,41761$; $p = 0,74264$). Dessa forma, OD, pH e temperatura não variaram estatisticamente entre os dois ambiente ao longo do estudo.

Conforme a Tabela 4, no solo, considerando-se apenas o tipo de ambiente, os elementos K, Ca, Mg e SB registraram concentrações superiores em A1. Enquanto Alumínio, H + Al e CTC mostraram maiores médias em A2. No que se refere aos níveis de MO, verificamos altos valores em solos de A2 (média de 29,16 g/kg) quando comparados a A1 (média de 15,95 g/kg). Os teores elevados de MO em A2 gerou valores de CTC (21,94 a 47,93 $\text{cmol}_c/\text{dm}^3$) também superiores. A CTC em A1 variou de 7,82 a 21,38 $\text{cmol}_c/\text{dm}^3$. Nos solos, conforme o período, os maiores valores foram verificados para CTC no período de estiagem em A1 e A2 ($17,07 \pm 8,02$ e $29,94 \pm 1,26$ $\text{cmol}_c/\text{dm}^3$, respectivamente). Quanto aos demais parâmetros, o complexo H + Al apresentou concentração superior em período chuvoso em A2 ($20,53 \pm 3,89$ $\text{cmol}_c/\text{dm}^3$).

Entre os micronutrientes no solo, os valores médios de Mn, Cu e Zn foram superiores em A2 (Tabela 4). Enquanto o Fe e S apresentaram médias elevadas em A1. Na descrição por período, os maiores índices ocorreram na concentração de Fe em A1 e A2 ($587,47 \pm 369,70$ mg/dm^3 e $622,15 \pm 363,61$ mg/dm^3 , respectivamente). Dados de média e desvio padrão demonstram valores elevados em amostras de solo de A2 na estiagem (Tabela 4).

Na granulometria, em A1, a média foi superior para areia ($453,67 \pm 206,00$), enquanto em A2, os valores de silte e argila foram elevados. No período chuvoso, em A2, essas texturas apresentaram altas concentrações (Tabela 4).

Quando se analisou diferenças entre as médias dos elementos do solo, o teste de MANOVA demonstrou que essas diferenças são devidas ao acaso (Wilks lambda = 0,11788; $F(7, 3) = 3,2072$; $p = 0,18340$), ou seja, a média dos elementos aferidos no solo são estatisticamente iguais entre A1 e A2. Os micronutrientes também não apresentaram diferenças significativas entre os grupos A1 e A2 (Wilks lambda = 0,53853; $F(5, 6) = 1,0283$; $p = 0,47703$). Ademais, não foram observadas diferenças estatísticas na granulometria para os dois ambientes (Wilks lambda = 0,682; $F(2,9) = 2,095$; $p = 0,179$) (Tabela 4).

Tabela 4

Variáveis físico-químicas da água; concentrações dos elementos químicos, de micronutrientes e granulométricas dos solos correspondentes ao habitat dos exemplares de *K. scorpioides* na Baixada Maranhense, coletadas nos meses de agosto e outubro/2021; abril, junho, outubro e dezembro/2022 e março/2023 nos períodos de estiagem e chuvoso na Baixada Maranhense (A1 e A2).

Variáveis abióticas		A1		A2	
		Estiagem	Chuvoso	Estiagem	Chuvoso
OD (mg/L)	Mínimo	2,60	2,50	0,80	0,30
	Máximo	6,00	4,30	6,90	3,10
	Média $\pm$ DP	$4,24 \pm 1,41^*$	$3,40 \pm 1,27^*$	$3,71 \pm 1,86^*$	$2,20 \pm 1,28^*$
pH	Mínimo	5,60	6,00	3,70	5,70
	Máximo	7,70	6,30	7,20	7,70
	Média $\pm$ DP	$6,28 \pm 0,82$	$6,15 \pm 0,21$	$5,79 \pm 0,94$	$6,70 \pm 0,82$
Temperatura ($^{\circ}$ C)	Mínimo	28,95	28,20	27,30	28,20
	Máximo	30,40	29,00	30,80	30,40
	Média $\pm$ DP	$29,60 \pm 0,64$	$28,60 \pm 0,57$	$28,87 \pm 1,26$	$29,30 \pm 0,91$
Elementos*					
K	Mínimo	0,21	-	0,04	0,09
	Máximo	0,87	-	0,81	0,75
	Média $\pm$ DP	$0,48 \pm 0,35^a$	-	$0,47 \pm 0,29^a$	$0,34 \pm 0,36^a$
Ca	Mínimo	1,19	-	1,17	0,31
	Máximo	6,66	-	5,93	7,59
	Média $\pm$ DP	$3,89 \pm 2,74^b$	-	$3,86 \pm 1,58^b$	$2,81 \pm 4,14^b$
Mg	Mínimo	2,82	-	1,90	0,73
	Máximo	6,50	-	7,59	5,60
	Média $\pm$ DP	$4,76 \pm 1,85^c$	-	$5,62 \pm 2,00^c$	$2,73 \pm 2,55^c$

Al	Mínimo	0,17	-	2,33	2,13
	Máximo	1,69	-	26,58	9,64
	Média ± DP	0,80 ± 0,79	-	6,79 ± 9,71	6,69 ± 4,01
H + Al	Mínimo	3,59	-	13,09	16,36
	Máximo	12,88	-	35,94	24,05
	Média ± DP	7,94 ± 4,67 ^d	-	19,99 ± 8,04 ^d	20,53 ± 3,89 ^d
SB	Mínimo	4,22	-	3,30	1,10
	Máximo	14,00	-	12,90	13,90
	Média ± DP	9,12 ± 4,89 ^e	-	9,91 ± 3,50 ^e	5,87 ± 6,99 ^e
CTC	Mínimo	7,82	-	21,90	22,30
	Máximo	22,01	-	47,90	30,30
	Média ± DP	17,07 ± 8,02 ^f	-	29,94 ± 1,26 ^f	26,42 ± 4,00 ^f
Micronutrientes					
Ferro	Mínimo	270,23	-	274,75	151,21
	Máximo	993,47	-	1131,20	853,32
	Média ± DP	587,47 ± 369,70	-	622,15 ± 363,61	416,11 ± 381,46
Manganês	Mínimo	7,68	-	30,04	7,08
	Máximo	35,65	-	134,67	47,01
	Média ± DP	23,72 ± 14,43	-	72,55 ± 37,92	21,54 ± 22,13
Cobre	Mínimo	0,27	-	0,48	0,42
	Máximo	0,83	-	1,18	0,83
	Média ± DP	0,63 ± 0,31	-	0,80 ± 0,25	0,65 ± 0,21
Enxofre	Mínimo	102,75	-	102,75	2,92
	Máximo	188,80	-	199,37	79,95
	Média ± DP	158,07 ± 48,01	-	136,80 ± 40,44	35,31 ± 39,95
Zinco	Mínimo	1,14	-	2,32	1,49
	Máximo	3,87	-	7,92	8,58
	Média ± DP	2,48 ± 1,37	-	5,29 ± 2,21	4,08 ± 3,91
Granulometria					
Areia	Mínimo	248,00	-	110,00	170,00
	Máximo	660,00	-	540,00	236,00
	Média ± DP	453,67 ± 206,00	-	275,33 ± 148,93	197,33 ± 34,43
Silte	Mínimo	140,00	-	110,00	234,00
	Máximo	222,00	-	505,00	384,00
	Média ± DP	176,33 ± 41,79	-	249,67 ± 155,87	306,00 ± 75,18
Argila	Mínimo	200,00	-	330,00	380,00
	Máximo	530,00	-	750,00	580,00
	Média ± DP	370,00 ± 165,23	-	475,00 ± 174,79	496,67 ± 104,08

*Para valores fora do padrão legislativo ambiental brasileiro (CONAMA), Resolução n.º 357/2005 e n.º 430/2011 (Valores de referência para água: OD > 5,0; pH 6,0 a 9,0; Temperatura < 40°C). Classe de interpretação de teores em solo para K: muito baixo (0-30), ^abaixo (31-60), médio (61-120), alto (121-235) e muito alto (>235). Ca: baixo <1,5, ^bmédio 1,5-4,0, alto >4,0. Mg: baixo <0,5, médio 0,5-1,0, ^calto >1,0. H+Al: baixo <2,5, médio 2,5-5,0, ^dalto >5,0. SB: baixo <2,0, médio 2,0-5,0, ^ealto >5,0. CTC: baixo <4,5, médio 4,5-1,0, ^falto >10. Letras minúsculas diferentes indicam a categoria do nível de concentração do elemento químico nos solos dos pontos de coleta (p<0.05) conforme definido por Prezotti e Guaçoni (2013).

3.3. Parâmetros biológicos e atividade enzimática

A análise exploratória de possíveis correlações entre as atividades enzimáticas e variáveis biométricas dos animais, para o primeiro e segundo fator, demonstrou uma variação nos dados em 61,68%. Pôde-se verificar correlação linear positiva entre LC, altura e peso. Assim como entre CC, CP e LP. Ou seja, cada um desses grupos de variáveis biométricas aumentou seus valores diretamente (Fig. 2A). Por sua vez, encontramos correlações negativas entre a concentração de CAT e as medidas de LC, altura e peso, assim como entre GST e CC, CP e LP (Fig. 2A). Então, maiores atividades de CAT estão relacionadas a medidas menores de LC, altura e peso; e atividades de GST elevadas relacionam-se a menores tamanhos de CC, CP e LP.

Na análise de primeiro e terceiro fator, a técnica pode explicar 60,23% da variação dos dados (Fig. 2B). Existem correlações lineares positivas entre LP, LC e altura; entre peso, CC e CP; e entre as atividades enzimáticas CAT e GST. Dessa forma, esses valores aumentam diretamente entre si. Conjuntamente, há correlações lineares negativas entre as atividades de CAT, GST em relação à LC, LP e altura. Portanto, quanto maiores forem as atividades de CAT e GST, menores serão os valores de LC, LP e altura.

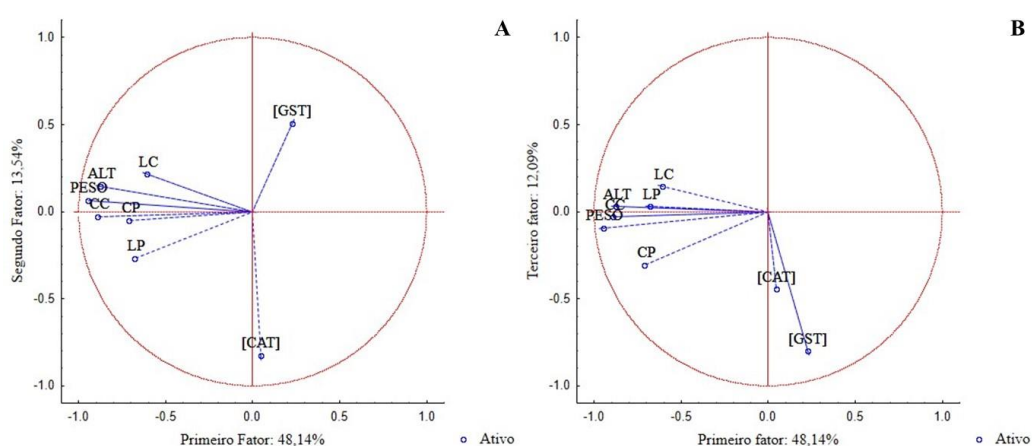


Fig. 2. - Análise de Componentes Principais entre as atividades enzimáticas e biometria para o primeiro e segundo fator (A) e primeiro e terceiro fator (B) em *K. scorpioides* de ambiente natural e criadouro. Onde: [CAT] = atividade de catalase; [GST] = atividade de Glutathione S-Transferase; CC = comprimento da carapaça; LC = largura da carapaça; CP = comprimento do plastrão; LP = largura do plastrão e Alt = altura.

Quando se comparou as médias das atividades enzimáticas nos animais considerando o tipo de ambiente, detectou-se diferenças estatisticamente significativas apenas para GST ($F(2, 101) = 17,000$; $p = 0,00000$) (Fig. 3). Os valores de CAT não foram estatisticamente significativos ($p = 0,97325$). Na pós-técnica de Tukey concluiu-se que em A3, a concentração de GST nos organismos foi superior àqueles *in situ*, não sendo observadas diferenças estatísticas na atividade dessa enzima entre animais dos grupos A1 e A2.

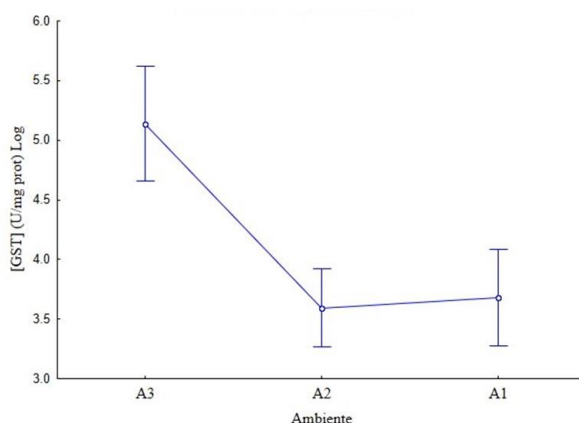


Fig. 3. Comparações entre as médias de concentração de Glutathiona S-Transferase (GST) em espécimes de *K. scorpioides* em função do tipo de ambiente (A1, A2 e A3).

Na comparação por período, tanto para CAT, quanto para GST detectou-se diferenças significativas nas médias ($F(1, 101) = 12,036$; $p = 0,00077$ e $F(1, 101) = 7,9732$; $p = 0,00572$, respectivamente) (Fig. 4A e 4B). Valores superiores foram registrados em época chuvosa, indicando que esse período pode influenciar nas atividades enzimáticas dos organismos. Além disso, não foram encontradas diferenças significativas por sexo ($p > 0,05$).

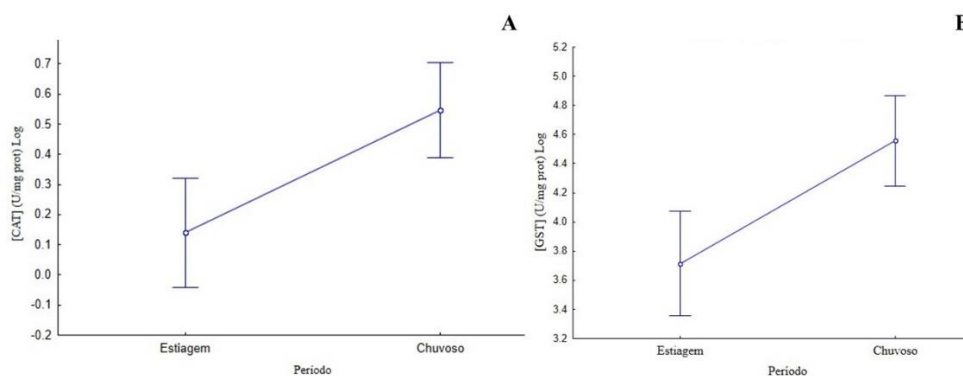


Fig. 4. Comparações entre as médias de atividade enzimática nos espécimes de *K. scorpioides* em função do período sazonal. **A** - catalase (CAT) e **B** - Glutathiona S-Transferase (GST).

O teste de ANOVA fatorial não demonstrou efeito de interação entre o tipo de ambiente e período sazonal nas médias de concentração de CAT ($F(2, 100) = 0,20899$, $p = 0,81176$) (Fig. 5A). Isso significa que o ambiente não interfere na diferença de média da enzima nos animais de período chuvoso, ou seja, é uma diferença de forma geral, independentemente do tipo de ambiente. Já na avaliação da interação entre o ambiente e o período em razão da atividade de GST em *K. scorpioides*, registrou-se um efeito significativo ($F(2, 100) = 4,9908$; $p = 0,00859$) (Figura 5B). Dessa forma, o período e o ambiente influenciam simultaneamente na diferença de concentração observada para GST, com médias elevadas em animais do grupo A3 no período chuvoso.

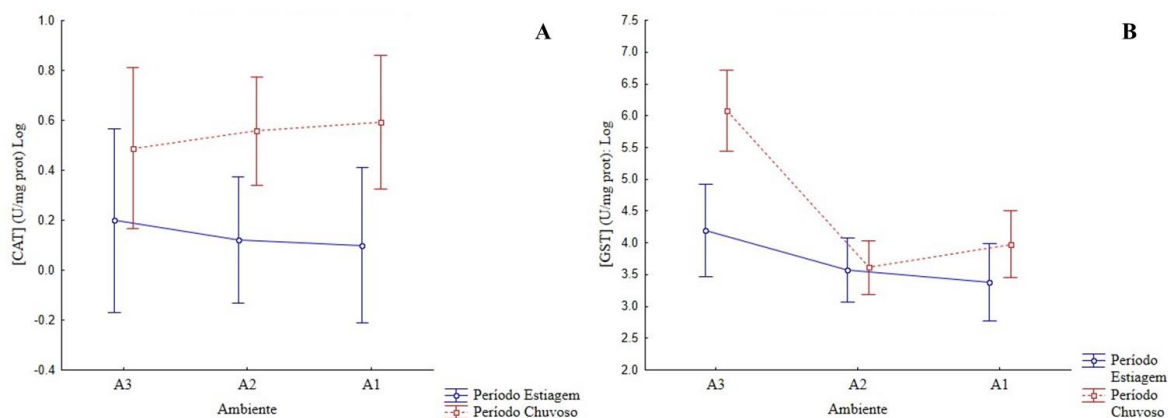


Fig. 5. Comparações entre as médias de atividade enzimática nos espécimes de *K. scorpioides* em função do tipo de ambiente e período sazonal por ANOVA fatorial ($p < 0,05$). **A** - catalase (CAT) e **B** - Glutathione S-Transferase (GST).

Fatores não considerados nas análises, como dieta, idade dos animais, histórico de exposição deles a poluentes ou estresse, podem estar influenciando nas respostas das atividades enzimáticas.

4. Discussão

Neste estudo, observamos que os machos eram maiores em comprimento de carapaça. No entanto, as fêmeas foram maiores em todas as outras medidas, incluindo peso; as fêmeas de criadouro e ambiente natural registraram maiores médias corporais e de peso. Esses dados concordam com Bager (2006) que afirmou que a maior dimensão das fêmeas

pode ser atribuída à produção e armazenamento de ovos dentro delas. Por outro lado, os machos diminuem em tamanho após o amadurecimento sexual e são menores que as fêmeas, pois precisam de energia para a reprodução (Fagundes et al., 2010).

A compreensão da biometria é essencial para entender a biologia animal, pois inclui mecanismos bioquímicos, fisiológicos e comportamentais que indicam a saúde do espécime durante o desenvolvimento. Isso ajuda a entender as reações biológicas de organismos aquáticos quando expostos à contaminação, o que reflete negativamente na saúde (Magalhães e Filho, 2008).

A literatura não fornece dados sólidos ou parâmetros biométricos padronizados sobre a classificação etária das tartarugas amazônicas em condições *in situ*; no entanto, alguns autores concordam que as tartarugas amazônicas podem ser categorizadas por tamanho ou peso (Bernhard et al., 2016).

Sobre a proporção sexual, manter um maior número de fêmeas que machos é necessário para o manejo de criadouros. Isso se deve ao fato de que o comportamento agonístico dos machos em disputa pelas fêmeas diminui, o que evita lesões e óbitos, como observado em *Chrysemys picta* em cativeiro (Moldowan; Brooks; Litzgus, 2020). Como os machos estão ativos e perseguindo as fêmeas para acasalar, é comum que haja uma proporção sexual elevada de machos durante a época reprodutiva. Isso está relacionado a fatores externos, como métodos de captura, comportamento sexual e temperaturas de incubação dos ovos (Vogt, 1980; Fachin-Téran et al., 2003; Famelli et al., 2011).

Em criadouro, Rodrigues et al. (2023) relataram proporção sexual de 1:2 (um macho para duas fêmeas) e isso favorece o acasalamento, disputa por fêmeas, reprodução, alimentação e produtividade nesse local. Isso é semelhante ao que foi descrito por Barreto et al. (2020) que registraram 1,3 machos: 1,0 fêmeas e Forero-Medina et al. (2007) descrevendo um padrão de proporcionalidade semelhante em espécimes de *K. scorpioides albogulare in situ*. Em ambiente natural, essas diferenças na razão sexual não são comuns

para quelônios. A variação no número de animais nos recintos pode ser atribuída a fatores como predadores não naturais, pisoteio de animais e interferência antrópica (Rodrigues e Silva, 2015).

Sobre o indicador OD, os valores foram baixos para A1 e A2 na estiagem ($4,24 \pm 1,41$ e $3,71 \pm 1,86$ respectivamente). Esses valores não correspondem aos padrões do CONAMA n.º 357/2005 e Portaria n.º 2914/2011 do Ministério da Saúde, cujo índice deve ser $\geq 5,0$ mg/L. No entanto, no que diz respeito ao pH, os dados apresentados foram consistentes com a legislação brasileira (6,0 a 9,0) (A1 – estiagem $6,28 \pm 0,82$ e A2 - chuvoso $6,70 \pm 0,82$). Dessa forma, sabe-se que os efluentes orgânicos e fertilizantes descartados nos lagos de áreas urbanizadas são as principais fontes poluidoras e as causas podem, inclusive, gerar baixos níveis de OD (Nunes, 2011).

Observamos o impacto direto de esgoto doméstico e elevado teor de matéria orgânica em regiões urbanizadas deste estudo, sendo registradas concentrações diminuídas de OD nessas áreas. Isso pode estar relacionado à poluição. Estudos mostram que o OD é um parâmetro crucial da qualidade hídrica que pode ser usado para avaliar os impactos ambientais, causando mortandade de diversos organismos aquáticos (Oliveira, 2014).

A temperatura média no período de estiagem foi de $29,60 \pm 0,64$ em A1 e $29,30 \pm 0,91$ em A2 no chuvoso. Pinto et al. (2010) afirmaram que essas variações são comuns e fazem parte do regime climático local. Eles também afirmaram que a elevação da temperatura em determinadas regiões é frequentemente atribuída às atividades antrópicas. Neste estudo, quando consideramos apenas as diferentes épocas do ano, observamos pequenas variações na temperatura da água dos ambientes, com amplitudes térmicas de $3,4^{\circ}\text{C}$ (chuvoso) e $3,1^{\circ}\text{C}$ (estiagem). Esses dados estão em linha com Costa-Neto et al. (2001/2002), que encontraram em lagos na bacia do Rio Pericumã, um dos pontos focais deste estudo, amplitudes térmicas de até 10°C com máxima de 36°C e mínima de 26°C .

As mudanças climáticas extremas são uma ameaça real para o Brasil, especialmente no nordeste e na Amazônia. Para entender os efeitos a longo prazo nos corpos hídricos, principalmente na saúde animal e na qualidade dos ecossistemas causados pelo aumento da temperatura, é necessário o conhecimento da dinâmica climática e hidrológica (Marengo, 2007; Ambrizzi et al., 2007; Marengo et al., 2007).

As águas da Baixada Maranhense são tipicamente tropicais, com poucas mudanças térmicas e baixas variações ao longo do ano. Devido a influência significativa da Floresta Amazônica, os parâmetros meteorológicos da região são extremamente instáveis (Costa-Neto, 2001/2002). Além disso, existem outras variáveis como a intensidade da radiação solar, os ventos e outros parâmetros que afetam diretamente a hidrologia local. Um exemplo é o fenômeno La Niña, que pode causar baixas precipitações na Amazônia brasileira e, embora seja um fenômeno meteorológico global, ele também pode afetar o clima da região (Costa et al., 2022).

No solo, foram observados níveis elevados de Ca e Mg em Al e H+Al em área vegetada e os valores variaram de 13,09 a 35,94 cmol/dm^3 estando ao nível alto ($> 5,0 \text{ cmol}/\text{dm}^3$), conforme a classe de interpretação para acidez potencial (H+Al) definida por Prezotti e Guarçoni (2013). Estudos recentes de Sousa et al. (2019) mostram que a combinação de Al, Ca e Mg é prevalente em solos argilosos na Baixada Maranhense. A falta deles pode indicar toxicidade, pois quando encontrados em níveis elevados, impedem que as plantas sejam danificadas, que são o alimento de muitos animais. Cardoso; Fernandes; Fernandes (2009) enfatizam o fato de que a presença de substâncias químicas substanciais no solo pode resultar em desequilíbrios significativos, como aqueles nutricionais à flora regional, contaminação hídrica e lençóis freáticos. Esses desequilíbrios podem ter um impacto direto na fauna residente, especialmente quelônios aquáticos.

Além de influenciar o aumento da CTC, os altos níveis de MO indicam um solo produtivo. Isso permite que as plantas absorvam muitos nutrientes. Embora os solos

argilosos tenham concentrações de Cu mais altas do que solos arenosos, eles geralmente apresentam deficiências de Zn (Prezotti e Guarçoni, 2013). Os solos de A2 podem não ter sido afetados diretamente por poluentes locais, de acordo com os dados do nosso trabalho. Além disso, nosso estudo, que encontrou altas concentrações de Cu em solo argiloso de A2, discorda dos relatos dos autores. Um metal pesado essencial para as tartarugas, o cobre afeta o crescimento, a formação de ovos, o transporte de oxigênio, atividade de enzimas e reprodução. O excesso desse elemento e de chumbo pode ser tóxico para os animais e reduzir os nutrientes essenciais vitais (Prezotti e Guarçoni, 2013; Sousa et al., 2018).

Em relação ao Zn, o uso frequente de fertilizantes, como os fosfatados, reduz a quantidade desse elemento em solos argilosos, característicos do ponto A2, o que pode explicar as variações nos valores em áreas vegetadas (Prezotti e Garçoni, 2013). A divisão e a diferenciação celular são dois dos processos biológicos que podem ser afetados pela presença desse elemento no organismo. Isso pode resultar em respostas mutagênicas perigosas (Grungreiff et al., 2016).

Apesar da presença natural de ferro e sódio no solo, esses elementos podem adentrar por vias não naturais. Concentrações elevadas desses metais foram encontradas em áreas urbanizadas, o que pode indicar contaminação. Para avaliar áreas potencialmente impactadas, é essencial ter conhecimento das diversidades e concentrações desses elementos químicos (Rebêlo et al., 2020). Esses autores argumentam que o pH do solo pode afetar as altas concentrações de elementos metálicos, como o ferro; isso pode resultar na formação de cátions metálicos, reduzindo seus valores.

De acordo com a granulometria, os altos níveis de silte e argila encontrados em A2 indicam que o solo é de tipo argissolo, característico da Baixada Maranhense. De acordo com autores como Klein (2014) e Dou et al. (2016), os solos argilosos são mais pesados devido à presença significativa de argila, que excede 35%. Eles também demonstram maior

propensão à compactação e capacidade de reter mais matéria orgânica. Por reter um volume elevado de água e outros componentes, os solos argilosos são mais produtivos.

A granulometria e as características dos solos da Baixada Maranhense são essenciais em estudos de impacto ambiental, pois os solos podem acumular partículas e substâncias químicas com o tempo, permitindo sua associação com corpos hídricos. Como podem ser uma fonte potencial de contaminação aos organismos aquáticos, são importantes carreadores de contaminantes no meio aquático (Nizolli e Silva, 2009). De acordo com Filizola et al. (2002) a contaminação química e a textura do solo afetam negativamente a qualidade da água e a saúde dos humanos e dos animais.

Já houve investigações em alguns répteis que relacionam as respostas dos biomarcadores com o tamanho do animal (Amaral et al., 2012). O presente estudo encontrou uma correlação entre as respostas dos organismos às atividades de GST superiores às de CAT e o crescimento, mostrando atividades de GST reduzidas em comparação com medidas corporais maiores. Isso pode estar relacionado à exposição do animal a fatores externos, com atuação da GST, que é altamente reativa à poluição ambiental. A relação entre a bioacumulação de chumbo e atividade enzimática foi observada em *Trachemys scripta* e *Caiman latirostris*. Isso sugere os efeitos possíveis do chumbo no crescimento dessas espécies, pois pode acumular-se no sangue e nos ovos de fêmeas (Páez-Osuna et al., 2010; Quintela et al., 2019).

A diferença nos valores de metais encontrados neste estudo, particularmente o ferro em A1, sugere que *K. scorpoides* pode estar exposto a contaminantes do solo e micronutrientes excessivos. No entanto, esses valores não são significativos entre as áreas porque foram confirmados pela correlação inversa entre medidas corporais e atividade enzimática, com uma forte correlação com o crescimento. Existem evidências de que a exposição contínua a metais pesados, particularmente ao alumínio, pode prejudicar o

desenvolvimento de organismos aquáticos. Esses metais podem adentrar ao ambiente por várias vias, bioacumulando no organismo (Marques e Américo-Pinheiro, 2018).

Nesta investigação, optou-se por correlacionar a maioria dos dados sobre a biometria e a atividade enzimática de quelônios com espécies de peixes (Carvalho-Neta e Abreu-Silva, 2013; Carvalho-Neta et al., 2014; Pinheiro-Sousa et al., 2021) e caranguejos (Carvalho-Neta et al., 2019; Oliveira et al., 2019) capturados em áreas potencialmente impactadas.

Registramos atividades de CAT diminuídas, estando próximas a zero e, em GST ela foi menor em animais dos grupos A1 e A2. A CAT pode ser regulada pelas necessidades do organismo e pelo aumento da formação de EROs, que eleva sua atividade como um mecanismo de defesa contra fatores externos e estressores. Monteiro et al. (2009) sugerem que a exposição de animais a xenobióticos, que resulta em estresse oxidativo, pode ser indicada, dependendo do nível de atividade das enzimas.

Além de servir como principal linha de defesa na proteção contra radicais livres, a CAT induz ou ativa as enzimas de biotransformação, como a GST, que reduz diretamente o dano causado pelos estressores. Yan e Forster (2011) e Monteiro et al. (2010) destacam que o estresse oxidativo produz EROs frente à atuação de enzimas de biotransformação, que controlam esse processo nos animais. Além disso, o excesso de EROs, ocasionalmente causados por contaminantes, geram desequilíbrios no organismo.

Fêmeas do grupo A3 neste estudo demonstraram atividade alterada próximas a zero de CAT e GST. Elas estão mais dispersas e ativas no criadouro durante a fase reprodutiva, que é anual. Em *K. scorpioides*, Chaves et al. (2012) descobriram partir de observações morfológicas de massa ovariana ($6,25 \pm 4,23$ g e $2,27 \pm 1,42$ g) e índice gonadosomático (2,06% 1,79% na estiagem e chuvoso respectivamente), que fêmeas de criadouro estavam em período reprodutivo vitelogênico e as variações climáticas não tiveram grande impacto, enquanto os machos apresentaram sazonalidade reprodutiva, com níveis hormonais variando ao longo do ano, como a testosterona, especialmente em período chuvoso (Viana et al.,

2014). Isso pode explicar os baixos níveis de GST e CAT nos animais de A1 e A2, o que indica que as atividades das enzimas diferem em relação à sazonalidade reprodutiva *in situ*.

Os resultados mostraram que um dos fatores que pode interferir no nível de atividade das enzimas em organismos de criadouro é o ambiente. Experimentos com *P. geoffroanus* que avaliaram as enzimas GST e CAT foram realizados usando esse local como referência (Silva et al., 2016; Bonini-Domingos e Oliveira, 2017). De acordo com Case et al. (2005) e Ruiz et al. (2002) esses locais podem ser estressantes, da mesma forma que urbanos e os impactados. Este estudo demonstrou que os fatores externos podem alterar a atividade de GST nos organismos do criadouro e, fatores como condições de manutenção do recinto, a água tratada e usada para irrigar os tanques, o manejo diário dos animais e presença humana no local podem influenciar isso.

A CAT não mostrou diferenças notáveis entre os animais. O tamanho da amostra, a variabilidade dos dados ou a sensibilidade do processo de análise são algumas das muitas razões para isso. Nesse contexto, a literatura ainda não menciona valores de referência de normalidade para quelônios aquáticos.

Acredita-se que *K. scorpioides* não esteja em estresse oxidativo devido à diminuição das atividades de CAT e à falta de diferenças significativas entre os animais dos grupos A1 e A2 no período chuvoso e estiagem. De acordo com Campbel (2006/2015), vários fatores, incluindo idade, sexo, ambiente, estação climática, fisiologia e reprodução, influenciam principalmente essa reação e alteram os parâmetros bioquímicos do sangue. O tamanho da amostra, as condições climáticas e hidrológicas específicas, a localização geográfica da Baixada Maranhense e as características ambientais únicas da APA são algumas das limitações que podem afetar simultaneamente os níveis de atividade das enzimas nos animais deste estudo. Verificamos que a relação entre o sexo e a atividade enzimática não foi significativa não tendo nenhuma influência nas respostas bioquímicas. Na mesma linha,

Borges et al. (2022) estudaram *P. unifilis* de uma área protegida da Amazônia brasileira e também descobriram uma correlação não significativa dessa variável com as enzimas.

O Maranhão é diferente dos demais Estados brasileiros em termos de sazonalidade, pois não possui estações climáticas definidas, com o predomínio de períodos de estiagem e chuvoso. Apresenta períodos climáticos variados devido ao seu extenso limite territorial. Essas variações são fortemente influenciadas pelas diferenças nos sistemas meteorológicos como a Zona de Convergência Intertropical (ZCIT), que causam grandes chuvas na região (Sema, 2023).

Na estiagem, *K. scorpioides* costuma estar, época em que as condições climáticas e alimentares são desfavoráveis e pouco disponíveis. Eles se enterram durante a estação seca, usando isso como mecanismo fisiológico para reduzir seu metabolismo e gasto de energia. A espécie torna-se ativa e volta à procura de alimentos na chegada do período chuvoso. Segundo Pereira et al. (2007) e Bernhard et al. (2016), a estivação regula a temperatura corporal dos animais reduzindo o estresse térmico. É possível que esse evento fisiológico tenha impacto nas respostas bioquímicas em *K. scorpioides in situ*.

Experimentos realizados com *P. geoffroanus* de local impactado mostraram aumento nas atividades de enzimas. Isso indica exposição a poluentes, que pode levar à ativação ou indução de enzimas de biotransformação. Isso também permite mudanças nas atividades de GST e CAT para evitar danos bioquímicos e citogenéticos (Silva et al., 2016). Durante a estiagem, Carvalho-Neta et al. (2019) encontraram valores reduzidos de GST e CAT em *U. cordatus*, mas durante o chuvoso, Jesus et al. (2021) registraram valores mais altos de GST em caranguejos da área portuária de São Luís, Maranhão.

A elevação ou diminuição da atividade da CAT nos organismos pode sofrer oscilações e estar relacionada à mudança do habitat e poluição. Os animais dos grupos A1 e A2 apresentaram alterações sutis dessa enzima em diferentes períodos do ano, apesar da ausência de diferenças estatísticas significativas. Devido a sua indução, a CAT pode iniciar

com mais atividade na presença de poluentes e, em seguida, diminuir (Viarengo et al., 2007). Já foram observadas essas oscilações em organismos de ambientes poluídos e o tempo de exposição e a duração do xenobiótico estão associados a isso (Tsangaris et al., 2010).

Era esperado que os organismos dos grupos A1 ou A2 apresentassem atividade enzimática diferente, mas aqueles do grupo A3 tiveram elas alteradas e altas. Indivíduos de ambiente contaminado podem apresentar atividade reduzida que aqueles de ambiente controlado, e isso pode ser atribuído à presença de substâncias inibitórias que impedem o funcionamento das enzimas, como pesticidas e oxigênio (Fibach e Rachmilewitz, 2008; Vioque-Fernández et al., 2009).

Nosso estudo gerou dados pioneiros sobre o uso de biomarcadores em uma tartaruga de água doce da região amazônica. Demonstramos alterações nas respostas bioquímicas (GST e CAT) no sangue de vários animais em diferentes épocas do ano. Os resultados dos biomarcadores não foram afetados pelo sexo. Essas respostas mostram novas evidências da correlação entre enzimas e tipos de ambientes e estações climáticas nos animais da Baixada Maranhense, uma Unidade de Conservação de Uso Sustentável no Maranhão. No entanto, A saúde das populações animais ainda não está sendo impactada pela exploração sustentável desses recursos, que as comunidades ribeirinhas usam como alimento.

Os resultados fornecem uma síntese geral das respostas de biomarcadores, que podem ser úteis em ensaios ecotoxicológicos futuros com outras espécies de quelônios amazônicos. Além disso, os dados fornecem informações biológicas e ambientais para os órgãos gestores e fiscalizadores que elaboram políticas públicas para a conservação das populações de tartarugas, garantindo assim a saúde das pessoas que consomem esses animais. Ensaio bioquímico mais robustos com o uso de outros biomarcadores como glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), superóxido dismutase (SOD), glutathione redutase (GR), glutathione peroxidase (GPx) e lipoperoxidação (TBARS) são sugeridos para serem

realizados em análises subsequentes com *K. scorpioides* e outras espécies de quelônios amazônicos.

5. Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (Finanças Código 001); ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual do Maranhão pelo incentivo à pesquisa; aos Laboratórios de Biomarcadores em Organismos Aquáticos (LABOAq) e Biodiversidade Molecular (LaBimol) e à Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão – FAPEMA (Processo Universal n.º 00880/2019).

Referências

- Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. *Oxygen Radicals in Biological Systems*, 84(05016-3), 121-126.
- Amaral, M. J., Bicho, R. C., Carretero, M. A., Sanchez-Hernandez, J. C., Faustino, A. M. R., Soares, A. M. V. M. 2012. O uso de um lagarto lacertídeo como modelo para estudos de ecotoxicologia de répteis: Parte 2 - Biomarcadores de exposição e toxicidade entre lagartos expostos a pesticidas. *Quimosfera* 87:765-774.
- Ambrizzi, T., Rocha, R. P., Marengo, J. A., Pisnitchenko, I., Alves, L. M., Fernandez, J. P. R. 2007. Cenários regionalizados de clima no Brasil para o século XXI: Projeções de clima usando três modelos regionais. Relatório 3. Ministério do Meio Ambiente (MMA), Secretaria de Biodiversidade e Florestas (SBF), Diretoria de Conservação da Biodiversidade (DCBio). Mudanças Climáticas Globais e Efeitos sobre a Biodiversidade - Subprojeto: Caracterização do clima atual e definição das alterações climáticas para o território brasileiro ao longo do século XXI. Brasília, fevereiro 2007.
- Bager, A. 2006. *Phrynops hilarii* Reproduction. *Herpetological Review*, 37, 459.

- Barreto, L., Neckel-Oliveira, S., Ribeiro, L. E. S., Garcez, R. B. M., Calvet, M. C. R., Oliveira, C. C., Zuidam, B. G. V., Roessink, I., Nes, E. H. V., Peeters, E. T. H. M. 2020. Seasonal variation in the population parameters of *Kinosternon scorpioides* and *Trachemys adiutrix*, and their association with rainfall in seasonally flooded lakes. *Herpetological Conservation and Biology* 15(2), 457-466.
- Belo, M. F. R. F., Souza, A. L. F. 2016. Estudo cinético da enzima catalase (E.C. 1.11.1.6) de extrato bruto de bata doce (*Impomoea batatas*). *Scientia Plena*, 12(07), 1-7.
- Bernhard, R., Ferrara, C. R., Balestra, R. A. M., Valadão, R. M., Botero-Arias, R., Vogt, R. C. 2016. Monitoramento populacional de quelônios amazônicos. In. Balestra, R. M. Manejo conservacionista e monitoramento populacional de quelônios amazônicos. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Brasília: Ibama, 2016. 136p.
- Berry, J. F., Iverson, J. B. 2011. *Kinosternon scorpioides* (Linnaeu, 1766) – scorpion mud turtle. In: Rhodin AGJ, Pritchard PCH, Van Dijk PP, Saumure RA, Berry JF, Iverson JB. *Kinosternon scorpioides*. Chelonian Research Foundation 5, 063.1-063.15.
- Bonini-Domingos, C. R., Oliveira, C. 2017. *Phrynops geoffroanus*: pesquisa no Brasil. RN: São José do Rio Preto, 144.
- Borges, Â. O., Erickson, J., Silva, L. A., Fantin, C., Domingos-Moreira, F. X. V. 2022. Mercury bioaccumulation, genotoxic and biochemical biomarkers reveal the health status of yellow-spotted Amazon River turtles (*Podocnemis unifilis*) in an environmental protection area in the Amazon. *Acta Amazonica*, 52(3), 254-263,
- Braga, B., Hespanhol, I., Conejo, J. G. L., Mierzwa, J. C., Barros, M. T. L., Spencer, M., Porto, M., Nucci, N., Juliano, N., Eiger, S. 2005. Introdução à Engenharia Ambiental. São Paulo: Pearson Prentice Hall 9, 125-159.

- Brasil. 2005. Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA Resolução 357/2005. Enquadramento do Corpos Hídricos Superficiais no Brasil. Governo Federal, Brasília. Publicada no DOU 53, Seção 1, 58-63.
- Brasil. 2011. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Ministério do Meio Ambiente. Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011. Brasília: Diário Oficial da União.
- Brasil. 2006. Decreto nº 5758, de 13 de abril de 2006. Institui o Plano Estratégico Nacional de Áreas Protegidas – PNAP, seus princípios, diretrizes, objetivos e estratégias, e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, 13 de abril de 2006, Poder Executivo, Brasília, DF.
- Brasil. 2008. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2008. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, Governo Federal, Brasília.
- Brigante, J., Silva, M. R. C., Queiroz, L. A., Coppi, R. 2003. Quantificação de metais na água e no solo do rio Mogi-Guaçu. In: Brigante, J., Espíndola, E. L. G. (Ed). Limnologia Fluvial: um estudo no Rio Mogi-Guaçu. 1 ed. São Carlos: RiMa Editora, 6, 85-120.
- Bueno, A. P. M., Vasconcelos, M. G., Francisco, C. M., Pavanin, L. A. A. 2017. Teste de micronúcleo em peixes e parâmetros físico-químicos da água da represa Cocaís, Minas Gerais. Acta Brasiliensis 1(3), 32-36.
- Cabrera, M. R., Colantonio, S. E. 1997. Taxonomic revision of the South American subspecies of the turtle *Kinosternons corpioides*. Journal Herpetology 31(4), 507- 513.
- Cagle, F. R. A system of marking turtles for future identification. Copeia, n. 3, p. 170-173, 1939.
- Campbel, T. W. 2006. Clinical pathology of Reptiles. In: Mader, D. R. (ed). 2006. Reptile Medicine and Surgery. Florida: Ed. Saunders Elsevier, 453-470.

- Campbel, T. W. 2015. Exotic Animal Hematology and Cytology. 4 Ed. John Wiley; Sons, Inc. 421.
- Cardoso, E. L., Fernandes, A. H. B. M., Fernandes, F. A. Análise de solos: finalidade e procedimentos de amostragem. Comunicado Técnico. Corumbá: EMBRAPA, 2009.
- Carvalho-Neta, R. N. F., Abreu-Silva, A. L. 2013. Glutathione S-Transferase as biomarker in *Sciades herzbergii* (Siluriformes: Ariidae) for environmental monitoring: the case study of São Marcos Bay, Maranhão, Brazil. Latin American Journal of Aquatic Research, 41, 217-225.
- Carvalho-Neta, R. N. F., Andrade, T. S. O. M., Oliveira, S. R. S., Junior, A. R. T., Cardoso, W. S., Santos, D. M. S., Batista, W. S., Serra, I. M. R. S., Britto, N. M. 2019. Biochemical and morphological responses in *Ucides cordatus* (Crustacea, Decapoda) as indicators of contamination status in mangroves and port áreas from northern Brazil. Environmental Science and Pollution Research 26, 1-10.
- Carvalho-Neta, R. N. F., Pinheiro-Sousa, D. B., Almeida, Z. S., Santos, D. M. S., Tchaicka, L. 2014. A histopathological and biometric comparison between catfish (Pisces, Ariidae) from a harbor and a protected area, Brazil. Aquatic Biosystems 10, 1-8.
- Case, B. C., Lewbart, G. A., Doerr, P. D. 2005. The physiological and behavioural impacts of and preference for an enriched environment in the eastern box turtle (*Terrapene carolina carolina*). Applied Animal Behaviour Science, Edinburgh, 92, 353-365.
- Chaves, E. P., Oliveira, S. C. R., Araújo, L. P. F., Oliveira, A. S., Miglino, M. A., Abreu-Silva, A. L., Melo, F. A., Sousa, A. L. 2012. Morphological aspects of the ovaries of turtle *Kinosternon scorpioides* raised in captivity. Pesquisa Veterinária Brasileira, 32(7), 667-671.
- Chelvanayagam, G., Parker, M.W., Board, P.G. 2001. Fly fishing for GSTs: a unique nomenclature for mammalian and insect glutathione transferases. Chemico-Biological Interactions 133(1-3), 256-260.

- Costa-Neto, J. P., Barbieri, R., Ibañez, M. S. R., Cavalcante, P. R. S., Piorki, N. M. 2001/2002. Limnologia de três ecossistemas aquáticos característicos da Baixada Maranhense. *Boletim do Laboratório de Hidrobiologia* 14/15.
- Costa, N. S. R., Santos, P. V. C. J., Nascimento, M. S., Rabelo, A. C. P. 2022. Comportamento climático dos elementos precipitação e temperatura e a influência na cultura do abacaxi em um Município da Amazônia Maranhense. *Studies in environment and animal sciences* 3(2), 150-171.
- Dou, F., Soriano, J., Tabien, R. E., Chen, K. Soil texture and cultivar effects on Rice (*Oryza sativa*, L.) grain yield componentes and water productivity in three water regimes. *PLoS ONE* 11(3), e0150549.
- Fagundes, C. K., Bager, A., Cechin, S. Z. 2010. Reproductive Ecology of the turtle *Trachemys dorbigni* (Testudines: Emydidae) in na Anthropic Environment in Southern Brazil. *Herpetological Journal*, 20, 195-199.
- Famelli, S., Bertoluci, J., Molina, F. B., Matarazzo-Neuberger, W. M. 2011. Struture of a Population of *Hydromedusa maximiliani* (Testudines, Chelidae) fron Parque Estadual da Serra do Mar, na Atlantic Rainforest Preserve in Southeastern Brazil. *Chelonian and Biology* 10(1), 132-137.
- Fibach, E., Rachmilewitz, E. 2008. The Role of Oxidative Stress in Hemolytic Anemia. *Current Molecular Medicine* 8(7), 609-619.
- Filizola, H. F., Ferracini, V. L., Sans, L. M. A., Gomes, M. A. F., Ferreira, C. J. A. 2002. Monitoramento e avaliação do risco de contaminação por pesticidas em água superficial e subterrânea na região de Guairá, São Paulo. *Pesquisa agropecuária brasileira* 37: 659-667.
- Freire, M. M., Santos, V. G., Ginuino, I. S., Farias, A. R. L. 2008. Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. *Oecologia Brasileira* 12(3), 347-354.

- Forero-Medina, G., Castaño-Mora, O. V., Montenegro, O. 2007. Abundance, population structure, and conservation of *Kinosternon scorpioides albogulare* on the Caribbean island. Of San Andrés, Colombia. *Chelonian Conservation and Biology* 6, 163-169.
- Grungreiff, K., Reinhold, K., Wedemeyer, H. 2016. The role of zinc in liver cirrhosis. *Annals of Hepatology* 15(1), 7-16.
- Herrera, V. H. Q., Baena, J. P. 2017. Genotoxic Biomarkers in Erythrocytes of *Lepidochelys olivacea* (Cheloniidae) from Colombia. *Acta Biológica Colombiana* 22(3), 322-330.
- Huggett, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle Jr., P.M., Bergman, H.L. 1992. (Eds.). *Biomarkers. Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. Lewis Publishers, Chelsea, 235 335.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2021. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/geociencias/cartas-e-mapas/mapas-regionais/15819-amazonia-legal.html>. Acesso em: 06 jun. 2023.
- ICMBio, 2023. Sistema de Avaliação do Risco de Extinção da Biodiversidade – SALVE. Disponível em: <https://salve.icmbio.gov.br/>. Acesso em: 06 de dez. de 2023.
- ICMBio - Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Marinha do Sudeste e Sul – Dia Mundial das Áreas Úmidas. Disponível em: <https://www.icmbio.gov.br/cepsul/destaques-e-eventos/670-dia-mundial-das-areas>. Acesso em: 01 fev. 2024.
- Jesus, W. B., Andrade, T. S. O. M., Soares, S. H., Pinheiro-Sousa, D. B., Oliveira, S. R. S., Torres, H. S., Protazio, G. S., Silva, D. S., Santos, D. M., Carvalho-Neta, A. V., Benjamin, L. A., Carvalho-Neta, R. N. F. 2021. Biomarkers and occurrences of heavy metals in sediment and the bioaccumulation of metals in crabs (*Ucides cordatus*) in impacted mangroves on the Amazon coast, Brazil. *Chemosphere*, 271.
- Klein, V. A. Física do solo. Ed. Universidade de Passo Fundo. 3º edição, 2014.

- Labrada-Martagón, V., Rodríguez, P. A. T., Méndez-Rodríguez, L. C., Zenteno-Savín, T., 2011. Oxidative stress indicators and chemical contaminants in East Pacific green turtles (*Chelonia mydas*) inhabiting two foraging coastal lagoons in the Baja California peninsula. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. 154, 65-75.
- Legler, J. M. 1990. The genus *Pseudemys* in *Mesoamerica*: taxonomy, distribution, and origins. p. 82-105. In: Gibbons, J. W. (Ed.). *Life history and ecology of the slider turtle*. Smithsonian Institution Press, Washington, D. C. 1990.
- Lombardi, J. V. 2004. Fundamentos de toxicologia aquática. p. 261-270. In: Ranzani-Paiva, M. J. T., Takemota, R. M., Lizama, M. A. P. *Sanidade de organismos aquáticos*. São Paulo: Livraria Varela, 426p.
- Magalhães, D. P., Filho, A. S. F. 2008. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecologia Brasiliensis* 12(3), 355-381, 2008.
- Martinhão, D. G. S., Lobato, E. 2004. *Cerrado – Correção do Solo e Adubação*. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica.
- Marques, M. B. L., Américo-Pinheiro, J. H. P. 2018. Efeitos ecotoxicológicos de metais aos organismos aquáticos. *Fórum Ambiental da Alta Paulista* 14(4), 85-95.
- Marengo, J. A. 2004. Interdecadal variability and trends of rainfall across the Amazon basin. *Theoretical and Applied Climatology* 78, 79-96.
- Marengo, J. A. 2007. *Mudanças climáticas globais e seus efeitos sobre a biodiversidade - caracterização do clima atual e definição das alterações climáticas para o território brasileiro ao longo do século XXI*. 2. ed. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2007. v.1, p.214.
- Ministério do Meio Ambiente (MMA). 2000. *Lista Ramsar – Sítios Ramsar no Brasil*. Disponível em: <https://rsis.ramsar.org/ris/1020>. Acesso em: 24 jul. 2019.

- Monteiro, D. A., Rantin, F. T., Kalinin, A. L. 2009. The effect of selenium on oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther, 1869) exposed to organophosphate insecticide Folisuper 600 BR® (methyl parathion). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 149, 40-49.
- Monteiro, D. A., Rantin, F. T., Kalinin, A. L. 2010. Exposição ao mercúrio inorgânico: efeitos toxicológicos, biomarcadores de estresse oxidativo e bioacumulação no peixe tropical de água doce matrinxã, *Brycon amazonicus* (Spix e Agassiz, 1829). *Ecotoxicologia* 19:105-123.
- Nizolli, E. C., Silva, W. L. 2009. O papel dos sulfetos volatizados por acidificação no controle do potencial de biodisponibilidade de metais em solos contaminados. *Revista Química Nova* 32, 365-372.
- Nunes, R. T. S., Freitas, M. A. V. 2011. Vulnerabilidade dos recursos hídricos no âmbito regional e urbano. Rio de Janeiro: Interciência.
- Oliveira, S. R. S., Batista, W. S., Sousa, J. B. M., Noletto, K. S., Arouche Lima, I. M., Andrade, T. S. O. M., Cardoso, W. S., Carvalho Neta, R. N. F. 2019. Enzymatic and Histological Biomarkers in *Ucides cordatus* (Crustacea, Decapoda) in an Industrial Port on the North Coast of Brazil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 102, 802-810.
- Oliveira, C. R. 2014. Qualidade da água e conservação de nascentes em assentamento rural na mata Pernambucana. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- Páez-Osuna, F., Calderón-Campuzano, M. F., Soto-Jiménez, M. F., Ruelas-Inzunza, J. R. 2010. Lead in blood and eggs of the sea turtle, *Lepidochelys olivacea*, from the Eastern Pacific: Conservation, isotopic composition and maternal transfer. *Marine Pollution Bulletin* 60, 433-439.

- Pereira, L. A., Sousa, A. L., Cutrim, M. V. J., Moreira, E. G. 2007. Características ecológicas do habitat de *Kinosternon scorpioides* Linnaeus, 1766 (Reptilia, Chelonia, Kinosternidae) no município de São Bento - Baixada Maranhense (Maranhão, Brasil). Boletim do Laboratório de Hidrobiologia 20, 9-14.
- Pinheiro-Sousa, D. B., Costa Soares, S. H., Torres, H. S., Jesus, W. B., Oliveira, S. R. S., Bastos, W. R., Oliveira Ribeiro, C. A., Carvalho-Neta, R. N. F. 2021. Sediment contaminant levels and multibiomarker approach to assess the health of catfish *Sciades herzbergii* in a harbor from the northern Brazilian Amazon. Ecotoxicology and Environmental Safety 208, 111540.
- Pinto, A. L., Oliveira, G. H., Pereira, G. A. 2010. Avaliação da eficiência da utilização do oxigênio dissolvido como principal indicador da qualidade das águas superficiais da Bacia do Córrego Bom Jardim, Brasilândia, MS. Revista GEOMAE, 1(1), 69-82.
- Prezotti, L. C., Guarçoni, A. M. 2013. Guia de interpretação de análise de solo e foliar. – Vitória, ES: Incaper, 104 p.
- Quintela, F. M., Lima, G. P., Silveira, M. L., Costa, P., Biachini, A., Loebmann, D., Martins, S. E. 2019. High arsenic and low lead concentrations in fish and reptiles from Taim wetlands, a Ramsar site in southern Brazil. Science of The Total Environment 660, 1004-1014.
- Rebêlo, A. G. M., Monteiro, M. T. F., Ferreira, S. J. F., Ríos-Villamizar, E. A., Quesada, C. A. N., Junior, S. D. 2020. Valores de referência da concentração de metais pesados em solos na Amazônia Central. Química Nova 43(5), 534-539.
- Rodrigues, C. A. L., Medeiros, A. M., Tchaicka, L., Pereira, L. A., Oliveira, A. S., Sousa, A. L. 2017. Captivity breeding model and aspects on management of the *Kinosternon scorpioides*. Archivos de Zootecnia, 66(254), 309 – 315.
- Rodrigues, C. A. L., Medeiros, A. M., Pereira, E. P., Carvalho-Neta, R. N. F., Sousa, A. L. 2022. Biomarcadores bioquímicos e genotóxicos em tartarugas (Reptilia: Testudines):

- abordagem metodológica para uma espécie do gênero *Kinosternon*. In: Sousa, D. B. P., Castro, J. S., Jesus, W. B. Monitoramento Ambiental: metodologias e estudos de casos. São Luís: i-EDUCAN, 2022. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.29327/576562>. Acesso em: 23 ago. 2023.
- Rodrigues, J. F. M., Silva, J. R. 2015. Population structure, activity, and sex ratio of *Phrynops tuberosus* (Testudines: Chelidae) in Caatinga, Brazil Northe-Western. Journal of Zoology, 1, online-first.
- Rodrigues, C. A. L., Medeiros, A. M., Tchaicka, L., Chaves, L. P. F. A., Buarque, S. A., Sousa, A. L. 2023. Aspectos biométricos de ovos e embriões da tartaruga amazônica (*Kinosternon scorpioides* – Testudines: Kinosternidae) acompanhados em incubatório com temperatura controlada. Archives of Veterinary Science, 28(3), 1-8.
- Ruiz, G., Rosenmann, M., Novoa, F. F., Sabat, P. 2002. Hematological parameters and stress index in rufous-collared sparrows dwelling in urban environments. The Condor, 104, 162- 166.
- Moldowan, P. D., Brooks, R. J., Litzgus, J. D. Demographics of injuries indicate sexual coercion in a population of Painted Turtles (*Chrysemys picta*). Canadian Journal of Zoology 98, 1, 269-278. 2020.
- SEMA. 2023. Secretaria de Estado do Meio Ambiente e Recursos Naturais. As chuvas no Maranhão. Disponível em: <https://www.sema.ma.gov.br/noticias/as-chuvas-no-maranhao>. Acesso em: 07 dez. 2023.
- Silva, M. I. A. 2011. Hematological and biochemical changes in a *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) population in response to environmental stressors. Genetics and Molecular Research 10, 1170-1171.
- Silva, M. I. A., Silva, T. L., Almeida, E. A. 2016. Thesis Abstract Study of biochemical changes in blood and various organs of *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812)

- (Testudines: Chelidae) collected in contaminated environment or exposed to benzo[a]pyrene. *Genetics and Molecular Research* 15, 1-2.
- Sousa, V. F., Nunes, G. M. V. C., Zonta, J. B., Araújo, E. C. E. 2019. Tecnologia para a produção de melancia irrigada na Baixada Maranhense. São Luís: Embrapa Cocais, 2019, 139p.
- Souza, N. L. N., Carneiro, M. T. W. D., Pimentel, E. F., Frossard, A., Freire, J. B., Endringer, D. C., Ferreira Júnior, P. D. 2018. Trace elements influence the hatching success and emergence of *Caretta caretta* and *Chelonia mydas*. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 50, 117–122.
- Tsangaris, C., Kormas, K., Stroglyoudi, E., Hatzianestis, I., Neofitou, C., Andral, B., Galgani, F. 2010. Multiple biomarkers of pollution effects in caged mussels on the Greek coastline. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 151, 369-378.
- União Internacional para a Conservação da Natureza – IUCN. 2012. Red List of Threatened Species. Version 2012.1. Disponível em: www.iucnredlist.org. Acesso em: 11 jul. 2018.
- Ventura, E. C., Gaelzer, IL. R., Zanette, J., Marques, M. R. F., Bainy, A. C. D. 2002. Biochemical indicators of contaminant exposure in spotted pigfish (*Orthopristis ruber*) caught at three bays of Rio de Janeiro coast. *Marine Environmental Research* 54(3–5), 775–77.
- Viana, D. C., Anunciacao, A. R. A., Santos, A. C., Assis Neto, A. C., Miglino, M. A., Oliveira, C. A., Oliveira, A. S., Sousa, A. L. 2014. Plasma Testosterone and Seasonal Reproductive Changes in the Scorpion Mud Turtle. *Pakistan Journal of Zoology* 46, 1641-1650.
- Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., Koehler, A. 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress

- syndrome in sentinel organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology* 146(3), 281–300.
- Vioque-Fernández, A., Almeida, E. A., López-Barea, J. 2009. Assessment of Doñana National Park contamination in *Procambarus clarkii*: Integration of conventional biomarkers and proteomic approaches. *Science of the Total Environment* 407, 1784-1797.
- Vogt, R. C. 1980. New methods for trapping aquatic turtles. *Copeia*, 368-371.
- Winzer, K., Winston, G. W., Becker, W., Van Noorden, C. J. F., Kocheler, A. 2001. Sex-related responses to oxidative stress in primary cultured hepatocytes of European flounder (*Platichthys flesus* L.). *Aquatic Toxicology* 52, 143-155.
- Yan, L. J., Forster, M. J. 2011. Sondas químicas para análise de proteínas carboniladas: uma revisão. *Journal of Chromatography B: Tecnologias Analíticas nas Ciências Biomédicas e da Vida* 879:1308-1315.

CAPÍTULO 3

Teste de micronúcleos e anormalidades nucleares eritrocitárias em tartaruga amazônica *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1766) (Testudines: Kinosternidae) de uma Área de Proteção Ambiental na Amazônia Maranhense, Sítio Ramsar Brasileiro³

³Artigo Científico a ser submetido à **Environmental Research**, Qualis A1 e se encontra adaptado às normas do periódico (Anexo E).

Teste de micronúcleos e anormalidades nucleares eritrocitárias em tartaruga amazônica *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1766) (Testudines: Kinosternidae) de uma Área de Proteção Ambiental na Amazônia Maranhense, Sítio Ramsar Brasileiro

Carlos Alailson Licar RODRIGUES¹, Almerinda Macieira MEDEIROS², Elizângela Pinheiro PEREIRA³, Katherine Saldanha Noieto², Raimunda Nonata Fortes CARVALHO-NETA⁴, Germán Augusto Murrieta MOREY^{1,5}, Alana Lislea de SOUSA^{1*}.

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGCA), Universidade Estadual do Maranhão, CEP 65055-970, São Luís, MA, Brasil. *Autor para correspondência: alislea@hotmail.com

² Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE (PPG-BIONORTE), Universidade Estadual do Maranhão, CEP 65055-970, São Luís, MA, Brasil.

³ Médica Veterinária, Mestra em Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão, CEP 65055-970, São Luís, MA, Brasil.

⁴ Departamento de Biologia, Universidade Estadual do Maranhão, CEP 65055-970, São Luís, MA, Brasil.

⁵ Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP), Avenida José Abelardo Quiñones Km. 4.5, San Juan Bautista, Iquitos, Loreto-Peru.

Destaques

- O ambiente e estação climática são fatores influenciadores de danos genéticos irreversíveis aos animais.
- O sexo não interfere em respostas mutagênicas em *K. scorpioides*.
- As respostas mutagênicas mostraram ser um importante biomarcador em estudos envolvendo o *K. scorpioides*.
- O uso de biomarcadores mutagênicos em *K. scorpioides* requer estudos genéticos adicionais e mais robustos.
- *Kinosternon scorpioides* mostrou ser um bom biomonitor, pois gerou respostas mutagênicas em uma espécie silvestre amazônica.

Resumo

O estudo objetivou investigar a presença de micronúcleos (MN) e Anormalidades Nucleares Eritrocitárias (ANE's) em populações naturais e de cativeiro de *Kinosternon scorpioides*, comparando suas frequências com o ambiente, sexo e sazonalidade em uma Área de Proteção Ambiental da Amazônia Maranhense. Coletamos sangue de 112 espécimes de áreas urbanizada, vegetada e cativeiro para confecção de esfregaços sanguíneos e análise citológica, feita em microscópio óptico. Encontramos MN (n=91) e ANE's do tipo binucleados (n=14), núcleos entalhados (n=81), lobulados (n=35), segmentados (n=16) e deslocados (n=253) em animais *in situ*. Não registramos anomalias em eritrócitos de espécimes de cativeiro. A média e desvio padrão ($1,13 \pm 0,47$) de MN diferiram de outros quelônios de ambiente natural, e núcleos deslocados e binucleados apareceram em maior (51,63%) e menor (2,85%) frequências. Núcleo lobulado apresentou diferença significativa nos ambientes ($p=0,02839$), seguido de segmentados ($p=0,02949$) e deslocados ($p=0,0008336$) na estiagem e chuvoso. O sexo não interferiu no surgimento das anomalias. Não encontramos valores significativos de MN, mas um número considerável de eritrócitos com núcleo lobulado nos ambientes e segmentados e deslocados entre os períodos sazonais foi confirmado. Disponibilizamos dados pioneiros sobre MN e ANE em uma espécie de tartaruga amazônica, demonstrando diferenças e relações significantes com o tipo de ambiente e estação climática. As respostas mutagênicas mostraram ser um importante biomarcador em *K. scorpioides*, sugerindo que não há evidências de danos à saúde de espécimes de cativeiro e que a ocorrência de anomalias nucleares em indivíduos *in situ* sinaliza para a importância da manutenção das áreas protegidas para a conservação de tartarugas de água doce em região amazônica contribuindo na redução dos impactos na APA.

Palavras-chave: Baixada Maranhense, biomarcadores, eritrócitos, micronúcleo, respostas mutagênicas, tartaruga-do-lodo.

1. Introdução

Abordagens sobre biomarcadores são necessárias e podem ser instrumentos simples que geram respostas a partir das análises dos níveis de exposição a poluentes, usando organismos bioindicadores como quelônios, a exemplo de *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1766), além de peixes e invertebrados aquáticos, fornecendo respostas úteis a longo prazo sobre a saúde ambiental e animal, embora os peixes sejam os mais utilizados em estudos de biomonitoramento (Matson et al., 2005; Ramsdorf et al., 2012).

A linha de pesquisa com quelônios já produziu resultados claros e promissores. Esses dados contribuem fortemente para a compreensão do conhecimento sobre a espécie e servem como parâmetros orientadores para políticas públicas ambientais destinadas à conservação dos ecossistemas aquáticos. Além disso, servem como instrumentos para detectar possíveis impactos antrópicos por meio da contaminação ambiental, perda e alteração do habitat. Isso altera a biologia da fauna, especialmente quelônios (Venancio, 2012). A pressão antrópica continua a afetar a espécie *K. scorpioides* e outras espécies de testudines por causa da caça excessiva, queimadas e desmatamentos na APA (Pereira, 2007).

O teste de micronúcleos (MN), uma técnica de baixo custo, simples e fácil de usar. É uma maneira de encontrar efeitos mutagênicos. Esse teste tem sido amplamente utilizado em pesquisas ambientais para avaliar alterações estruturais e estabilidades no DNA de organismos (Arslan et al., 2015).

Os micronúcleos são elementos citoplasmáticos com cromatina formados durante a divisão celular quando os fragmentos de cromossomos acêntricos se atrasam, dificultando sua associação ao núcleo principal das células filhas. O surgimento deles é o resultado de alterações genéticas que se manifestam por meio de anormalidades cromossômicas ou do fuso mitótico. Esse processo irreversível é transmitido às gerações futuras, resultando em uma diminuição da diversidade genética nas populações e danos aos organismos nos locais afetados (Obiakor et al., 2012). Em tal situação, o teste é essencial para estudos de

biomonitoramento porque fornece à sociedade, respostas confiáveis sobre os níveis de qualidade ambiental.

Como resultado, estudos nessa linha são pertinentes, tendo os quelônios como biomonitores, pois muitos deles sofrem com os efeitos do ambiente externo que afetam sua fisiologia, ecologia e comportamento. Esses efeitos são, na maioria, regulados pelo ciclo hidrológico local e pela sazonalidade. Além disso, os quelônios são animais encontrados em vários locais e são extremamente importantes para estudos de qualidade ambiental (Moll e Moll, 2004).

Entre os quelônios, destaca-se *K. scorpioides* (Linnaeus, 1766), espécie semiaquática conhecida no Brasil como jurará ou muçua, com ampla distribuição geográfica e variedade reprodutiva, sendo facilmente encontrada em ambientes lacustres, rios e terrestres (Cabrera e Colantonio, 1997; Castro, 2006). Muitos espécimes estão expostos às degradações provocadas por ações antrópicas. Desse modo, o estudo dos efeitos de tensores ambientais é útil e permite uma melhor compreensão da saúde e qualidade do habitat. Ainda que as mudanças no DNA de uma espécie sejam sutis, elas precisam ser melhor explicadas porque a exposição a substâncias mutagênicas pode causar danos permanentes no material genético, colocando em risco a saúde dos animais (Valente et al., 2017).

Nesse sentido, o estudo foi conduzido para investigar a presença de micronúcleos (MN) e Anormalidades Nucleares (AN) nos eritrócitos de populações naturais e de cativeiro de *K. scorpioides*, comparando suas frequências com o tipo de ambiente, sexo e sazonalidade em uma Área de Proteção Ambiental (APA) na Amazônia Maranhense.

2. Material e Métodos

2.1. Área de estudo

A Baixada Maranhense é uma APA localizada na Amazônia Oriental Maranhense, reconhecida e inserida na Lista Ramsar em 29 de fevereiro de 2000 (MMA, 2000). Encontra-

se entre os Sítios Ramsar Brasileiros de grande importância, incluída no Plano Estratégico Nacional de Áreas Protegidas (PNAP) aprovado pelo Decreto n.º 5.758/06. Faz parte da Amazônia Legal brasileira, sendo uma zona úmida de interesse internacional (IBGE, 2021).

Conforme o grau de influência antrópica e impactos ambientais diretos e indiretos visíveis a partir da ocorrência ou não de desmatamentos, queimadas, destruição dos manguezais e campos, caça predatória e lixo urbano, agrupamos os pontos amostrais em três categorias: A1 – área urbanizada, A2 – área vegetada (Baixada Maranhense) e A3 – criadouro científico (animais oriundos do criadouro UEMA) utilizados como grupo controle deste estudo, mantidos sob autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Renováveis (IBAMA-MA), n.º 1899339/2008 (2°34'56.255'' 44°12'28.033'') (Figura 1).

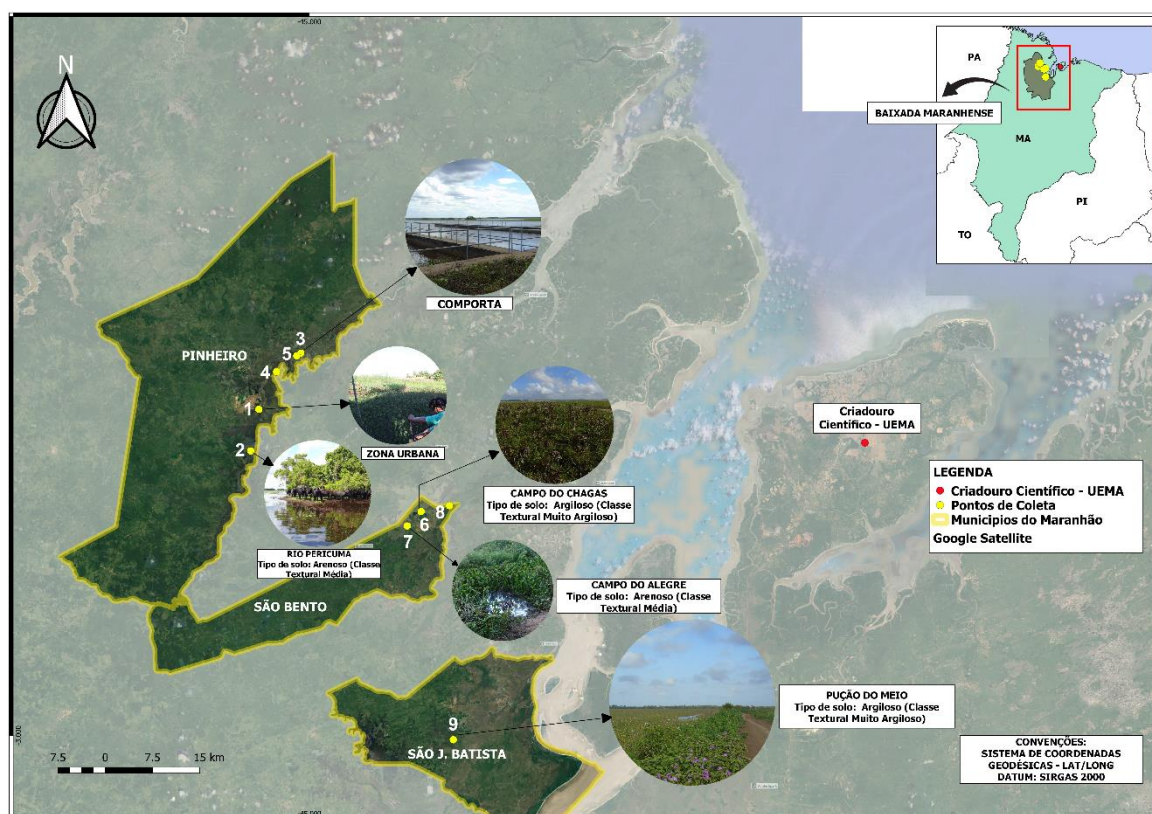


Figura 1. Localização dos pontos de captura dos animais agrupados em Área Urbanizada (1, 3 e 7) e Vegetada (2, 4, 5, 6, 8 e 9) em Pinheiro, São Bento e São João Batista na Baixada Maranhense, além do Criadouro Científico UEMA, São Luís, Maranhão, Brasil.

Os nove pontos de coleta localizam-se em regiões estratégicas que abrange a APA da Baixada Maranhense, para melhor amplitude dos dados, bem como mapeamento de regiões antropizadas ou não, como Pinheiro/MA (P1 - Maria Santa 02°30'55.008''

45°04'19.056"; P2 - alto pericumã 02°35.631' 045°05.053'; P3 - comporta 02°27.287' 045°00.715'; P4 - baixo pericumã 2.480615 45.046769; P5 - médio pericumã 2.458325 45.018187); São Bento/MA (P6 - campo do chagas 02°40.820' 044°50.441'; P7 - campo do alegre 02°42'03.3" 044°51'37.1"; P8 - defunto 2.671926 44.800434); São João Batista/MA (P9 - pução do meio 03°00.348' 044°47.686').

2.2. Parâmetros ambientais de água e solo

Variáveis abióticas da água foram obtidas ainda em campo nos lagos, próximas aos locais de captura dos animais, sempre no turno da manhã. Aferimos os parâmetros pH, Temperatura (T) e Oxigênio Dissolvido (OD) com auxílio de Medidor Multiparâmetro AK88®, sendo imerso numa profundidade de 4 metros divididos em 3 colunas d'água (3 replicatas), retirando-se a média dos valores obtidos das variáveis. Esses parâmetros são importantes do ponto de vista ecotoxicológico, uma vez que oferecem uma avaliação mais robusta sobre a qualidade dos corpos hídricos, além de serem elementos abordados em análises integradas com outros biomarcadores.

Coletou-se amostras de solo para análise química completa, considerando-se os elementos potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), alumínio (Al), complexo H+Al, saturação por bases (Sb), capacidade de troca catiônica (CTC) e micronutrientes como ferro (Fe), manganês (Mn), cobre (Cu), enxofre (S), zinco (Z) e matéria orgânica (MO). Para isso, foram necessárias 5 amostras simples, coletadas em zigue-zague em cada ponto para a formação de amostra composta. Utilizou-se um trado em uma profundidade de 20 cm conforme proposto por Martinhão e Lobato (2004). As amostras simples foram misturadas, originando um composto homogêneo, retirando-se desse, 600g de amostra, sendo, portanto, a amostra final representativa de cada ponto. Posteriormente, foram armazenados em saco plástico, fechado, identificado e encaminhados a laboratório especializado para análises.

2.3. Teste de micronúcleos e anormalidades nucleares eritrocitárias em *K. scorpioides*

Para as análises biológicas, o protocolo de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), n.º 10/2021 e seguimos todos os princípios de bem-estar animal recomendados. Para captura dos animais, o estudo possuiu permissão via licenciamento do Sistema de Informação e Autorização em Biodiversidade – SISBIO, registro n.º 85805-1. Os exemplares foram capturados com auxílio de armadilha de pesca artesanal do tipo covó (*funnel traps* com formato circular), entre os meses de agosto e outubro/2021; abril, junho, outubro e dezembro/2022 e março/2023 na Baixada Maranhense.

Considerou-se, na pesquisa, 112 indivíduos de *K. scorpioides* (incluindo animais do criadouro), tendo o grupo A1 (N=39), A2 (N=50) e A3 (N=23).

O teste de MN foi realizado conforme metodologia de Grisolia et al., (2009) com adaptações. Antes da coleta de sangue, realizou-se todos os cuidados necessários de bem-estar animal, de modo a evitar o estresse deles durante os procedimentos e contaminação cruzada das amostras. Para isso, higienização dos equipamentos cirúrgicos, bem como do local foram realizados. Após esses cuidados, os animais foram submetidos à extração de amostra sanguínea por meio de punção de veia na região occipital da cabeça, estando ele com a musculatura relaxada, com auxílio de seringa com agulha hipodérmica 3 mL de calibre 22 mm. Dispensamos o uso de anestésico, uma vez que interfere nos resultados do teste.

Foram produzidas duas lâminas por animal, totalizando 224 esfregaços sanguíneos. Em cada uma delas pingou-se aproximadamente 30 uL de sangue, sendo posteriormente secas em temperatura ambiente por 24 horas, seguidas de fixação em metanol gelado a 10% por 20 minutos e posteriormente coradas em solução Giemsa 10%, diluída em tampão fosfato 0.2M KH_2PO_4 . As lâminas foram lavadas em água corrente e secas em temperatura ambiente e posteriormente verificadas em microscópio óptico, estabelecendo a técnica de visualização da lâmina por zigue-zague em objetiva com aumento 100x, com esforço

amostral de 30 minutos para cada lâmina, examinando-se 1.000 eritrócitos por lâmina, totalizando 2.000 por tartaruga (Fonseca et al., 2014) (Anexo G).

2.4. Análise de dados

Realizamos Análise de Variância (ANOVA *one-way*) para avaliar diferenças entre os ambientes, período sazonal e sexo, além de estatística sumária de média e desvio padrão. Organizamos os dados em tabelas descritivas para melhor visualização e interpretação. Utilizamos o programa estatístico Past 4.08 (*Paleontological Statistics Software*), considerando um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3. Resultados

3.1. Parâmetros ambientais de água e solo da Baixada Maranhense

As variáveis físico-químicas da água em que os exemplares de *K. scorpioides* foram amostrados em diferentes pontos de coletas de A1, apresentaram médias inferiores de OD em A1 e A2, nas duas estações climáticas; baixo pH em A2 na estiagem e temperatura dentro dos limites toleráveis pela legislação CONAMA (Tabela 1).

Variáveis abióticas		A1		A2	
		Estiagem	Chuvoso	Estiagem	Chuvoso
OD	Mínimo	2,60	2,50	0,80	0,30
	Máximo	6,00	4,30	6,90	3,10
	Média $\pm$ DP	4,24 $\pm$ 1,41*	3,40 $\pm$ 1,27*	3,71 $\pm$ 1,86*	2,20 $\pm$ 1,28*
pH	Mínimo	5,60	6,00	3,70	5,70
	Máximo	7,70	6,30	7,20	7,70
	Média $\pm$ DP	6,28 $\pm$ 0,82	6,15 $\pm$ 0,21	5,79 $\pm$ 0,94*	6,70 $\pm$ 0,82
Temperatura	Mínimo	28,95	28,20	27,30	28,20
	Máximo	30,40	29,00	30,80	30,40
	Média $\pm$ DP	29,60 $\pm$ 0,64	28,60 $\pm$ 0,57	28,87 $\pm$ 1,26	29,30 $\pm$ 0,91

*Para valores em desacordo com a Resolução CONAMA n.º 357/2005 e n.º 430/2011 (Valores de referência para água: OD > 5,0; pH 6,0 a 9,0; Temperatura < 40 °C. **Dados não publicados.

Tabela 1. Estatística sumária das variáveis físico-químicas da água de diferentes ambientes (A1 e A2) de captura de *K. scorpioides* na Baixada Maranhense nos meses de agosto e outubro/2021; abril, junho, outubro e dezembro/2022 e março/2023 nos períodos de estiagem e chuvoso na Baixada Maranhense. DP = desvio padrão; pH = potencial hidrogeniônico; OD = oxigênio dissolvido.

No solo, os elementos K e Ca apresentaram maiores médias em A1 na estiagem. Mg e a saturação por bases registraram médias maiores em A2 na estiagem, enquanto Al, H + Al e CTC houve maiores médias em A2 no período de estiagem (Tabela 2). Sobre os micronutrientes, os valores médios de Fe, Mn, Cu e Zn foram superiores em A2 na estiagem. Enxofre também apresentou maior média em A1 nessa estação (Tabela 2).

Variáveis abióticas		A1		A2	
		Estiagem	Chuvoso	Estiagem	Chuvoso
Elementos*					
K	Mínimo	0,21	-	0,04	0,09
	Máximo	0,87	-	0,81	0,75
	Média ± DP	0,48 ± 0,35 ^a	-	0,47 ± 0,29 ^a	0,34 ± 0,36 ^a
Ca	Mínimo	1,19	-	1,17	0,31
	Máximo	6,66	-	5,93	7,59
	Média ± DP	3,89 ± 2,74 ^b	-	3,86 ± 1,58 ^b	2,81 ± 4,14 ^b
Mg	Mínimo	2,82	-	1,90	0,73
	Máximo	6,50	-	7,59	5,60
	Média ± DP	4,76 ± 1,85 ^c	-	5,62 ± 2,00 ^c	2,73 ± 2,55 ^c
Al	Mínimo	0,17	-	2,33	2,13
	Máximo	1,69	-	26,58	9,64
	Média ± DP	0,80 ± 0,79	-	6,79 ± 9,71	6,69 ± 4,01
H + Al	Mínimo	3,59	-	13,09	16,36
	Máximo	12,88	-	35,94	24,05
	Média ± DP	7,94 ± 4,67 ^d	-	19,99 ± 8,04 ^d	20,53 ± 3,89 ^d
SB	Mínimo	4,22	-	3,30	1,10
	Máximo	14,00	-	12,90	13,90
	Média ± DP	9,12 ± 4,89 ^e	-	9,91 ± 3,50 ^e	5,87 ± 6,99 ^e
CTC	Mínimo	7,82	-	21,90	22,30
	Máximo	22,01	-	47,90	30,30
	Média ± DP	17,07 ± 8,02 ^f	-	29,94 ± 1,26 ^f	26,42 ± 4,00 ^f
Micronutrientes					
Ferro	Mínimo	270,23	-	274,75	151,21
	Máximo	993,47	-	1131,20	853,32
	Média ± DP	587,47 ± 369,70	-	622,15 ± 363,61	416,11 ± 381,46
Manganês	Mínimo	7,68	-	30,04	7,08
	Máximo	35,65	-	134,67	47,01
	Média ± DP	23,72 ± 14,43	-	72,55 ± 37,92	21,54 ± 22,13
Cobre	Mínimo	0,27	-	0,48	0,42
	Máximo	0,83	-	1,18	0,83
	Média ± DP	0,63 ± 0,31	-	0,80 ± 0,25	0,65 ± 0,21
Enxofre	Mínimo	102,75	-	102,75	2,92
	Máximo	188,80	-	199,37	79,95
	Média ± DP	158,07 ± 48,01	-	136,80 ± 40,44	35,31 ± 39,95
Zinco	Mínimo	1,14	-	2,32	1,49

Máximo	3,87	-	7,92	8,58
Média ± DP	2,48 ± 1,37	-	5,29 ± 2,21	4,08 ± 3,91

Classe de interpretação de teores em solo para K: muito baixo (0-30), ^a baixo (31-60), médio (61-120), alto (121-235) e muito alto (>235). Ca: baixo <1,5, ^b médio 1,5-4,0, alto >4,0. Mg: baixo <0,5, médio 0,5-1,0, ^c alto >1,0. H+Al: baixo <2,5, médio 2,5-5,0, ^d alto >5,0. SB: baixo <2,0, médio 2,0-5,0, ^e alto >5,0. CTC: baixo <4,5, médio 4,5-10, ^f alto >10. Letras minúsculas diferentes indicam a categoria do nível de concentração do elemento químico nos solos dos pontos de coleta (p<0,05) conforme definido por Prezotti e Guaçoni (2013). Dados não publicados.

Tabela 2: Concentrações dos elementos químicos e de micronutrientes presentes no solo correspondente aos diferentes ambientes (A1 e A2) de captura de *K. scorpioides* na Baixada Maranhense nos meses de agosto e outubro/2021; abril, junho, outubro e dezembro/2022 e março/2023 nos períodos de estiagem e chuvoso na Baixada Maranhense.

Sobre a granulometria, em A1, a maior média foi de areia (453,67 ± 206,00) em período chuvoso e A2 demonstrou maiores valores de silte/argila nas duas estações climáticas (Tabela 3).

Granulometria		A1		A2	
		Estiagem	Chuvoso	Estiagem	Chuvoso
Areia	Mínimo	248,00	-	110,00	170,00
	Máximo	660,00	-	540,00	236,00
	Média ± DP	453,67 ± 206,00	-	275,33 ± 148,93	197,33 ± 34,43
Silte	Mínimo	140,00	-	110,00	234,00
	Máximo	222,00	-	505,00	384,00
	Média ± DP	176,33 ± 41,79	-	249,67 ± 155,87	306,00 ± 75,18
Argila	Mínimo	200,00	-	330,00	380,00
	Máximo	530,00	-	750,00	580,00
	Média ± DP	370,00 ± 165,23	-	475,00 ± 174,79	496,67 ± 104,08

* Dados não publicados.

Tabela 3. Granulometria do solo correspondente ao habitat dos exemplares amostrados de *K. scorpioides*, durante as coletas entre os meses de agosto e outubro/2021; abril, junho, outubro e dezembro/2022 e março/2023 nos períodos de estiagem e chuvoso na Baixada Maranhense (A1 e A2).

Sobre os níveis de matéria orgânica, encontrou-se valores elevados em A2 (média de 29,16 g/kg) quando comparados a A1 (média de 15,95 g/kg). Esses valores de A2 contribuíram com a elevação do nível de CTC (21,94 a 47,93 cmol_c/dm³). Em A1, esses números variaram de 7,82 a 21,38 cmol_c/dm³.

3.2. Micronúcleos e anormalidades nucleares nos eritrócitos de *K. scorpioides*

Sobre as análises do teste de MN, no que se refere às 224 amostras de esfregaços sanguíneos produzidas, 60 (26.78%) delas mostraram pelo menos algum tipo de alteração na morfologia nuclear eritrocitária, além de MN. Dessas 60 amostras, 20 (33.33%) evidenciaram MN e 57 (95%) algum tipo de ANE.

Contabilizamos maior número de eritrócitos com MN em A2 (N=71). Em A1, registrou-se N=20. Além disso, os tipos de ANE encontradas foram: eritrócito binucleado (BI), núcleos entalhados (NE), lobulados (NL), segmentados (NS) e deslocados (ND) (Figura 2). Não identificamos MN e outras ANE nas 46 amostras de animais de cativeiro. Os valores na Tabela 4 referem-se às áreas A1 e A2.

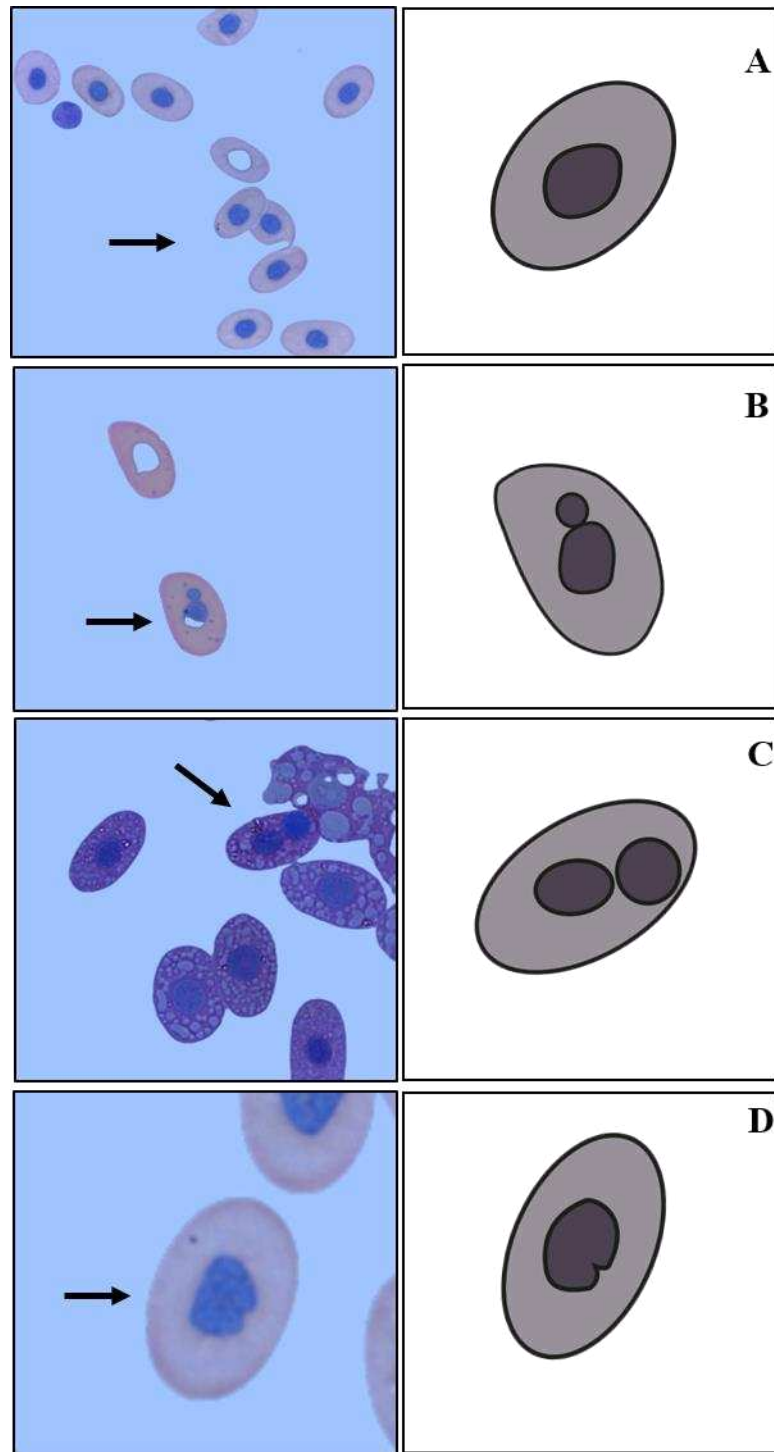


Figura 2. Eritrócitos de *K. scorpioides*. Apresentação de MN e ANE's em eritrócitos de espécimes capturados nas áreas A1 e A2 na Baixada Maranhense com a utilização de corante Giensa 10% e visualização em objetiva de 100x: as setas pretas indicam em **A** - Eritrócitos Normais; **B** - Eritrócito com Micronúcleo; **C** - Eritrócito Binucleado; **D** - Núcleo Entalhado; **E** - Núcleo Lobulado; **F** - Núcleo Segmentado e **G** - Núcleo Deslocado.

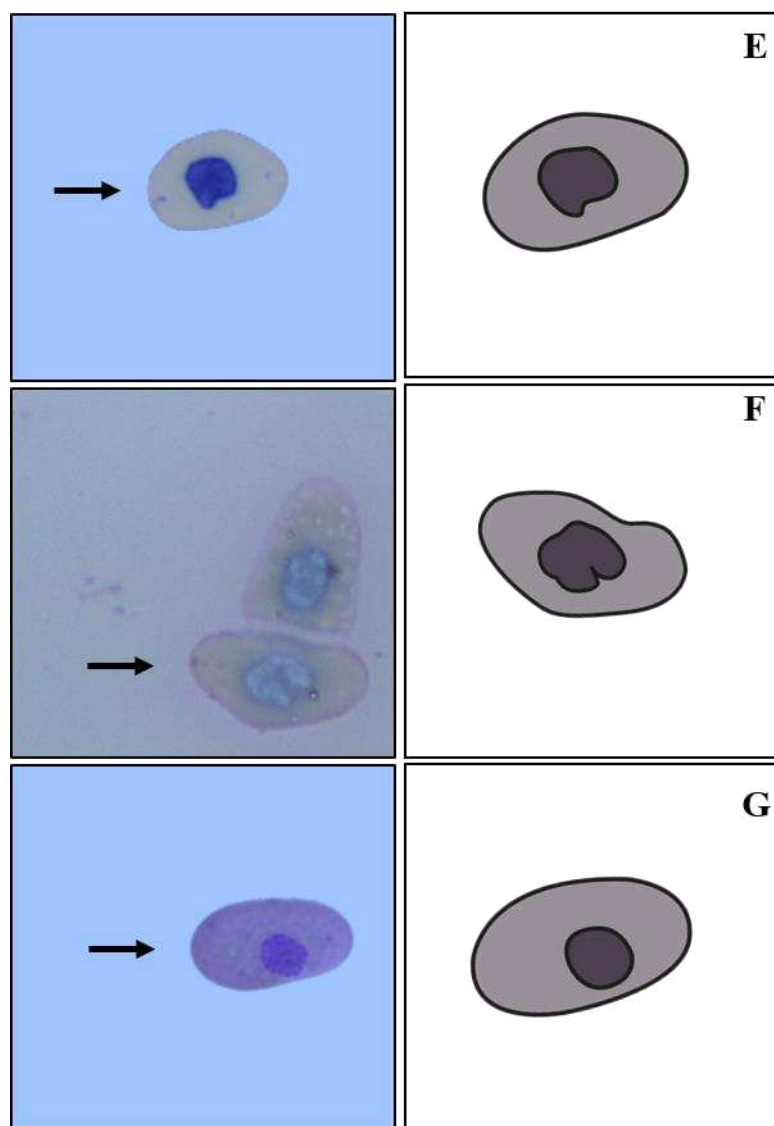


Figura 2 (continuação). Eritrócitos de *K. scorpioides*. Apresentação de MN e ANE's em eritrócitos de espécimes capturados nas áreas A1 e A2 na Baixada Maranhense com a utilização de corante Giensa 10% e visualização em objetiva de 100x: as setas pretas indicam em **A** - Eritrócitos Normais; **B** - Eritrócito com Micronúcleo; **C** - Eritrócito Binucleado; **D** - Núcleo Entalhado; **E** - Núcleo Lobulado; **F** - Núcleo Segmentado e **G** - Núcleo Deslocado.

Entre os 490 eritrócitos contabilizados, ND ocorreu em maior número (N=253; 51,63%); diferentemente de BI que apareceram em menor quantidade (Tabela 4). Eritrócitos com NE, NL e ND foram as anormalidades mais recorrentes na maioria das amostras.

Abreviação	Variável	N.º de eritrócitos	Frequência (%)
MN	Micronúcleo	91	18,57
BI	Binucleado	14	2,85
NE	Núcleo Entalhado	81	16,53
NL	Núcleo Lobulado	35	7,14
NS	Núcleo Segmentado	16	3,26
ND	Núcleo Deslocado	253	51,63
Total		490	100

Tabela 4. Análise quantitativa dos tipos de Anomalias Nucleares Eritrocitárias (ANE's) registradas em amostras de *K. scorpioides* capturados em A1 e A2 na Baixada Maranhense, Maranhão, Brasil.

Comparando-se as médias das variáveis correspondentes ao MN e AN conforme o ambiente, sexo e período sazonal, percebeu-se que ND foi superior em A1 ($4,66 \pm 0,81$). No entanto, verificamos diferenças significativas de NL entre A1 e A2 ($p < 0,05$) (Tabela 5).

Quando se verificou as médias das variáveis por período sazonal, detectamos diferenças estatisticamente significativas para NS ($p=0,02949$) e ND ($p=0,0008336$) nos eritrócitos de *K. scorpioides*, com valor superior na estiagem ($5,27\pm0,90$) (Tabela 5). Dessa forma, notou-se que o ambiente e a estação climática interferem diretamente no surgimento de ANE's nos animais. O sexo não interferiu no aparecimento dessas anormalidades, e as maiores médias detectadas apresentaram valores aproximados entre machos ($4,30\pm0,76$) e fêmeas ($4,36\pm0,79$) com ND nos eritrócitos.

Variável	Ambiente		p-valor ¹	Sexo		p-valor ¹	Período		p-valor ¹
	A1	A2		Macho	Fêmea		Estiagem	Chuvoso	
	Média±DP	Média±DP		Média±DP	Média±DP		Média±DP	Média±DP	
MN	1,06±0,44	1,51±0,56	0,4164	1,50±0,57	1,54±0,57	0,9088	0,97±0,58	1,13±0,47	0,8600
NE	1,44±0,41	1,35±0,33	0,8628	1,37±0,34	1,30±0,33	0,5844	1,57±0,41	1,52±0,44	0,1338
NL	0,63±0,18	0,58±0,15	0,02839*	0,59±0,15	0,59±0,15	0,7112	0,63±0,18	0,68±0,19	0,9860
NS	0,21±0,08	0,26±0,08	0,9590	0,27±0,08	0,27±0,08	0,6536	0,34±0,11	0,22±0,09	0,02949*
BI	0,23±0,08	0,23±0,06	0,3521	0,22±0,06	0,23±0,06	0,2660	0,21±0,08	0,25±0,08	0,1176
ND	2,74±0,49	4,66±0,81	0,05789	4,30±0,76	4,36±0,79	0,6065	5,27±0,90	2,63±0,52	0,0008336*

Legenda: **MN:** Micronúcleo; **NE:** Núcleo Entalhado; **NL:** Núcleo Lobulado; **NS:** Núcleo Segmentado; **BI:** Binucleado; **ND:** Núcleo Deslocado, ¹Teste de ANOVA One-way/*Diferença significativa ($p<0,05$).

Tabela 5. Estatística sumária das frequências de Micronúcleos e Anormalidades Nucleares Eritrocitárias (ANE's) em machos e fêmeas de *K. scorpioides* (N = 60) da Baixada Maranhense (A1 e A2), em diferentes períodos (estiagem e chuvoso), nos meses de agosto e outubro/2021; abril, junho, outubro e dezembro/2022 e março/2023.

A média e desvio padrão de MN detectados em espécimes adultos de *K. scorpioides* ($1,13 \pm 0,47$) diferiram de outros quelônios (Tabela 6).

Espécie	Ambiente	Média	DP	Fase de vida	Estudo
<i>Kinosternon scorpioides</i>		1,13	0,47	Adultos	Presente estudo
<i>Trachemis callirostris</i>		1,25	0,91	Adultos	Zapata et al. (2016)
<i>Phrynops hilarii</i>	Dulcícola	0,62	0,18	Juvenis/Adultos	Latorre et al. (2015)
<i>Podocnemis expansa</i>		0,60	0,60	Filhotes	Frossard et al. (2020)
<i>Chelonia mydas</i>		0,78	0,58	Filhotes	Frossard et al. (2020)
<i>Chelonia mydas</i>	Marinho	3,56	1,59	Juvenis	Silva et al. (2016)
<i>Lepidochelys olivácea</i>		10,0	3,60	Adultos	Herrera e Baena (2017)
<i>Caretta caretta</i>		15,82	15,16	Juvenis/Adultos	Casini et al. (2018)

Fonte: Adaptado de Frossard et al. (2020).

Tabela 6. Comparação entre médias e desvio padrão (DP) de micronúcleos encontrados em eritrócitos de *K. scorpioides* com outras espécies de quelônios em ambientes marinho e dulcícola do Brasil.

4. Discussão

Nossas descrições das frequências de micronúcleos em sangue de *K. scorpioides* foram semelhantes às de outras espécies de quelônios aquáticos; por exemplo, *Trachemys callirostris* (Gray, 1855) em seu ambiente natural, apresentou 79 micronúcleos nos eritrócitos (Zapata et al., 2016). Nossos resultados mostraram outras anormalidades nucleares em *K. scorpioides*, apesar da maioria dos estudos se limitarem apenas à avaliação de micronúcleos.

Métodos recentes têm demonstrado ser eficazes na detecção de micronúcleos e outros danos eritrocitários, particularmente em répteis e aves. Essas técnicas desempenham um papel importante no fornecimento de informações, pois são instrumentos que respondem aos possíveis impactos na fauna aquática (Baos et al., 2006). Os relatos de anomalias nucleares em quelônios ainda são limitados e a maioria deles usam o teste de micronúcleos. Estudos com *Phrynops hilarii* (A.M.C. Duméril & Bibron, 1835), *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758), *Trachemys callirostris* e *Lepidochelys olivácea* (Eschscholtz, 1829) têm sido difundidos e eficazes sobre essa temática (Silva et al., 2016; Zapata et al., 2016; Herrera e Baena, 2017; Castanõ et al., 2020; Frossard et al., 2020).

Assim, os resultados deste estudo são particularmente interessantes porque ainda não há evidências ou trabalhos relacionados ao levantamento de micronúcleos e outras anomalias eritrocitárias em *K. scorpioides*.

O teste do micronúcleo é um excelente método para detectar alterações genéticas ligadas ao cromossomo, sejam numéricas ou estruturais na divisão celular, sendo, portanto, bons indicadores de toxicidade e dos efeitos de poluentes na integridade celular (Azevedo et al., 2012). Segundo Udrou (2006) e Pinheiro-Sousa (2015), embora a maioria dos estudos sobre micronúcleos se concentre em mamíferos aquáticos, essa técnica é fundamental para buscar identificar fatores mutagênicos na fauna. Investigações apontam que os MN formam-se a partir de anormalidades nucleares, como NE, NL, ND e BI (Shimizu et al., 2000; Mesak et al., 2019).

Nossos resultados mostraram números nulos de micronúcleos em *K. scorpioides* de cativeiro. É possível que um dos fatores que interferem na frequência dessas anomalias seja o baixo número de indivíduos no recinto (Poletta, 2011). Além disso, os estressores ambientais causadores de alterações no núcleo celular não estão comumente presentes em animais de cativeiro. Sobre o número amostral de animais de criadouro em estudos anteriores, comparados aos de natureza, Zapatta et al. (2016) e Latorre et al. (2015) encontraram um quantitativo semelhante aos nossos (20 e 32 animais, respectivamente). Já foram documentados números menores ou nulos de micronúcleos em *Macrolemys temminckii* (Troost, 1835) e *Kinosternon subrubum* (Bonnaterre, 1789) de criadouro e *in situ* (Zuniga-Gonzalez et al., 2001).

Apesar de não haver diferença estatística significativa, as médias de micronúcleos dos animais de A2 foram maiores que A1. Esses resultados corroboram com os estudos de Castaño et al. (2020) para espécimes encontrados em áreas vegetadas ($3,33 \pm 0,62$) e também são consistentes aos de Zapata et al. (2016), que encontraram média superior

($8,04 \pm 7,08$) em *T. callirostris* capturados em rio e expostos a estressores. A ausência de significância e o baixo número de micronúcleos em indivíduos *in situ* pode ser atribuída à capacidade da espécie de se adaptar às condições e modificações ambientais regionais (Cafofo-Silva et al., 2009).

Embora os animais deste estudo terem sido capturados em áreas urbanizadas e vegetadas de uma APA no Maranhão, com diferentes graus de influência antrópica, nossos resultados mostraram um nível de resposta na frequência de micronúcleos inferior, indicando que os impactos ambientais diretos ainda não ocorrem nessas áreas. Esses dados são comparáveis aos de Moron et al. (2019) em um estudo com sangue periférico de *P. expansa* de uma APA no Estado do Tocantins. Em estudos anteriores, os micronúcleos mostraram melhores respostas em eritrócitos de *P. hilarii* e *Caretta caretta* (Linnaeus, 1758) (Latorre et al., 2015; Casini et al., 2018). A variação no quantitativo dessa anormalidade implica necessariamente na qualidade do ambiente, uma vez que ocorre em maior frequência em animais de áreas afetadas por tensores no meio aquático, causando desequilíbrios e prejudicando a sobrevivência das espécies (Gabiatti, 2021).

Autores como Matson et al. (2005) descobriram que os efluentes industriais ocasionaram valores absolutos de micronúcleos em *Emys orbicularis* (Linnaeus, 1758) (N = 23) e Borrat et al. (2011) para *C. mydas* (N = 1,254) expostas aos impactos de atividade agrícola em área urbanizada. Os valores absolutos de micronúcleos apresentados por esses pesquisadores superaram os encontrados no presente estudo em A1 (N = 20). Ainda assim, a pesquisa de Castaño et al. (2020), indicou que a maior frequência de anormalidade nuclear em animais de áreas urbanizadas e vegetadas está ligada às atividades antrópicas e agrícolas, com um impacto significativo na fauna aquática. Assim, os números baixos de micronúcleos e anomalias nucleares encontrados em organismos

de vários locais da Baixada Maranhense podem indicar que eles ainda não foram expostos a fontes de poluição.

As respostas do teste do micronúcleo não mostraram variação significativa entre os sexos, confirmando ser um fator que não interfere no aparecimento de alterações nucleares. Estudos semelhantes demonstram esse mesmo padrão, como Borges et al. (2022) que examinou a saúde de *Podocnemis unifilis* (Troschel, 1848) em uma Reserva de Desenvolvimento Sustentável no Amazonas, Amazônia brasileira, registrando eritrócitos com núcleos lobulados e segumentados. Ao analisarmos diferentes ambientes e períodos sazonais, descobrimos diferenças estatísticas significativas de anormalidade nuclear eritrocitária do tipo núcleo lobulado em *K. scorpioides*, o que torna os dados dos autores um pouco diferente dos nossos.

As anormalidades nucleares eritrocitárias aqui descritas, mostraram um número maior de núcleos deslocados, que parece ser comum em *K. scorpioides* de ambiente natural em região urbana. Assim, isso indica que, em comparação com regiões vegetadas, os animais dessas áreas estão mais propensos a apresentar essa anomalia nos eritrócitos e o seu alto quantitativo em *K. scorpioides* pode ser ocasionado pelas condições ambientais, de acordo com as diferenças estatísticas de núcleo deslocado documentados em espécimes capturados na estiagem.

Embora a literatura afirme que essa anormalidade é bastante incomum, há registros já documentados em aves, indicando que elas reagem com maior frequência de núcleos deslocados quando expostos a poluentes, apresentando eritrócitos com núcleos com rotações e deslocamentos diferentes no citoplasma (Gonçalves, 2022; Souza et al., 2017), e isso também foi confirmado em *K. scorpioides*.

Sobre o deslocamento anormal do núcleo, Oliveira (2020) descobriu anomalias significativas em células de *P. expansa* afetadas por estressores. Isso também foi

observado em neonatos, quando expostos a nanopartículas de óxido de zinco (Araújo et al., 2019). Essas informações reforçam a necessidade de pesquisas adicionais para identificar poluentes em sangue de tartarugas para melhor caracterizar o impacto deles nas populações de quelônios, especialmente de *K. scorpioides*.

Núcleo entalhado foi a terceira anomalia mais comum em *K. scorpioides*. Nos estudos de Carrasco et al. (1990), ela foi a segunda com maior registro em peixes de áreas poluídas, e também por Quero et al. (2016) em aves, representando 74% dos espécimes de uma área protegida na Argentina, sendo considerado um biomarcador específico de danos genéticos em aves Passeriformes.

Nosso estudo registrou menor quantidade de eritrócitos binucleados. Essa anomalia apresenta-se com dois núcleos dentro da célula, separados ou associados, com tamanhos e cores semelhantes (Jindal e Verma, 2015). Corroborando com o nosso trabalho, Quero et al. (2016) verificaram uma baixa frequência em aves. Os autores propuseram utilizar essa anormalidade como biomarcador para avaliar a qualidade ambiental usando os passeriformes, pois são animais comuns em ambientes impactados. Na mesma linha, Souza et al. (2017) encontraram números elevados de eritrócitos binucleados em periquitos em locais de grande influência de tensores industriais, sugerindo que esses estressores podem afetar a estabilidade do DNA. Em nosso estudo encontramos uma menor frequência de binucleados, o que pode indicar que os animais não foram expostos aos impactos da APA. Para a conservação *in situ*, as principais estratégias a serem implementadas incluem o manejo sustentável dos campos, com envolvimento dos setores de produção, governo e comunidade local; controle extensivo da pecuária na região; fiscalização contínua para evitar queimadas e desmatamentos na APA, além de ações de educação ambiental.

Observamos pequenas variações na temperatura da água nos locais de captura dos animais e discutimos a relação dos parâmetros ambientais com as anormalidades eritrocitárias, incluindo os micronúcleos. Isso pode ter sido um dos fatores que contribuíram para a baixa frequência de eritrócitos binucleados em *K. scorpioides*. Autores como Çavas e Ergene-Gözükar (2005) constataram que a elevação da temperatura da água provocou danos ao DNA em *Mugil cephalus* (Linnaeus, 1758), sendo confirmado pela ocorrência de micronúcleos e núcleos binucleados. Isso reforça a ideia de que esse parâmetro pode ter certa influência no surgimento dessa anomalia em animais aquáticos.

Uma análise integrada das diferentes metodologias aplicadas em estudos de biomonitoramento ambiental, como parâmetros físico-químicos de água incluindo oxigênio dissolvido, pH e temperatura e concentrações de elementos químicos no solo, quando combinados com estudos com biomarcadores mutagênicos, produzem resultados significativos sobre a saúde animal e ambiental, sugerindo ações específicas em áreas afetadas por atividades humanas, especialmente na Baixada Maranhense. Como esses parâmetros influenciam no metabolismo, crescimento, disponibilidade de nutrientes e toxicidade, é imperativo que os trabalhos de biomonitoramento ambiental utilizem os animais aquáticos para analisá-los (Moro et al., 2013).

No contexto atual, um dos pontos inseridos em A1 está localizado na cidade de Pinheiro (MA), tendo a ocupação desse município ocorrida de forma intensa e desordenada, o que prejudica a qualidade do ecossistema por causa das fontes antrópicas locais, que afetam o tipo de solo, a biologia animal, os corpos hídricos e a vegetação (Gomes, 2017). O despejo irregular de lixo e esgotos domésticos das residências que estão próximas aos pontos amostrais são exemplos de impactos constantes em áreas urbanizadas, e essas informações confirmam nossos resultados. Na mesma direção,

Gomes (2017) encontrou as mesmas fontes poluidoras em ambientes aquáticos de áreas urbanas, afetando significativamente a qualidade da água e, portanto, os organismos. Como observado por Nunes (2011), os principais fatores que poluem os lagos e rios das cidades são o esgoto doméstico *in natura*, os fertilizantes e águas provenientes de regiões urbanizadas.

No presente estudo, os níveis de OD entre A1 e A2 não atenderam aos padrões estabelecidos pelo CONAMA n.º 357/2005 e Portaria n.º 2914/2011 do Ministério da Saúde ($\geq$ a 5,0 mg/L). Os valores médios de pH, por outro lado, estão de acordo com legislação ambiental mencionada, com concentrações aceitáveis entre 6,0 a 9,0. Moron et al. (2019) afirmaram que esses valores também se aplicam a quelônios. Para entender a qualidade das áreas, foi necessário avaliar os níveis de OD neste estudo. Isso mostra que é um indicador da saúde ambiental e limita a vida aquática, pois a queda das concentrações desse indicador pode limitar a vida das espécies aquáticas.

Os solos acumulam elementos-traço que impactam a fauna aquática, o que os torna cruciais para o transporte de xenobióticos nos ecossistemas. Isso é porque eles são excelentes recursos para detectar a presença de poluentes em corpos hídricos (Lima et al., 2001; Jesus et al., 2004). Para o biomonitoramento de áreas impactadas, é necessário avaliar os componentes químicos do solo. Ainda que elementos como Al, Pb, Cu, Fe, Mn e Zn estejam presentes em baixas quantidades na natureza, eles ainda podem ser fontes de toxicidade, pois são reativos e mutagênicos, causando estresse oxidativo e danos irreversíveis no DNA em concentrações pequenas (Essington, 2004; Lushchak, 2011).

Observamos altas concentrações de Ca e Mg em A1, bem como de H+Al em A2. A falta desses elementos pode indicar que o solo está contaminado, pois quando combinados, impedem que os elementos sejam tóxicos para as plantas, que geralmente são alimentos para os animais. Além disso, do ponto de vista ambiental, um excesso deles

no solo causa escoamento superficial, que contamina os lençóis freáticos e leva fertilizantes ou defensivos agrícolas para lagos e rios. Isso causa desequilíbrios no ecossistema, principalmente para os humanos e animais que usam a água para consumo.

A presença de CTC no solo é fundamental para avaliar a sua qualidade, pois são excelentes indicadores de natureza química e suas concentrações estão ligadas ao tipo de uso da área, como criação de animais e pastagem natural (Araújo; Goedert; Lacerda, 2007). Os valores altos em A2 sugerem que o solo ainda não foi afetado pelos contaminantes, indicando solo preservado. De acordo com Silva (2016), os altos teores de CTC permitem que o solo retenha nutrientes e poluentes iônicos, o que diminui as chances de contaminação hídrica e efeitos negativos na saúde animal.

Os dados referentes aos níveis de MO documentado neste estudo foram considerados elevados. No estudo de Santos e Zanello (2016), os níveis de MO encontrados na maioria dos solos do Maranhão são elevados e o acúmulo potencial desse parâmetro contribui para os altos níveis de CTC observados em nosso estudo. Lima (2010) verificou que os solos de regiões preservadas em Minas Gerais tinham médias maiores de MO. Isso indica que o solo apresentou uma grande capacidade de retenção diante da elevação da variável CTC.

Devido à facilidade de lixiviação dos nutrientes, o cobre é frequentemente encontrado em solos argilosos. É crucial na reprodução de tartarugas, especialmente na formação de ovos, transporte de oxigênio, energia e atividade enzimática. Isso reduz a probabilidade de nascimento e tem um impacto negativo no tamanho corporal delas (Sousa et al., 2018).

Por outro lado, deficiências de Zn mais significativas já estão presentes em solos argilosos. A1 apresentou médias altas para esse elemento. Prezotti e Garçoni (2013) reforçam que altas doses de fertilizantes, particularmente os fosfatados, podem reduzir

significativamente a concentração de Zn em solos argilosos. Isso pode ser explicado pela presença de fertilizantes no solo das áreas vegetadas, que contribuem para a diminuição dos níveis no ambiente. Quando encontrados em baixas concentrações, o cobre e o zinco desempenham funções nas enzimas, mas mesmo em baixas concentrações, causam danos à saúde animal.

A1 apresentou altos níveis de ferro e sódio, o que pode indicar a presença de poluentes. Ainda que esses metais estejam presentes naturalmente no solo, eles também podem entrar por vias não naturais por causa da atividade antrópica, fertilizantes agrícolas, esgotos domésticos, industriais e outros fatores. Com relação a isso, Lima (2010) encontrou níveis elevados de ferro em solos em áreas vegetadas de Minas Gerais. No entanto, como não há parâmetros legais para prevenção e investigação, não é possível comparar esses níveis com outros locais.

5. Conclusão

Nosso estudo originou dados pioneiros da ocorrência de micronúcleos e anormalidades nucleares eritrocitárias em uma espécie de tartaruga amazônica de área protegida no Maranhão, demonstrando diferenças e relações significantes com o ambiente e estação climática, responsáveis por danos genéticos irreversíveis aos animais. Documentamos frequências nulas de micronúcleos e anormalidades nucleares em espécimes de criadouro, ao contrário daqueles de ambiente natural com respostas mutagênicas não diferindo entre os sexos.

As respostas mutagênicas mostraram ser um importante biomarcador em estudos envolvendo o *K. scorpioides* de ambiente natural e controlado, sugerindo que não há evidências de danos à saúde desses animais mantidos em criadouro, e que a ocorrência de micronúcleos e demais anomalias em indivíduos *in situ* sinaliza para a importância da manutenção das áreas protegidas para a conservação das espécies de tartarugas de água

doce em região amazônica, além de contribuir ecologicamente na redução dos impactos na APA. Logo, recomendamos ensaios genéticos mais robustos com o uso de biomarcadores mutagênicos, de modo a melhor caracterizar e identificar danos genéticos ocasionados, na grande maioria, pela exposição a poluentes. Dessa forma, *K. scorpioides* mostrou ser um bom biomonitor, pois gerou respostas mutagênicas em uma espécie silvestre amazônica.

6. Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (Finanças Código 001); ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual do Maranhão (PPGCA/UEMA) pelo incentivo à pesquisa; aos Laboratórios de Biomarcadores em Organismos Aquáticos (LABOAq) e Biodiversidade Molecular (LaBimol) e à Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão – FAPEMA (Processo Universal n.º 00880/2019).

Referências

- Alves, M. R. 2002. Influência da incorporação de resíduos orgânicos a um latossolo vermelho amarelo e a ação das minhocas como agentes de descontaminação ambiental, Tese de Doutorado, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Carlos, 150p.
- Araújo, A. P. C.; Lima, V. S.; Vieira, J. E. A. V.; Mesak, C.; Malafaia, G. 2019. First report on the mutagenicity and cytotoxicity of Zn o nanoparticles in reptiles. *Chemosphere*, 235:556-564.
- Araújo, R.; Goedert, W. J.; Lacerda, M. P. C. 2007. Qualidade de um solo sob diferentes usos e sob cerrado nativo. *Revista Brasileira de Ciências do Solo*, 31, 1099 – 1108.

- Azevedo, J. S.; Braga, E. S.; Ribeiro, C. A. O. 2012. Nuclear abnormalities in erythrocytes and morphometric indexes in the catfish *Cathorops spixii* (Ariidae) from different sites on the southeastern Brazilian coast. *Brazilian Journal of Oceanography*, 60(3), 323–330.
- Borges, Â. O.; Erickson, J.; Silva, L. A.; Fantin, C.; Domingos-Moreira, F. X. V. 2022. Mercury bioaccumulation, genotoxic and biochemical biomarkers reveal the health status of yellow-spotted Amazon River turtles (*Podocnemis unifilis*) in an environmental protection area in the Amazon. *Acta Amazonica*, 52:254-263.
- Borrat, V.; Villar, S.; Marquez, A.; Martinez Souza, G.; Fallabrino, A.; Novello, A. 2011. Evaluación del estado de la tortuga verde (*Chelonia mydas*) mediante el uso de biomarcadores de genotoxicidad en el área protegida “Cerro verde e islas de La Coronilla” próximas al canal Andreoni. V Jornada sobre Tartarugas Marinhas do Atlântico Sul Ocidental 27-28, Novembro de 2011, Florianópolis, Brasil; p, 88-92.
- Brasil. 2005. Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA Resolução 357/2005, 580 Enquadramento do Corpos Hídricos Superficiais no Brasil, Governo Federal, Brasília, 581, Publicada no DOU 53, Seção 1, 58-63.
- Braga, B.; Hespanhol, I.; Conejo, J. G. L.; Mierzwa, J. C.; Barros, M. T. L.; Spencer, M.; Porto, M.; Nucci, N.; Juliano, N.; Eiger, S. 2005. Introdução à Engenharia Ambiental, São Paulo: Pearson Prentice Hall, Cap, 9, 125-159.
- Cabrera, M. R.; Colantonio, S. E. 1997. Taxonomic revision of the South American subspecies of the turtle *Kinosternon scorpioides*. *Journal Herpetology*, 31:507-513.
- Carrasco, K. R.; Tilbury, K. L.; Myers, M. S. 1990. Assessment of the Piscine Micronucleus Test as an in situ Biological indicator of Chemical Contaminant Effects. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 47:2123–2136.

- Cafofo-Silva, E. G.; Delariva, R. L.; Affonso, I. P. 2009. Distribuição espaço temporal de *Scinax fuscovarius* (Lutz, 1925) (Anura, Hylidae) em Maringá – PR, Brasil. *Revista em Agronegócios e Meio Ambiente*, 2, 431-445.
- Casini, S.; Caliani, I.; Giannetti, M.; Marsili, L.; Maltese, S.; Coppola, D.; Biachi, N.; Campani, T.; Ancora, S.; Caruso, C.; Furi, G.; Parga, M.; D'Agostino, A.; Fossi, M.C. 2018. First ecotoxicological assessment of *Caretta caretta* (Linnaeus, 1758) in the Mediterranean Sea using an integrated nondestructive protocol. *Science of The Total Environment*, 631–632, 1221-1233.
- Castanõ, G. V.; Cabagna, M. Z.; Prieto, Y.; Manzano, A. S. 2020. Analysis of genotoxicity in erythrocytes of turtles (*Phrynops hilarii*) from anthropized and natural sites of Entre Ríos, Argentina. *Journal of Basic & Applied Genetics*, 31:15-22.
- Castro, A. B. 2006. Biologia reprodutiva e crescimento do muçua *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1776) em cativeiro. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Pará (UFPA), Brasil, 101p.
- Çava, T.; Ergene-Gözükar, S. 2005. Teste de micronúcleo em células de peixes: um bioensaio para monitoramento in situ da poluição genotóxica no ambiente marinho. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 46:64-70.
- Costa, R. M. A.; Menk, C. F. M. 2000. Biomonitoramento de mutagênese ambiental. *Biotechnologia: ciência e desenvolvimento*, 3:24-26.
- Cotta, J. A. O.; Rezende, M. O. O.; Piovani, M. R. 2006. Avaliação do teor de metais em sedimento do rio Betari no Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira – PETAR, São Paulo, Brasil. *Química Nova*, 29(1), 40 – 45.
- Duarte, L. F. A.; Souza, C. A.; Nobre, C. R.; Pereira, C. D. S.; Pinheiro, M. A. A. 2016. Multi-level biological responses in *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Brachyura,

- Ucididae) as indicators of conservation status in mangrove areas from the western atlantic. *Ecotoxicol Environ Saf.* 133, 176–187.
- Essington, M. E. 2004. Soil and Water Chemistry: An integrative approach. *Soil and Water Chemistry: An integrative approach*, v, CRC Press, p. 534.
- Fonseca, L. A. 2014. Biomarcadores de estresse e carcinogênese: um estudo em *Chelonia mydas*. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), 92p.
- Frossard, A.; Coppo, G. C.; Lourenço, A. T.; Heringer, O. A.; Chippari-Gomes, A. R. 2020. Avaliação toxicological de metais em testudines. Tese de Doutorado, Universidade Vila Velha. 143p.
- Frossard, A.; Vieira, L. V.; Carneiro, M. T. W. D.; Gomes, L. C.; Chippari-Gomes, A. R. 2020. Accumulation of trace metals in eggs and hatchlings of *Chelonia mydas*. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 62.
- Gabiatti, S. Avaliação da genotoxicidade do rio Caçador, Seara – SC através da formação de micronúcleos em *Astyanax* sp, para análise da presença de contaminantes. 2021. In: Oliveira, R. J. 2021. Águas e florestas: desafios para conservação e utilização. Guarujá: Cientifica Digital, 400p.
- Gomes, J. N. S. 2017. Qualidade da água do rio Pericumá e sua relação com ocupação urbana em Pinheiro – Ma. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Pará, Brasil, 108p.
- Gonçalves, V. F. 2022. Anomalias nucleares eritrocitárias como ferramentas de biomonitoramento por aves no Cerrado. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil, 84p.
- Grisolia, C. K.; Rivero, C. L. G.; Starling, F. L. R. M.; Silva, I. C. R.; Barbosa, A. C.; Dorea, J. G. 2009. Profile of micronucleus frequencies and DNA damage in different

- species of fish in a eutrophic tropical lake. *Genetics and Molecular Biology*, 32:138–143.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2021. *Cartas e Mapas Regionais*. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/geociencias/cartas-e-mapas/mapas-regionais/15819-amazonia-legal.html>. Acessado em 06 de junho de 2023.
- Jesus, H. C.; Costa, E. A.; Mendonça, A. S. F.; Zandonade, E. 2004. Distribuição de metais pesados em sedimentos do sistema estuarino da Ilha de Vitória – ES. *Química Nova*, 27(3), 378 – 386.
- Jindal, R.; Verma, S. 2015. In vivo genotoxicity and cytotoxicity assessment of cadmium chloride in peripheral erythrocytes of *Labeo rohita* (Hamilton). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 118:1–10.
- Latorre, M. A.; López González, E. C.; Siroski, P. A.; Poletta, G. L. 2015. Basal frequency of micronuclei and hematological parameters in the Side-necked Turtle, *Phrynops hilarii* (Duméril & Bibron, 1835). *Acta Herpetologica*, 10-1:31-37.
- Lima, N. C. 2010. Avaliação do impacto da contaminação do solo de áreas agrícolas de Bom Repouso (MG) por meio de ensaios ecotoxicológicos. Dissertação de Mestrado, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Carlos, 130p.
- Lima, M. C.; Giacomelli, M. B.; Stupp, V.; Roberge, F. D.; Barrera, P. B. 2001. Especiação de cobre e chumbo em sedimento do rio Tubarão (SC) pelo método Tessier. *Química Nova*, 24(6), 734 – 742.
- Lushchak, V. I. 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, 101(1), 13 – 30.
- Matson C. W.; Palatnikov, G.; Izlamzadeh, A.; Mc Donald, T. J.; Autenrieth, R. L.; Donnelly, K. C.; Bickham, J. W. 2005. Chromosomal damage in two Species of

- aquatic turtles (*Emys orbicularis* and *Mauremys caspica*) inhabiting contaminated sites in Azerbaijan. *Ecotoxicology*, 14: 1-13.
- Mesak, C.; Montalvão, M. S.; Paixão, C. F. C.; Mendes, B. O.; Araújo, A. P. C.; Quintão, T. C.; Malafaia, G. 2019. Do Amazon turtles exposed to environmental concentrations of the antineoplastic drug cyclophosphamide present mutagenic damages? If so, would such damages be reversible? *Environmental Science and Pollution Research*, 26:6234 6243.
- Ministério do Meio Ambiente (MMA), Lista Ramsar – Sítios Ramsar no Brasil. 2000. Disponível em: <https://rsis Ramsar.org/ris/1020>, Acesso em 24 de julho de 2019.
- Moll, D.; Moll, E. O. 2004. The ecology, exploitation and conservation of river turtles. New York: Oxford University Press, 393p.
- Moro, G. V.; Torati, L. S.; Luiz, D. B.; Matos, F. T. 2013. Monitoramento e manejo da qualidade da água em pisciculturas. In: Piscicultura de água doce: multiplicando conhecimentos. Editores Técnicos: Rodrigues, A. P. O.; Lima, A. F.; Alves, A. L.; Rosa, D. K.; Torati, L. S.; Santos, V. R. V. Brasília – DF: Embrapa, 2013, 440 p.
- Moron, S. E.; Lima, L. B. D.; Vieira, L. P. L.; Moraes, P. B.; Andrade, R. L. T. 2019. Monitoramento e caracterização da qualidade da água do rio Javaés, 2019, In: Pinheiro, R. T. 2019. Biodiversidade na região da ilha do Bananal, Tocantins: EDUFT, 150p.
- Nudi, A. H.; Wagener, A. L. R.; Francioni, E.; Lemos Scofield, A.; Sette, C. B.; Veiga, A. 2007. Validation of *Ucides cordatus* as a bioindicator of oil contamination and bioavailability in mangroves by evaluating sediment and crab PAH records. *Environ International*, 33, 315–327.
- Nunes, R. T. S.; Freitas, M. A. V. 2011. Vulnerabilidade dos recursos hídricos no âmbito regional e urbano. Rio de Janeiro: Interciência.

- Obiakor, M.; Okonkwo, J. C.; Nnabude, P.; Ezeonyejiaku, C. D. 2012. Eco-ecotoxicology: micronucleus assay in fish erythrocytes as in situ aquatic pollution. *Journal of Animal Science Advances*, 2:123-133.
- Oliveira, J. S. P. 2020. Efeitos toxicológicos da contaminação por agrotóxicos em recém-eclodidos de *Podocnemis expansa* (Testudines: Podocnemididae). Dissertação de Mestrado, Instituto Federal Goiano, Brasil, 38p.
- Oliveira, S. R. S.; Batista, W. S.; Sousa, J. B. M.; Noletto, K. S.; Arouche Lima, I. M.; Andrade, T. S. O. M.; Cardoso, W. S.; Carvalho Neta, R. N. F. 2019. Enzymatic and Histological Biomarkers in *Ucides cordatus* (Crustacea, Decapoda) in an Industrial Port on the North Coast of Brazil. *Bull Environ Contam Toxicol*, 102, 802–810.
- Pamparin, D. M.; Volpato, E.; Maragon, I.; Nasci, C. 2005. Physiological measurements from native and transplanted mussel (*Mytilus galloprovincialis*) in the canals of Venice. *Survival in air and condition index, Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 140:41- 52.
- Pereira, L. A.; Sousa, A. L.; Cutrim, M. V. J.; Moreira, E. G. 2007. Características ecológicas do habitat de *Kinosternon Scorpioides scorpioides* Linnaeus, 1766 (Reptila, Chelonia, Kinosternidae) no município de São Bento – Baixada Maranhense (Maranhão, Brasil). *Boletim do Laboratório de Hidrobiologia*, 20, 9-14.
- Pinheiro-Sousa, D. B. 2015. Um modelo preditivo baseado em biomarcadores aplicado a uma área protegida. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual do Maranhão, Brasil.
- Pinheiro, M. A. A.; Silva, P. P. G.; Duarte, L. F. A.; Almeida, A. A.; Zanotto, F. P. 2012. Accumulation of six metals in the mangrove crab *Ucides cordatus* (Crustacea: Ucididae) and its food source, the red mangrove *Rhizophora mangle* (Angiosperma: Rhizophoraceae). *Ecotoxicol and Environmental Safety*, 81, 114–121.

- Poletta, G. L.; Larriera, A.; Kleinsorge, E.; Mudry, M. D. 2008. *Caiman latirostris* (broad-snoutedcaiman) as asentin el organism for genotoxic monitoring: Basal values determination of micronucleus and comet assay. *Mutation Research*, 650:202–209.
- Prezotti, L. C.; Guarçoni, A. M. 2013. Guia de interpretação de análise de solo e foliar. Vitória: Incaper, 104 p.
- Quero, A. A. M.; Ferré, D.; Zarco, A.; Cuervo, P. F.; Gorla, N. B. M. 2016. Erythrocyte micronucleus cytome assay of 17 wild bird species from the central Monte desert, Argentina. *Environmental Science and Pollution Research*, 23:25224–25231.
- Quiroz-Herrera, V. H.; Palacio Baena, J. 2017. Genotoxic Biomarkers in Erythrocytes of *Lepidochelys olivacea* (Cheloniidae) from Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 22-3, 322-330.
- Ragunathan, M. G. 2017. Vicissitudes of oxidative stress biomarkers in the estuarine crab *Scylla serrata* with reference to dry and wet weather conditions in Ennore estuary, Tamil Nadu, India. *Marine Pollution Bulletin*, 116, 113–120.
- Ramsdorf, W. A.; Vicari, T.; Almeida, M. I. M.; Artoni, R. F.; Cestari, M. M. 2012. *Handling of Astyanax* sp, for biomonitoring in Cangüiri Farm within a fountainhead (Iraí River Environment Preservation Area) through the use of genetic biomarkers. *Environmental Monitoring and Assessment*, 184: 5841– 5849.
- Santos E. S.; Zanello, S. 2016. Análises físico-químicas das águas e de solos do rio canguri. Disponível em: www.diadiaeducação.pr.gov.br/portals/pde/arquivos/1701-8.pdf. Acesso em 29 maio de 2023.
- Shimizu, N.; Shimura, T.; Tanaka, T. 2000. Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei. *Mutation Research*, 448:81– 90.

- Silva, C. C.; Klein, R. D.; Barcarolli, I. F.; Niachini, A. 2016. Metal contamination as a possible etiology of fibro papillomatosis in juvenile female green sea turtles *Chelonia mydas* from the Southern Atlantic Ocean. *Aquatic Toxicology*, 170:42–51.
- Silva, F. G. S. 2016. Avaliação da qualidade de solos e águas subterrâneas no estado do Maranhão, em relação a alguns parâmetros físico-químicos e também à presença de pesticidas organofosforados. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Maranhão, 73p.
- Souza, N. L. N.; Carneiro, M. T. W. D.; Pimentel, E. F.; Frossard, A.; Freire, J. B.; Endringer, D. C.; Ferreira Júnior, P. D. 2018. Trace elements influence the hatching success and emergence of *Caretta caretta* and *Chelonia mydas*. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 50, 117–122.
- Souza, J. M.; Montalvão, A. R.; Silva, A. R.; Rodrigues, A. S. L.; Malafaia, C. A. 2017. Pioneering study on cytotoxicity in Australian parakeets (*Melopsittacus undulates*) exposed to tannery effluent. *Chemosphere*, 175:521–533.
- Udroiu, I. 2006. The micronucleus test in piscine erythrocytes. *Aquatic Toxicology*, 79:201-20.
- Valente, D.; Costa, A. I. C.; Carvalho, L. V. B.; Dos Santos, M. V. C.; Castro, V. S.; Rodrigues, D. R. F.; De Falco, A. 2017. Utilização de biomarcadores de genotoxicidade e expressão gênica na avaliação de trabalhadores de postos de combustíveis expostos a vapores de gasolina. *Revista Brasileira de Saúde Ocupacional*, 42(suplemento 1), 1-21.
- Van der Oost, R.; Beyer, J.; Vermeulen, N. P. E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13(2), 57-149.

- Venancio, L. P. R. Cágado-de-barbelas (*Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812), Testudines: Chelidae) como modelo para a ecotoxicologia evolutiva: relacionamento entre contaminação ambiental, condição e variabilidade genética. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Brasil, 169p.
- Zapata, L. M.; Bock, B. C.; Orozco, L. Y.; Palacio, J. A. 2016. Application of the micronucleus test and comet assay in *Trachemys callirostris* erythrocytes as a model for in situ genotoxic monitoring. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 127:108–116.
- Zúñiga-González, G.; Torres-Bugarín, O.; Zamora-Perez, A.; Gómez-Meda, B. C.; Ramos Ibarra, M. L.; Martínez-González, S.; González-Rodríguez, A.; Luna Aguirre, J.; Ramos-Mora, A.; Ontiveros-Lira, D.; Gallegos-Arreola, M. P. 2001. Differences in the number of micronucleated erythrocytes among young and adult animals including humans: Spontaneous micronuclei in 43 species. *Mutation Research*, 494:161–167.

Anexos

Anexo A – Publicação integral do Capítulo 1



Copyright 2022 by i-EDUCAM

Revisão:

Débora Batista Pinheiro Sousa

Jonatas da Silva Castro

Wanda Batista de Jesus

Editoração e capa:

i-EDUCAM

Foto da capa e de início dos capítulos:

fotos cedidas pelos autores de cada capítulo (opcional)

www.freeimages.com

INDEXADO POR / INDEXAD BY
Bibliografia Brasileira

Debora Batista Pinheiro Sousa, Jonatas da Silva Castro, Wanda Batista de Jesus (Organizadores).

ISBN 978-65-594-1922-7

DOI 10.29327/576562

Título: Monitoramento Ambiental: metodologias e estudos de casos.

Tipo de Suporte: eBook

Formato de eBook: PDF



i-EDUCAM

www.i-educam.com.br

Link para a publicação: <https://doi.org/10.29327/576562>

Os autores de cada capítulo são responsáveis pelos textos e fotografias.

O conteúdo publicado não representa a posição oficial do i-EDUCAM.

**i-EDUCAM**INSTITUTO DE EDUCAÇÃO CONTINUADA
E CONSULTORIA AMBIENTAL**CONSELHO EDITORIAL**

Ana Luiza Caldas Diniz
(bióloga, mestre em Recursos Aquáticos e Pesca - UEMA)

Elielma Sousa Diniz
(bióloga, mestre em Microbiologia Agropecuária - UNESP)

Gisélia Brito dos Santos
(letróloga, doutora em Letras e Linguística - UFG)

Jaqueline Custódio da Costa
(bióloga, doutora em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva - INPA)

Joel Artur Rodrigues Dias
(engenheiro de Pesca, doutor em Ciência Animal - UFPA)

Matheus Gomes da Cruz
(biólogo, mestre em Aquicultura- Universidade Nilton Lins/INPA)

Raimunda Nonata Fortes Carvalho Neta
(bióloga, doutora em Biotecnologia- RENORBIO/UECE)

Samara Silva de Souza
(bióloga, doutora em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva- INPA)

Carlos Alailson Licar Rodrigues
Almerinda Medeiros Macieira
Elizângela Pinheiro Pereira
Raimunda Nonata Fortes Carvalho Neta
Alana Lislea de Sousa

Capítulo 6



**Biomarcadores bioquímicos e genotóxicos em
tartarugas (Reptilia: Testudines): abordagem
metodológica para uma espécie do
gênero *Kinosternon***

Capítulo 6**BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS E GENOTÓXICOS EM TARTARUGAS (REPTILIA: TESTUDINES): ABORDAGEM METODOLÓGICA PARA UMA ESPÉCIE DO GÊNERO *Kinosternon***

Carlos Alailson Licar Rodrigues^{1*}, Almerinda Medeiros Macieira², Elizângela Pinheiro Pereira², Raimunda Nonata Fortes Carvalho Neta^{2,3} & Alana Lislea de Sousa¹

¹ Programa de Pós-graduação em Ciência Animal - Universidade Estadual do Maranhão,

² Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE,

³ Departamento de Biologia - Universidade Estadual do Maranhão

doi: 10.29327/576562.1-6

View online: <https://doi.org/10.29327/576562>

*e-mail do autor correspondente: carlos_licar@hotmail.com

INTRODUÇÃO

Apresentamos o estado da arte sobre 3 (três) principais biomarcadores bioquímicos e genotóxicos que podem ser utilizados numa abordagem de biomonitoramento para uma espécie do gênero *Kinosternon*. Esse gênero apresenta 22 espécies, conforme informações disponíveis no Banco de Dados de Répteis do mundo (UETZ *et al.*, 2022).

Reino Animalia

Filo Chordata

Subfilo Vertebrata

Classe Reptilia

Ordem Testudines

Família Kinosternidae

Subfamília Kinosterninae

Gênero *Kinosternon* (Spix, 1824)

Kinosternon acutum (Gray, 1831)

Kinosternon alamosae (Berry; Legler, 1980)

Kinosternon angustipons (Legler, 1965)

Kinosternon arizonense (Gilmore, 1923)

Kinosternon baurii (Garman, 1891)

Kinosternon chimalhuaca (Berry; Seidel; Iverson, 1996)

Kinosternon cora (Loc-Barragán *et al.*, 2020)

Kinosternon creaseri (Hartweg, 1934)

Kinosternon dunni (Schmidt, 1947)

Kinosternon durangoense (Iverson, 1979)

Kinosternon flavescens (Agassiz, 1857)

Kinosternon herrerae (Stejneger, 1925)

Kinosternon hirtipes (Wagler, 1830)
Kinosternon integrum (LeConte, 1854)
Kinosternon steindachneri (Siebenrock, 1906)
Kinosternon leucostomum (Duméril; Bibron, 1851)
Kinosternon oaxacae (Berry; Iverson, 1980)
Kinosternon scorpioides (Linnaeus, 1766)
Kinosternon sonoriense (LeConte, 1854)
Kinosternon abaxillare (Baur, 1925)
Kinosternon subrubrum (Bonnaterre, 1789)
Kinosternon vogti (López-Luna *et al.*, 2018)

Kinosternon scorpioides (Linnaeus, 1766) é um cágado da família Kinosternidae, gênero *Kinosternon* (Fig. 1). Apresenta ampla distribuição geográfica com registros desde o México à Argentina, incluindo a Região Amazônica, Escudo das Guianas e Guianas. No território brasileiro, o táxon ocorre em vários estados, sobretudo no domínio amazônico até os biomas cerrado e mata atlântica no nordeste do país (COSTA; BERNILS, 2018). Entre as espécies do gênero, apenas *K. scorpioides* ocorre no Brasil. No presente contexto, indicamos a possibilidade de uso desse táxon como biomonitor de ambientes impactados.



Figura 1. Espécime adulto de *Kinosternon scorpioides*. Fonte: Os autores (2019)

A espécie é conhecida vulgarmente pelos maranhenses como “jurarã” e paraenses de “muçã”. Possui hábito semi aquático e sobrevive em locais secos e alagados (CABRERA; COLANTONIO, 1997). O epíteto específico “*scorpioides*” surgiu a partir da morfologia da cauda, pois se apresenta no formato do ferrão de escorpião. A morfologia da cauda facilita a inserção do pênis na cloaca da fêmea, possibilitando o apoio com maior precisão e eficácia durante o acasalamento entre macho e fêmea (CASTRO, 2006).

O acasalamento pode ocorrer no período chuvoso e é ausente no período de estiagem, fase em que as fêmeas realizam a ovipostura. A cópula acontece na água, com o macho cortejando a fêmea, seguida da perseguição, domínio e monta, apoiando as quatro patas sobre a carapaça e com movimentos da cauda em busca da abertura cloacal até a introdução do pênis (CHAVES, 2011).

Kinosternon scorpioides tem dimorfismo sexual evidente, sendo os machos maiores que as fêmeas, com tamanho médio de 16,5 cm de comprimento de carapaça, enquanto as fêmeas possuem 13,8 cm. Elas possuem carapaça mais arredondada enquanto os machos, alongadas. Em machos, o plastrão é côncavo e nas fêmeas, ele é reto. A cauda é diferenciada nesses animais e em machos apresenta-se maior que nas fêmeas (ACUNÃ-MESEN, 1994).

Outro aspecto notável é a sazonalidade, que exerce forte influência na reprodução de *K. scorpioides*, podendo o ciclo ser sincronizado por fatores climáticos, alimentares e hormonais, com destaque para a temperatura, que influencia a incubação dos ovos e, consequentemente, a determinação sexual desses animais (FERREIRA-JÚNIOR, 2009; VIANA *et al.*, 2013). A diferenciação no sexo é evidente e ocorre nas primeiras fases do desenvolvimento embrionário, correspondendo ao primeiro terço (1ª à 9ª semana de incubação). Nesse momento, o processo de definição do sexo ainda pode ser reversível (BULL; VOGT, 1981; MROSOVSKY; PIEAU, 1991; MOELLER, 2013). É destacado por Ferreira-Júnior (2009) que os machos se originam a uma temperatura próxima de 26 °C e as fêmeas, a 30 °C.

Populações de *K. scorpioides* costumam viver em grupos e compartilhar o mesmo nicho. Deslocam-se em movimentos lentos e colonizam diferentes espaços para se alimentar e reproduzir. Estudos têm mostrado que a morfologia do casco dos machos e das fêmeas pode sofrer modificações de acordo com o ambiente, cujas características ecológicas são diferenciadas frente à sazonalidade regional (ROCHA; MOLINA, 1987; DELDUQUE, 2000).

Como característica ecológica, na estiação, quando as condições climáticas e alimentares são desfavoráveis à espécie, enterram-se no solo como estratégia fisiológica que caracteriza um estado de baixo metabolismo e gasto energético. Esse mecanismo é conhecido como “estivação” e está relacionado às oscilações de calor no ambiente, regulando assim, a temperatura corporal, de modo a evitar o estresse térmico (PEREIRA *et al.*, 2007).

Por habitar áreas úmidas, *K. scorpioides* são conhecidos como “tartaruga-do-lodo” e são capazes de liberar substâncias odoríferas através da superfície corporal quando se sentem ameaçados ou diante da presença humana (ROCHA; MOLINA, 1990). A espécie possui hábito alimentar carnívoro e são ovíparas, tendo uma dieta variada, se alimentando de girinos, peixes, matéria orgânica e vegetais (PRITCHARD, 1979).

K. scorpioides possui grande importância ecológica e ambiental para as comunidades tradicionais, principalmente aquelas de pescadores e ribeirinhas que comumente as utilizam como recurso alimentar, além de contribuir com a renda de muitas famílias por meio da venda clandestina desses animais, que é considerada proibida pela Lei nº 5.197, de 03 de janeiro de 1967 que dispõe sobre a proteção à fauna e dá outras providências. A fauna silvestre tem a sua proteção assegurada pela Lei de Crimes Ambientais (Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998). Diante da importância e valor ambiental para as populações, *K. scorpioides* pode ser utilizado em abordagens de biomonitoramento, visto que apresenta muitos requisitos necessários a um biomonitor adequado para análises de biomarcadores bioquímicos e genotóxicos na indicação de ambientes poluídos, além de sua manutenção nos ecossistemas para as atuais e futuras gerações.

Nesse âmbito, esse trabalho constitui-se de uma breve revisão de literatura que destaca aspectos importantes sobre o uso de biomarcadores em espécies de tartarugas da ordem Testudines. O estudo é de cunho descritivo e bibliográfico, com consulta às principais bases de dados científicos como PubMed, Scientific Electronic Library Online - Scielo, Portal de Periódicos Capes, Directory of Open Access Journals – DOAJ, Repositórios Científicos de Acesso Aberto de Portugal – RCAAP e Google Acadêmico.

O objetivo principal foi discutir o uso de biomarcadores bioquímicos e genotóxicos em tartarugas com foco em uma abordagem metodológica para uma espécie do gênero *Kinosternon*.

O uso de quelônios em estudos de biomonitoramento

A contaminação dos sistemas aquáticos nos últimos anos tem se intensificado através de ações antrópicas que contribuem de forma expressiva para os desequilíbrios nos ecossistemas. Os impactos antrópicos causados ao meio ambiente têm despertado a atenção dos pesquisadores, pois fontes poluidoras podem contribuir para a contaminação dos sistemas aquáticos, entre as quais destacam-se as oriundas do ar e do solo. Os contaminantes, conhecidos como “estressores ambientais” podem agregar-se no ambiente em sua forma original ou como resultado do processo de biotransformação (BERTOLETTI, 1990; CAJARAVILLE *et al.*, 2000). Para elucidar o conhecimento e obter respostas a determinados fenômenos ao nível biológico e ambiental, ensaios ecotoxicológicos são capazes de avaliar os efeitos nocivos gerados por contaminantes, sejam eles originados pela ação humana ou não, em indivíduos, populações e/ou comunidade animal (AZEVEDO; CHASIN, 2003).

É válido destacar diferenças importantes entre organismos biomonitores e bioindicadores. Biomonitores são utilizados frequentemente em estudos de biomonitoramento, que estão pautados em um acompanhamento constante dos organismos de um determinado local. Esse monitoramento de área fornece informações importantes sobre mudanças ocorridas no ambiente, em consequência da poluição ou agressão antropogênica e, isso, pode acarretar sérios riscos aos animais de um dado ecossistema (ANDREA, 2008).

Já os bioindicadores correspondem a uma espécie, grupos de espécies ou comunidades biológicas relacionando-se diretamente com a presença, abundância e distribuição delas, indicando o nível dos impactos gerados no ambiente (CALLISTO; GONÇALVES JÚNIOR, 2002). Nesse contexto, animais são utilizados como biomonitores em estudos de monitoramento ambiental a partir do uso de biomarcadores, que respondem a medidas de exposição ou à dose dos agentes poluentes. Entre esses animais, destacam-se os moluscos, crustáceos e peixes, que são de uso comum, e grande parte dos estudos são com a utilização deles como biomonitores de qualidade ambiental em áreas poluídas ou que recebem grande impacto ambiental (SOUSA; NETA, 2014; CASTRO *et al.*, 2014; RIBEIRO *et al.*, 2016; CARVALHO NETA *et al.*, 2019; OLIVEIRA *et al.*, 2019).

Diante desse cenário, os quelônios são um grupo entre os vertebrados, que também são estudados com o intuito de gerar respostas frente às interações constantes entre os espaços terrestres e aquáticos. Esses organismos sofrem influência do ambiente externo, que refletem no comportamento fisiológico e ecológico, regido, em muitas vezes, pelo ciclo hidrológico local, pela sazonalidade regional, e por ser um grupo diversificado que vive em locais diversos. Essa flexibilidade de sobrevivência em vários ambientes faz deles um grupo essencial para estudos de biomonitoramento ambiental (MOLL; MOLL, 2004).

Algumas espécies de quelônios sofrem forte pressão de caça e pesca, e com isso, são vulneráveis aos impactos antrópicos. Os contaminantes muitas vezes são prejudiciais à saúde animal e geram influências sobre as populações, ocasionando declínio populacional e grandes efeitos que, muitas vezes, são irreversíveis. Isso pode agravar ainda mais a situação de vulnerabilidade desses animais frente aos estressores ambientais (KELLER *et al.*, 2004b). A sensibilidade dos quelônios aos contaminantes pode variar entre espécies, mas elas respondem aos potenciais riscos dos estressores à reprodução, fisiologia, comportamentos e sobretudo, à saúde humana (GOLET; HAINES, 2001; STORELLI; MARCOTRIGIANO, 2003; KELLER *et al.*, 2004a; KELLER *et al.*, 2004b).

Apesar das pesquisas envolvendo a contaminação por poluentes em quelônios serem ainda pouco desenvolvidas e difundidas no Brasil, há relatos na literatura da utilização de quelônio como biomonitor em análises de contaminação por agrotóxicos e mercúrio na Bacia do Rio Xingu (Pará) e com a tartaruga de água doce *Podocnemis unifilis* (PIGNATI, 2017). A abordagem e avaliação do impacto geraram respostas úteis à comunidade, uma vez que essa espécie é um recurso alimentar das comunidades tradicionais da região de entorno do estudo. Isso vem ao encontro dos relatos sobre *K. scorioides* oferecidos nesta revisão, pois é uma espécie que também possui importância alimentar para muitas famílias em municípios da Baixada Maranhense, estado do Maranhão (CASTRO, 2006). Devido ao valor que esses animais apresentam para as comunidades, sobretudo do consumo tradicional, torna-se fundamental o conhecimento dos efeitos que os contaminantes causam nesses animais.

O estudo de Silva (2011) também complementa as informações com dados sobre alterações bioquímicas e hematológicas em resposta aos estressores ambientais em *Phrynops geoffroanus* (cágado-de-barbicha). Os achados revelaram que a exposição dessa espécie a contaminantes geraram respostas seguras acerca da qualidade ambiental e da saúde animal, pois constatou-se o potencial citotóxico dos compostos presentes no ambiente urbano e o aumento da capacidade antioxidante e atividades de enzimas funcionais de várias vias de detoxificação de compostos químicos. Dessa forma, esses relatos são fundamentais para o entendimento de que a contaminação ambiental pode aumentar os danos oxidativos e fornecer respostas importantes por meio de alterações fisiológicas e comportamentais em uma espécie de testudíneo de água doce. *Phrynops geoffroanus* tem sido considerado um modelo para ecotoxicologia evolutiva num estudo com abordagem sobre contaminação ambiental, condição e variabilidade genética, sendo demonstrada uma possível adaptação à contaminação ambiental (VENANCIO, 2012).

Pesquisas com quelônios de água doce são menos frequentes e destacam-se as desenvolvidas por Oliveira (2020) que avaliou o efeito potencial de agrotóxicos em indivíduos recém-eclodidos de tartaruga *Podocnemis expansa* (tartaruga-da-amazônia); os resultados comprovaram a influência direta dos agrotóxicos nas populações e evidenciou que pouco se sabe sobre os reais efeitos desses estressores ao meio ambiente e/ou à saúde humana em longo prazo.

Assim sendo, frente aos poucos trabalhos disponíveis, essa revisão oferece perspectivas de novas pesquisas e contribuições científicas sobre aspectos biológicos dos quelônios, numa abordagem detalhada e útil dos processos de contaminação e influência ambiental na fisiologia, comportamentos e reprodução de espécies de ambiente dulcícola. Isso pode gerar informações úteis para o monitoramento ambiental, especialmente a partir de abordagens com biomarcadores bioquímicos e genotóxicos nos animais.

Biomarcadores bioquímicos e genotóxicos: alterações na atividade da Glutathione S-Transferase, Catalase e Teste do Micronúcleo

A ecotoxicologia é uma área do conhecimento capaz de contribuir com avaliação dos níveis de impactos nos ecossistemas, especialmente no que se refere a: identificar os efeitos adversos de poluentes a partir de fenômenos que ocorrem antes ou depois de um evento de poluição e investigar as consequências que uma substância ou a mistura delas podem causar às comunidades biológicas em um corpo hídrico, podendo ser utilizados diversos testes para avaliação do grau de toxicidade sobre a biota aquática (MAGALHÃES; FILHO, 2008). Esses conhecimentos podem ser empregados como instrumentos de controle e vigilância contínuos capazes de detectar, a curto e em longo prazo, os reais impactos ambientais em uma região (MAGALHÃES; FILHO, 2008).

O biomonitoramento da contaminação em um determinado local pode ser efetivado a partir do uso de metodologias de cunho biológico, capazes de fornecer respostas acerca da qualidade do ambiente, além de mensurar os efeitos que os poluentes podem causar. Entre as abordagens metodológicas destacam-se os biomarcadores, que consistem em alterações biológicas (moleculares, fisiológicas, comportamentais, celulares, fluídos, tecidos ou órgãos) de um organismo e indicam uma possível exposição a um estressor ambiental, como poluentes químicos, industriais, domésticos, dentre outros (RYAN *et al.*, 2007).

Nas análises de biomonitoramento, sugere-se a utilização de diversos biomarcadores, uma vez que uma única resposta não reflete com precisão os efeitos causados aos organismos em ambiente impactado, assim como escolher a melhor espécie indicadora, capaz de fornecer resultados seguros sobre o que está sendo avaliado. Nesse contexto, é necessário ter o conhecimento das funções biológicas dos organismos, da dinâmica vital, das variações naturais locais e da influência de fatores ambientais como sazonalidade e parâmetros abióticos. Esses elementos ajudam a diferenciar os efeitos da poluição, daqueles relacionados

à influência de outros parâmetros ambientais, fisiológicos e sazonais de um biomarcador (LINKS; GROOPMAN, 2010).

A Organização Mundial de Saúde - OMS (1993) recomenda que os biomarcadores podem ser utilizados para vários fins, e destaca os objetivos principais de seu uso: avaliar a exposição do organismo a um xenobiótico, bem como o efeito deles e a suscetibilidade dos organismos. A utilização dos indicadores biológicos tem por finalidade responder a relação causa-efeito e dose-efeito em estudos de riscos, monitoramento ambiental e diagnóstico clínico.

Segundo a OMS (1993) e Rudiger (1999), independente da finalidade e aplicabilidade, os biomarcadores podem ser classificados em 3 tipos principais:

- **Biomarcadores de exposição:** utilizados para avaliar a exposição individual ou coletiva de um organismo a dada substância, estabelecendo relação entre exposição externa e quantificação interna da substância;
- **Biomarcadores de efeito:** usados para identificar alterações pré-clínicas ou demais efeitos à saúde frente à exposição a uma substância e;
- **Biomarcadores de suscetibilidade:** elucida o nível de resposta da exposição de uma substância em um determinado indivíduo.

Entre os biomarcadores comumente empregados nos estudos de campo, pode-se destacar as alterações nos níveis das enzimas Glutathione S-Transferase e Catalase, bem como o Teste do Micronúcleo. Sugere-se que todas essas técnicas podem ser aplicáveis em estudos com *K. scorpioides*.

Glutathione S-Transferase (GST)

Um biomarcador bioquímico bastante abordado na literatura tem sido a alteração na atividade da GST (RUDIGER, 1999; CARVALHO-NETA *et al.*, 2012; PINHEIRO-SOUSA *et al.*, 2021). Essa enzima possui um papel fundamental na detoxificação de compostos endobióticos e xenobióticos e são essenciais no processo de catalisação e conjugação com outras moléculas (CHELVANAYAGAM *et al.*, 2001). A GST recebe esse nome por atuar na catálise em conjugação de compostos eletrofílicos com o tripeptídeo Glutathione Reduzida (GSH), diminuindo as chances de associação desses elementos às células (HUGGETT *et al.*, 1992).

As GSTs ocorrem em todos os organismos procariotos e eucariotos, como plantas, moluscos, crustáceos, insetos, peixes, anfíbios, répteis e mamíferos. Nos vertebrados, de modo geral, elas estão presentes em maior nível no fígado (VAN DER OOST *et al.*, 2003; SANTOS, 2013). É encontrada no citosol e matriz mitocondrial e, juntamente com a catalase, são um dos mais importantes antioxidantes já estudados e atuam fortemente na eliminação de produtos primários de oxigênio parcialmente reduzidos, prevenindo a peroxidação lipídica e defesa antioxidante (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; BAKER *et al.*, 2007; LIMON-PACHECO; GONSEBATT, 2009).

Trabalhos têm demonstrado a elevação da atividade de GST em tecidos de vários organismos, desde invertebrados e vertebrados, entre os quais cita-se os crustáceos, peixes e répteis (SILVA, 2015; OLIVEIRA, 2018; CARVALHO NETA *et al.*, 2019). Em quelônios, há estudos com *Chelonia mydas* (tartaruga-verde) onde analisaram a atividade das enzimas GST e CAT, vistas como principais biomarcadores de estresse oxidativo presentes no sangue de animais vítimas de ingestão de lixo plástico e foi possível detectar taxa de mortalidade de alguns deles em decorrência da debilidade do sistema de defesa antioxidante ocasionadas pelo estresse oxidativo relacionado ao processo de isquemia-reperusão do trato gastrointestinal (YOSHIDA, 2012). Frossard (2020) também realizou uma avaliação ecotoxicológica de metais em ovos e filhotes recém eclodidos de espécies de testudines como *Podocnemis expansa*, *Chelonia mydas* e *Caretta caretta* como bioindicadores da presença de metais nos ambientes marinho e dulcícola. Constatou-se que os dois ambientes são afetados por metais a partir da identificação desses compostos em ovos e filhotes, sendo, portanto, áreas impactadas por ações antrópicas.

Diante dos estudos já realizados com o uso de determinadas espécies de tartarugas e da ausência de dados sobre essa temática com o *K. scorpioides*, esta investigação traz novos saberes sobre o táxon, sendo, portanto, uma abordagem nova para os ecossistemas maranhenses.

Catalase (CAT)

As catalases são um conjunto de enzimas capazes de auxiliar as células na detoxificação de espécies que reagem ao oxigênio disponível, atuando na catálise, convertendo o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em água e oxigênio (BELO; SOUZA, 2016). É uma enzima antioxidante capaz de atuar na decomposição do H₂O₂ quando produzidos em grandes quantidades nos processos de biotransformação nos peroxissomos, sendo considerada uma das mais importantes enzimas já encontradas nos vertebrados (VENTURA *et al.*, 2002).

Quando expostas a xenobióticos, as células desenvolvem meios que as protegem dos danos oxidativos e a CAT exerce uma função essencial na defesa das células e órgãos contra os danos gerados pela ação do H₂O₂ (DONG *et al.*, 2018). Quando, por exemplo, o sistema de defesa é insuficiente para proteger as células contra os danos causados pelas Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), isso gera estresse oxidativo, seguido da oxidação de lipídios, proteínas e DNA. A CAT atua na defesa do organismo durante os processos fisiológicos normais e em casos de estresse oxidativo (CARVALHO-NETA; ABREU-SILVA, 2010). Dessa maneira, estudos com análises de CAT em quelônios de água doce, a exemplo de *P. geoffroanus* têm sido conduzidos no Brasil (SILVA, 2011; SILVA; SILVA; ALMEIDA, 2016). Entretanto, são necessárias mais informações para adicionar novos saberes para o biomonitoramento em ambientes dulcícolas, especialmente com uso de *K. scorpioides*.

Teste de micronúcleo

O Teste do Micronúcleo (MN) é uma abordagem genotóxica que identifica possíveis alterações cromossômicas utilizando-se como parâmetros, o aumento de frequência de eritrócitos policromáticos com presença de micronúcleos quando as células estão expostas a determinados agentes químicos (CARRARD *et al.*, 2007). A compreensão e entendimento desse teste é essencial para identificar alterações celulares relacionadas à frequência de mutações quando expostas a diversas fontes poluidoras, sobretudo, aos agentes genotóxicos que afetam diretamente o núcleo da célula (UCHÔA; MAGALHÃES, 2020).

A formação dos micronúcleos é resultante da quebra de cromossomos acêntricos ou do atraso deles em relação aos outros cromossomos durante a divisão celular, e podem se formar a partir da exposição a agentes que provocam a quebra da molécula de DNA (BUCKER; CARVALHO; ALVES-GOMES, 2006). Heddle *et al.*, (1991) apontam para quatro situações em que os micronúcleos podem surgir: (1) perda de fragmento mitótico acêntrico, (2) variedade mecânica de quebra e troca de cromossomos, (3) perda de cromossomos mitóticos internos e (4) apoptose.

O Teste do Micronúcleo é vantajoso, pois é uma técnica citogenética conhecida e de fácil aplicabilidade, além de ser muito indicada em estudos de avaliação de danos nos cromossomos causados pela exposição a estressores ambientais. É uma metodologia de fácil desenvolvimento, sendo necessário apenas o uso de microscópio óptico para leitura das lâminas e contagem dos eritrócitos com presença de um ou mais micronúcleos (BOLOGNESI *et al.*, 2006; VIARENGO *et al.*, 2007).

Análises de micronúcleos já foram documentadas para uma espécie de jabuti, *Chelonoidis carbonarius* (CASTRO, 2020) e *P. geoffroanus* (SILVA, 2011). Vários são os relatos que confirmam a eficácia do teste como um importante indicador citogenético, de baixo custo, rápido, não invasivo, que pode ser replicado com o intuito de avaliar possíveis danos e monitorar a exposição de indivíduos a agentes genotóxicos, sobretudo aos carcinogênicos (CARVALHO *et al.*, 2002). Assim, sugere-se que *K. scorpioides* possa também ser utilizado como espécie biomonitora para análises de biomarcadores genotóxicos.

CONCLUSÃO

Os biomarcadores bioquímicos e genotóxicos apresentados nesta investigação (GST, CAT e Teste do Micronúcleo) são instrumentos práticos que sinalizam respostas úteis em nível biológico e ambiental acerca dos impactos gerados por fontes poluidoras e substâncias nocivas à fauna e aos ecossistemas marinho e dulcícola. O *status* do conhecimento apresentado demonstrou que o uso desses biomarcadores em testudíneos, entre eles o *K. scorpioides* é possível e contribuem com novos conhecimentos no âmbito da temática, além de oferecer opções para o estabelecimento de medidas protetivas e de conservação que implicam diretamente em melhorias na saúde do ambiente e dos animais, mitigando possíveis

impactos, a extinção de espécies e desequilíbrios nos ecossistemas. Os estudos com biomarcadores em quelônios de regiões amazônicas ainda são considerados insuficientes e por isso, é imprescindível o desenvolvimento de pesquisas que trazem novas informações científicas para a área e que promovam o incentivo aos hábitos sustentáveis e de conservação das tartarugas *in situ*.

REFERÊNCIAS

ACUNÃ-MESEN, R. A. Variación morfométrica y características del habitat de a tortuga candado *Kinosternon scorpioides* em Costa Rica (Chelonia, Kinosternidade). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 54, n. 3, p. 537-547, 1994.

ANDREA, M. M. Bioindicadores ecotoxicológicos de agrotóxicos. Disponível em: http://www.infobibos.com/Artigos/2008_4/Bioindicadores/index.htm. Acesso em: 9 de ago. 2022.

AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. As bases toxicológicas da ecotoxicologia. São Carlos: **RIMA**; São Paulo: Intertox, 2003. 340 p.

BAKER, P.J.; COSTANZO, J. P.; LEE JR, R. E. Oxidative stress and antioxidant capacity of a terrestrially hibernating hatchling turtle. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 177, n. 8, p. 875–883, 2007.

BELO, M. F. R. F.; SOUZA, A. L. F. Estudo cinético da enzima catalase (E.C. 1.11.1.6) de extrato bruto de bata doce (*Ipomoea batatas*). **Scientia Plena**, v. 12, n. 07, p. 1 – 7, 2016.

BERTOLETTI, E. Toxicidade e Concentração de Agentes Tóxicos em Efluentes Industriais. **Revista Ciência e Cultura**, v. 43, n. 3/4, p. 271-277, 1990.

BOLOGNESI, C.; PERRONE, E.; ROGGIERI, P.; PAMPANIN, D. M.; SCIUTTO, A. Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 78 Suppl 1, p. S93-8, 2006.

BUCKER, A.; CARVALHO, W.; ALVES-GOMES, J. A. Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno, **Acta Amazonica**, v. 36, n. 3, p. 357-364, 2006.

BULL, J. J.; VOGT, R. C. Temperature-sensitive periods of sex determination in Emydid turtles. **Journal of Experimental Zoology**, v. 218, p. 435-440. 1981.

BRASIL. **Lei nº 5.197, de 03 de janeiro de 1967**. Dispõe sobre a proteção à fauna e dá outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, DF, v. 1, 05 de janeiro de 1967. Seção 1, p. 177.

BRASIL. **Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998**. Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providências. Brasília, DF, 12 de fevereiro de 1998. 177ª da Independência e 110ª da República.

CABRERA, M. R.; COLANTONIO, S. E. Taxonomic revision of the South American subspecies of the turtle *Kinosternon scorpioides*. **Journal Herpetology**, v. 31 n.4, p. 507-513, 1997.

CAJARAVILLE, M. P.; BEBIANNO, J. M.; BLASCO, J.; PORTE, C.; SARASQUETE, C.; VIARENGO, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **Science of the Total Environment**, v. 247, p. 295-311, 2000.

CALLISTO, M.; GONÇALVES JÚNIOR, J. F. 2002. A vida nas águas das montanhas. **Ciência Hoje**, v. 31, n. 182, p: 68 – 71.

CARRARD, V. C.; COSTA, C. H.; FERREIRA, L. A.; LAUXEN, I. S.; RADOS, P. V. "Teste dos Micronúcleos - Um Biomarcador de Dano Genotóxico em Células Descamadas da Mucosa Bucal". **Revista da Faculdade de Odontologia**, v. 48, n. 1/3, p. 77-81. 2007.

CARVALHO NETA, R. N. F.; ANDRADE, T. S. O. M.; OLIVEIRA, S. R. S.; JUNIOR, A. R. T.; CARDOSO, W. S.; SANTOS, D. M. S.; BATISTA, W. S.; SERRA, I. M. R. S.; BRITO, N. M. Biochemical and morphological responses in *Ucides cordatus* (Crustacea, Decapoda) as indicators of contamination status in mangroves and port areas from northern Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 16, 2019.

CARVALHO, M. B.; RAMIREZ, A.; GATTÁS, G. J. F.; GUEDES, A. L.; AMAR, A.; RAPOPORT, A.; NETO, J. C. B.; CURIONI, O. A. Correlação entre a Evolução Clínica e a Frequência de Micronúcleos em Células de Pacientes Portadores de Carcinomas Orais e Orofaríngeas. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 48, n. 4, p. 317-322, 2002.

CARVALHO-NETA, R. N. F.; ABREU-SILVA, A. L. *Sciades herzbergii* oxidative stress biomarkers: An in situ study of an estuarine ecosystem (São Marcos, Maranhão, Brazil). **Brazilian Journal Oceanography**, v. 58, p. 11–17, 2010.

CARVALHO-NETA, R. N. F.; TORRES JR., A. R.; ABREU-SILVA, A. L. Biomarkers in Catfish *Sciades herzbergii* (Teleostei: Ariidae) from Polluted and Non-polluted Areas (São Marcos Bay, Northeastern Brazil). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.166, p.1-12, 2012.

CASTRO, A. B. **Biologia reprodutiva e crescimento do muçuã *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1776) em cativeiro**. Belém. 2006. 101 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Pará (UFPA), Centro de Ciências Agrárias, Núcleo de Estudos em Ciência Animal, Belém, 2006.

CASTRO, G. S. **Influência da sazonalidade e do sexo na hematologia, na citoquímica e na bioquímica do estresse oxidativo e metabólico de '*Chelonoidis carbonarius*' (Spix, 1824), mantidos em cativeiro**. 2020. 125 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, 2020.

CASTRO, J. S.; SILVA, J. S.; FREITAS, L. C.; CARVALHO-NETA, R. N. F. Biomarcadores histopatológicos na espécie *Hoplias malabaricus* (Pisces, Osteichthyes, Erythrinidae) em uma Unidade de Conservação de São Luís (MA). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 6, p. 1687–1694, 2014.

CHAVES, L. P. F. A. **Morfologia dos órgãos genitais masculinos e níveis séricos de testosterona de jurará (*Kinosternon scorpioides*, Linnaeus, 1766) criado em cativeiro na região da baixada maranhense no estado do Maranhão**. 2011. 92 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), Centro de Ciências Agrárias, São Luís, 2011.

CHELVANAYAGAM, G.; PARKER, M.W.; BOARD, P.G. Fly fishing for GSTs: a unique nomenclature for mammalian and insect glutathione transferases. **Chemico-Biological Interactions**, v. 133, n.1-3, p. 256–260, 2001.

COSTA, H. C.; BÉRNILS, R. S. Répteis do Brasil e suas Unidades Federativas: lista de espécies. **Herpetologia Brasileira**, v. 7, n. 1, p. 11-57. 2018.

DELDUQUE, M. Ficha do bicho; muçuã. **Globo Rural**. n°. 176, p. 83-84, 2000.

DONG, H. K.; LU, G. H.; YAN, Z. H.; LIU, J. C.; NKOOM, M.; YANG, H. H. Responses of antioxidant and biotransformation enzymes in *Carassius carassius* exposed to hexabromocyclododecane. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 62, p. 46–53, 2018.

FERREIRA-JÚNIOR, P. D. Aspectos ecológicos da determinação sexual em tartarugas. **Acta Amazonica**, v.39, n. 1, p. 139-154, 2009.

GOLET, W. J.; HAINES, T. A. Snapping turtles (*Chelydra serpentina*) as monitors for mercury contamination of aquatic environments. **Environmental Monitoring Assessment**, v. 71, p. 211-220, 2001.

HEDDLE, J. A.; CIMINO, M. C.; HAYASHI, M.; ROMAGNA, F.; SHELBY, M. D.; TUCKER, J. D.; VANPARYS, P.; MACGREGOR, J. T. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 18, n. 4, p. 277-91, 1991.

HUGGETT, R. J.; KLIMERLE, R. A.; MEHRLE, P. M.; JR, H. L. B. Biomarkers: biochemical, physiological, and histological marker of antropogenic stress. USA: **Lewis Publishers**, 1992.

KELLER, J. M.; KUCKLICK, J. R.; ANDREW STAMPER, M.; HARMS, C. A.; MCCLELLAN-GREEN, P. D. Associations between organochlorine contaminant concentrations and clinical health parameters in loggerhead sea turtles from North Carolina, U.S.A. **Environmental Health Perspectives**, v. 112, n. 10, p. 1074-1079, 2004a.

KELLER, J. M.; KUCKLICK, J. R.; MCCLELLAN-GREEN, P. D. Organochlorine contaminants in loggerhead sea turtle blood: extraction techniques and distribution among plasma and red blood cells. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 254-264, 2004b.

LIMÓN-PACHECO, J.; GONSEBATT, M. E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. **Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 674, p. 137-147, 2009.

LINKS, J. M.; GROOPMAN, J. D. Biomarkers of exposure, effect, and susceptibility. In: McQueen, C.A. (Ed.). **Comprehensive Toxicology**. Amsterdam: Elsevier, p. 225-243, 2010.

MAGALHÃES, D. P.; FILHO, A. S. F. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 355-381, 2008.

MOLL, D.; MOLL, E.O. The ecology, exploitation and conservation of river turtles. **New York: Oxford University Press**, 2004. 393p.

MOLLER, K. T. Temperature-Dependent Sex Determination in Reptiles. Embryo Project Encyclopedia. Disponível em: <http://embryo.asu.edu/handle/10776/4214>. Acesso em: 27 de ago. 2022.

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

OLIVEIRA, F. G. **Biomonitoramento do Rio Perequê, Porto Belo – SC, utilizando a espécie de peixe *Geophagus brasiliensis***. 2018. 88 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, Paraná, 2018.

OLIVEIRA, J. S. P. **Efeitos toxicológicos da contaminação por agrotóxicos em recém-eclodidos de *Podocnemis expansa* (Testudines: Podocnemidae)**. 2020. 35 p. Dissertação (Mestrado) – Instituto Federal Goiano, Campus Urutaí, 2020.

OLIVEIRA, S. R. S.; BATISTA, W. S.; SOUSA, J. B. M.; NOLETO, K. S.; LIMA, I. M. A.; ANDRADE, T. S. O. M.; CARDOSO, W. S.; CARVALHO-NETA, R. N. F. C. Enzymatic and Histological Biomarkers in *Ucides cordatus* (Crustacea, Decapoda) in an Industrial Port on the North Coast of Brazil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 102, n. 6, p. 802-810, 2019.

PEREIRA, L. A.; SOUSA, A. L.; CUTRIM, M. V. J.; MOREIRA, E. G. Características ecológicas do habitat de *Kinosternon scorpioides* Linnaeus, 1766 (Reptilia, Chelonia, Kinosternidae) no município de São Bento - Baixada maranhense (Maranhão, Brasil). **Boletim do Laboratório de Hidrobiologia**, v. 20, p. 9-14, 2007.

PIGNATI, M. T. **Contaminação de *Podocnemis unifilis* (Testudines: Podocnemidae) por agrotóxicos e mercúrio na bacia do Rio Xingu, Brasil**. 2017. 109p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Belém, 2017.

PINHEIRO-SOUSA, D. B.; DA COSTA SOARES, S. H.; TORRES, H. S.; DE JESUS, W. B.; DE OLIVEIRA, S. R. S.; BASTOS, W. R.; DE OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; CARVALHO-NETA, R. N. F. Sediment contaminant levels and multibiomarker approach to assess the health of catfish *Sciades herzbergii* in a harbor from the northern Brazilian Amazon. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 208, p. 111540, 2021.

PRICHARD, P. C. H. Encyclopedia of turtles. New Jersey: T.F.H, 1979. p. 326.

RIBEIRO, E. B.; BASTOS, L. S.; GALENO, L. S.; MENDES, R. S.; GARINO JR, F.; CARVALHO-NETA, R. N. F.; COSTA, F. N. Integrated assessment of biomarker responses and microbiological analysis of oysters from São Luís Island, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 113, n. 1–2, p. 182–186, 2016.

ROCHA, M. B.; MOLINA, F. B. Algumas observações sobre a biologia e manejo do muçã. **Aquacultura**, v. 2, p. 25-26, 1987.

ROCHA, M. B.; MOLINA, F. B. Reproductive biology of *Kinosternon scorpioides* (Testudines: Kinosternidae) in captivity. **Tortoises and Turtles**. 1990.

RÜDIGER, H. W. Biomonitoring in occupational medicine. In: MARQUART, H.; SCHÄFER, S. G.; MCCLELLAN, R.; WELSCH, F. (eds.). **Toxicology**. San Diego: Academic Press; 1999. p.1027-39.

RYAN, P. B.; BURKE, T. A.; HUBAL, E. A. C.; CURA, J. J.; MCKONE, T. E. Using biomarkers to inform cumulative risk assessment, **Environmental Health Perspectives**, v. 155, n. 5, p. 833-840, 2007.

SANTOS, G. S. **Biomonitoramento das baías de Guanabara e Paranaguá através de biomarcadores de contaminação ambiental**. 2013. 120 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, Setor de Ciências Biológicas, Paraná, 2013.

SILVA, M. I. A. **Alterações hematológicas e bioquímicas em uma população de *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) em resposta a estressores ambientais**. 2011. 127p. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Programa de Pós-Graduação em Genética, São José do Rio Preto, 2011.

SILVA, M. I. A. **Estudo das alterações bioquímicas em sangue e diferentes órgãos de *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) (Testudines: Chelidae) coletados em ambiente contaminado ou expostos ao benzo[a]pireno**. 2015. 115 p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, 2015.

SILVA, M. I. A.; SILVA, T. L.; ALMEIDA, E. A. Study of biochemical changes in blood and various organs of *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) (Testudines: Chelidae) collected in contaminated environment or exposed to benzo[a]pyrene. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 1: gmr. 15018568, 2016.

SOUSA, D. B. P.; NETA, R. N. F. C. Micronucleus frequency and hematologic index in *Colossoma macropomum* (Pisces, Ariidae) for environmental impact assessment at a protected area in Brazil. **AIP Conference Proceedings**, v. 1618, n. September, p. 606–608, 2014.

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

UCHÔA, I. S.; MAGALHÃES, M. A. V. Teste de Micronúcleo um importante Biomarcador Celular. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 2, p. 3851-3857, 2020.

UETZ, P.; FREED, P.; AGUILAR, R.; HOSEK, J. (eds.) (2022). The Reptile Database. Disponível em: <http://www.reptile-database.org>. Acesso em: 30 de ago. 2022.

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

VENÂNCIO, L. P. R. **Cágado-de-barbelas (*Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812), Testudines: Chelidae) como modelo para a ecotoxicologia evolutiva: relacionamento entre contaminação ambiental e, condição e variabilidade genética**. 2012. 169 p. Tese (Doutorado em Genética) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, São José do Rio Preto, 2012.

VENTURA, E. C.; GAELZER, L. R.; ZANETTE, J.; MARQUES, M. R.; BAINY, A. C. Biochemical indicators of contaminant exposure in spotted pigfish (*Orthopristis ruber*) caught at three bays of Rio de Janeiro coast. **Marine Environmental Research**, v. 54, n. 3–5, p. 775–779, 2002.

VIANA, D. C.; RUI, L. A.; MIGLINO, M. A.; ARAÚJO, L. P. F.; OLIVEIRA, A. S.; SOUSA, A. L. Morphological study of epididymides the scorpion mud turtle in natural habitat (*Kinosternon scorpioides* – Linnaeus, 1766). **Biotemas**, v. 26, n. 2, p. 153-162, 2013.

VIARENGO, A.; LOWE, D.; BOLOGNESI, C.; FABBRI, E.; KOEHLER, A. The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 146, p. 281-300, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY (IPCS) – **Environmental Health Criteria** 155: Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. Geneva, 1993.

YOSHIDA, E. T. E. **Avaliação da influência da ingestão de lixo plástico nos indicadores de estresse oxidativo no sangue de tartarugas verdes (*Chelonia mydas*)**. 2012. 59 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Florianópolis, 2012.

Anexo B – Guia para autores (Normas CHEMOSPHERE)

Preparation

Queries

For questions about the editorial process (including the status of manuscripts under review) or for technical support on submissions, please visit our [Support Center](#).

NEW SUBMISSION

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or lay-out that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately. If you use the Your Paper Your Way service, please make sure that you also provide your highlights and the six suggested referees in this document.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example **Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions**.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file. The corresponding caption should be placed directly below the figure or table.

Peer review

This journal operates a double anonymized review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. Editors are not involved in decisions about papers which they have written themselves or have been written by family members or colleagues or which relate to products or services in which the editor has an interest. Any such submission is subject to all of the journal's usual procedures, with peer review handled independently of the relevant editor and their research groups. [More information on types of peer review](#).

REVISED SUBMISSIONS

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <https://www.elsevier.com/guidepublication>). See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor. **For revised submissions: always include one copy of the new text with changes clearly indicated (in red or bold or track change) and one version with all changes accepted, and a letter with your response to the comments of the reviewers. When submitting the revised manuscript, please make sure that you upload the final version of the paper. Please remove the old version(s) of the manuscript before submitting the revised version.**

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Include specific objectives/testable hypotheses in the last paragraph of Introduction.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

The QA/QC of the data must be clearly presented, particularly for low/trace concentrations or lower recovery efficiencies of some compounds. Authors of toxicological submissions are asked to report analytical confirmation of their experimental test concentrations.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Include a paragraph dealing with study limitations in the discussion section.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in

appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible. Please limit your title to 20 words or below - editors may ask for titles which are overly long to be shortened.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Abstract

A concise and factual abstract is required, maximum length 300 words. **The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone.** For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself (and then later again when used in the text, see Abbreviations).

Mandatory graphical abstract

A graphical abstract is mandatory for all Research Papers, Review Articles and Short Communications submitted to this journal. It does not need to be uploaded with the initial submission but must be supplied with any subsequent revisions. It should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with

abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: **use the international system of units (SI)**. If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUPAC: Nomenclature of Organic Chemistry: <http://www.iupac.org/> for further information.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the

images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.
 TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.
 TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.
 TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, Crossref and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and

global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Preprint references

Where a preprint has subsequently become available as a peer-reviewed publication, the formal publication should be used as the reference. If there are preprints that are central to your work or that cover crucial developments in the topic, but are not yet formally published, these may be referenced. Preprints should be clearly marked as such, for example by including the word preprint, or the name of the preprint server, as part of the reference. The preprint DOI should also be provided.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown.

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. *Mendeley Data*, v1. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <https://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Data at PANGAEA

Electronic archiving of supplementary data enables readers to replicate, verify and build upon the conclusions published in your paper. We recommend that data should be deposited in the data library PANGAEA (<http://www.pangaea.de>). Data are quality controlled and archived by an editor in standard machine-readable formats and are available via Open Access. After processing, the author receives an identifier (DOI) linking to the supplements for checking. As your data sets will be citable you might want to refer to them in your article. In any case, data supplements and the article will be automatically linked as in the following example: [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(95\)00105-9](https://doi.org/10.1016/0016-7037(95)00105-9). Please use PANGAEA's web interface to submit your data (<http://www.pangaea.de/submit/>).

Research data

This journal requires and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings, which may also include software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. When sharing data in one of these ways, you are expected to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References"

section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data page](#).

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Research Elements

This journal enables you to publish research objects related to your original research – such as data, methods, protocols, software and hardware – as an additional paper in a [Research Elements journal](#).

Research Elements is a suite of peer-reviewed, open access journals which make your research objects findable, accessible and reusable. Articles place research objects into context by providing detailed descriptions of objects and their application, and linking to the associated original research articles. Research Elements articles can be prepared by you, or by one of your collaborators.

During submission, you will be alerted to the opportunity to prepare and submit a manuscript to one of the Research Elements journals.

More information can be found on the [Research Elements page](#).

Data statement

To foster transparency, we require you to state the availability of your data in your submission if your data is unavailable to access or unsuitable to post. This may also be a requirement of your funding body or institution. You will have the opportunity to provide a data statement during the submission process. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

Anexo C – Comissão de Ética e Experimentação Animal (CEEAA)**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO
MARANHÃO**

Centro de Ciências Agrárias
Curso de Medicina Veterinária
Comissão de Ética e Experimentação Animal (CEEAA)
Credenciamento Provisório - CONCEA/MCT
Processo 01200.002200/2015-06 (449) - Emissão 19/06/2015

DECLARAÇÃO – PROTOCOLO Nº 010/2021**Segunda Via.**

Declaramos aos devidos fins, para atividade de pesquisa, que o projeto intitulado **“Uso da ecotoxicologia como ferramenta de análise dos efeitos tóxicos causados por poluentes em populações de *Kinosternon scorpioides* (Réptil: Cryptodira), espécie da fauna silvestre Amazônica Maranhense”** tem aprovação da Comissão de Ética e Experimentação Animal - CEEA do Curso de Medicina Veterinária da UEMA, conforme protocolo nº 10/2021 e será executado pelo doutorando do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, o biólogo **Carlos Alailson Licar Rodrigues**, sob orientação da Profa. Dra. Alana Lislea de Sousa - Docente do Departamento das Clínicas Veterinárias do Curso de Medicina Veterinária-CCA/UEMA. O projeto submetido atende as normas de Bem-Estar Animal da Resolução do CFMV nº 1000/2012 e a Lei 11.794/2008, e tem autorização SISBIO/ICMBio, número 85805-1 com renovação em 14/12/2023.

São Luís, 15 de junho de 2023.

Profa. Dra. Alana Lislea de Sousa
Presidente do CEEA/CMV/UEMA

Anexo D – Licença do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 85805-1	Data da Emissão: 14/12/2022 12:20:55	Data da Revalidação*: 14/12/2023
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: ALANA LISLEA DE SOUSA	CPF: 278.736.093-91
Título do Projeto: Biologia e Conservação de Quelônios da Baixada Maranhense: Uma Área de Proteção Ambiental ? Sítio Ramsar do Brasil.	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO	CNPJ: 06.352.421/0001-68

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	COLETA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS	12/2022	11/2023

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	ELBA PEREIRA CHAVES	Pesquisadora	001.728.513-51	Brasileira
2	Almerinda Maceira Medeiros	Pesquisadora	048.458.743-93	Brasileira
3	LIANNE POLLIANNE FERNANDES ARAUJO	Pesquisadora	665.545.353-49	Brasileira
4	Ligia Tchaicka	Pesquisadora	031.220.639-99	Brasileira
5	CARLOS ALAILSON LICAR RODRIGUES	Pesquisadora	035.924.063-10	Brasileira
6	DANIELLE ISIS SOUSA FERREIRA	Pesquisadora	003.159.853-64	Brasileira

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº Portaria ICMBio nº 748/2022. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0858050120221214

Página 1/6



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 85805-1	Data da Emissão: 14/12/2022 12:20:55	Data da Revalidação*: 14/12/2023
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: ALANA LISLEA DE SOUSA	CPF: 278.736.093-91
Título do Projeto: Biologia e Conservação de Quelônios da Baixada Maranhense: Uma Área de Proteção Ambiental ? Sítio Ramsar do Brasil.	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO	CNPJ: 06.352.421/0001-68

Observações e ressalvas

1	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional de Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
2	Deve-se observar as recomendações de prevenção contra a COVID-19 das autoridades sanitárias locais e das Unidades de Conservação a serem acessadas.
3	Esta autorização NÃO libera o uso da substância com potencial agrotóxico e/ou inseticida e NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de atender às exigências e obter as autorizações previstas em outros instrumentos legais relativos ao registro de agrotóxicos (Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, entre outros).
4	Esta autorização NÃO libera o uso da substância com potencial agrotóxico e/ou inseticida e NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de atender às exigências e obter as autorizações previstas em outros instrumentos legais relativos ao registro de agrotóxicos (Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, entre outros).
5	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
6	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Portaria ICMBio nº 748/2022, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgdn .
8	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
9	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
10	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infraestrutura da unidade.
11	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº Portaria ICMBio nº 748/2022. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0858050120221214

Página 2/6



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 85805-1	Data da Emissão: 14/12/2022 12:20:55	Data da Revalidação*: 14/12/2023
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: ALANA LISLEA DE SOUSA	CPF: 278.736.093-91
Título do Projeto: Biologia e Conservação de Quelônios da Baixada Maranhense: Uma Área de Proteção Ambiental ? Sítio Ramsar do Brasil.	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO	CNPJ: 06.352.421/0001-68

Outras ressalvas

1	RAN Goiânia-GO
---	----------------

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Descrição do local	Município-UF	Bioma	Caverna?	Tipo
1	APA da Baixada Maranhense	Santa Helena-MA	Amazônia	Não	Dentro de UC Estadual
2	APA da Baixada Maranhense	São João Batista-MA	Amazônia	Não	Dentro de UC Estadual
3	APA da Baixada Maranhense	São Bento-MA	Amazônia	Não	Dentro de UC Estadual
4	APA da Baixada Maranhense	Turilândia-MA	Amazônia	Não	Dentro de UC Estadual
5	APA da Baixada Maranhense	Peri Mirim-MA	Amazônia	Não	Dentro de UC Estadual
6	APA da Baixada Maranhense	Palmeirândia-MA	Amazônia	Não	Dentro de UC Estadual
7	APA da Baixada Maranhense	Matinha-MA	Amazônia	Não	Dentro de UC Estadual
8	APA da Baixada Maranhense	Bacurituba-MA	Amazônia	Não	Dentro de UC Estadual
9	APA da Baixada Maranhense	Pinheiro-MA	Amazônia	Não	Dentro de UC Estadual
10	APA da Baixada Maranhense	Viana-MA	Amazônia	Não	Dentro de UC Estadual

Atividades

#	Atividade	Grupo de Atividade
1	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Fora de UC Federal
2	Captura de animais silvestres in situ	Fora de UC Federal
3	Marcação de animais silvestres in situ	Fora de UC Federal
4	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Atividades ex-situ (fora da natureza)
5	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtde.
1	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Dermatemydidae	10
2	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Dermatemydidae	-
3	Marcação de animais silvestres in situ	Dermatemydidae	-
4	Captura de animais silvestres in situ	Dermatemydidae	-
5	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Dermatemydidae	-
6	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Podocnemididae	10
7	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Podocnemididae	-

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº Portaria ICMBio nº 748/2022. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0858050120221214

Página 3/6



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 85805-1	Data da Emissão: 14/12/2022 12:20:55	Data da Revalidação*: 14/12/2023
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: ALANA LISLEA DE SOUSA	CPF: 278.736.093-91
Título do Projeto: Biologia e Conservação de Quelônios da Baixada Maranhense: Uma Área de Proteção Ambiental ? Sítio Ramsar do Brasil.	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO	CNPJ: 06.352.421/0001-68

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtde.
8	Marcação de animais silvestres in situ	Podocnemididae	-
9	Captura de animais silvestres in situ	Podocnemididae	-
10	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Podocnemididae	-
11	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Emydidae	10
12	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Emydidae	-
13	Marcação de animais silvestres in situ	Emydidae	-
14	Captura de animais silvestres in situ	Emydidae	-
15	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Emydidae	-
16	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Chelidae	10
17	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Chelidae	-
18	Marcação de animais silvestres in situ	Chelidae	-
19	Captura de animais silvestres in situ	Chelidae	-
20	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Chelidae	-
21	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Geoemydidae	10
22	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Geoemydidae	-
23	Marcação de animais silvestres in situ	Geoemydidae	-
24	Captura de animais silvestres in situ	Geoemydidae	-
25	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Geoemydidae	-
26	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Kinosternidae	10
27	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Kinosternidae	-
28	Marcação de animais silvestres in situ	Kinosternidae	-
29	Captura de animais silvestres in situ	Kinosternidae	-
30	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Kinosternidae	-

A quantidade prevista só é obrigatória para atividades do tipo "Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ". Essa quantidade abrange uma porção territorial mínima, que pode ser uma Unidade de Conservação Federal ou um Município.

A quantidade significa: por espécie X localidade X ano.

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº Portaria ICMBio nº 748/2022. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0858050120221214

Página 4/6



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 85805-1	Data da Emissão: 14/12/2022 12:20:55	Data da Revalidação*: 14/12/2023
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: ALANA LISLEA DE SOUSA	CPF: 278.736.093-91
Título do Projeto: Biologia e Conservação de Quelônios da Baixada Maranhense: Uma Área de Proteção Ambiental ? Sítio Ramsar do Brasil.	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO	CNPJ: 06.352.421/0001-68

Materiais e Métodos

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
1	Amostras biológicas (Répteis)	Ectoparasita, Fezes, Fragmento de tecido/órgão, Regurgitação/conteúdo estomacal, Sangue, Secreção
2	Método de captura/coleta (Répteis)	Anzol, Armadilha tipo gaiola com atração por iscas (¿Box Trap/Tomahawk/Sherman¿), Captura manual, Coleta manual, Funil trap, Puçá
3	Método de marcação (Répteis)	Microchip, Corte de escudos marginais

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo destino
1	UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO	Laboratório

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº Portaria ICMBio nº 748/2022. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0858050120221214

Página 5/6

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 85805-1	Data da Emissão: 14/12/2022 12:20:55	Data da Revalidação*: 14/12/2023
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		
Dados do titular		
Nome: ALANA LISLEA DE SOUSA		CPF: 278.736.093-91
Título do Projeto: Biologia e Conservação de Quelônios da Baixada Maranhense: Uma Área de Proteção Ambiental ? Sítio Ramsar do Brasil.		
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO		CNPJ: 06.352.421/0001-68

De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

[illegible]

* Identificar o espécime do nível taxonômico possível.

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº Portaria ICMBio nº 748/2022. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0858050120221214

Página 6/6

Anexo E – Guia para autores (Normas ENVIRONMENTAL RESEARCH)

Article structure

For original full-length articles:

Introduction should be as concise as possible, without subheadings.

Materials and methods should be sufficiently detailed to enable the experiments to be reproduced.

Results and Discussion may be combined and may be organized into subheadings.

For commentaries and articles related to environmental policy, alternate formats will be accepted but should include an Introduction describing the problem in terms that a general reader will understand. All statements of fact need to be referenced and papers that make use of newly acquired data must include a Materials and methods section as well as a Results and Discussion section.

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately

after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Page 1 should contain the article title, the names and affiliations of all authors, and the name, telephone and fax numbers, e-mail address, and complete mailing address of the person to whom all correspondence should be sent.

Page 2 should contain an abstract and six descriptive keywords.

Page 3 provides information on funding sources supporting the work described in the manuscript. For all papers dealing with research or studies on human subjects or experimental animals, evidence must be provided of review and approval by an appropriately constituted committee for human subjects or animal research. **If this information is not provided upon submission, the paper will be returned without review.**

For original full-length Research Papers:

Introduction should be as concise as possible, without subheadings.

Materials and methods should be sufficiently detailed to enable the experiments to be reproduced or the study design to be understood fully.

Results and Discussion may be combined and may be organized into subheadings.

For certain SHort Communications related to environmental policy, alternate formats will be accepted but should include an Introduction describing the problem in terms that a general reader will understand. All statements of fact need to be referenced and papers that make use of newly acquired data must include a Materials and methods section as well as a Results and Discussion section.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Abstracts should be a maximum of 300 words in length.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Abbreviations should follow the usage established by *Chemical Abstracts*. Please restrict the use of acronyms, especially non-standard ones, as much as possible.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Acknowledgments should be brief and should precede the references. In agreement with the Commission on Publication Ethics, authors must submit full information on sources of funding and other support for their work that is presented in their paper.

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, it is recommended to include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms,

e.g., X/Y . In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by $\exp$. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files. A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.
 TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.
 TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.
 TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, Crossref and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Preprint references

Where a preprint has subsequently become available as a peer-reviewed publication, the formal publication should be used as the reference. If there are preprints that are central to your work or that cover crucial developments in the topic, but are not yet formally published, these may be referenced. Preprints should be clearly marked as such, for example by including the word preprint, or the name of the preprint server, as part of the reference. The preprint DOI should also be provided.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software](#).

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

References should be cited in the text by the author's name and year of publication. References should be listed alphabetically in an unnumbered list at the end of the paper in the following style:

Baecklund, M., Pedersen, N.L., Bjorkman, L., Vahter, M., 1999. Variation in blood concentrations of cadmium and lead in the elderly. *Environ. Res.* 80, 222-230.

Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. *Mendeley Data*, v1. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Letourneau, D.K., 1997. Plant-arthropod interactions in agroecosystems. In: Jackson, L.E.(Ed.), *Ecology in Agriculture*. Academic Press, San Diego, pp. 239-290.

Morgan, W.K.C., Seaton, A. (Eds.), 1995. *Occupational Lung Diseases*, 3rd ed. Saunders, Philadelphia, pp. 308-373.

References drawn from the worldwide web must include the date in which the material was accessed.

The names of journals should be abbreviated according to the latest available edition of *Index Medicus* or *Chemical Abstracts Service Source Index*. Only articles that have been published or are in press should be included in the references. "Manuscript in preparation," "personal communication," and "unpublished observation" should be cited as such in the text.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

Only articles that have been published or are in press should be included in the references. "Manuscript in preparation," "personal communication," and "unpublished observation" should be cited as such in the text.

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content.

In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal requires and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings, which may also include software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. When sharing data in one of these ways, you are expected to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data page](#).

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Research Elements

This journal enables you to publish research objects related to your original research – such as data, methods, protocols, software and hardware – as an additional paper in a [Research Elements journal](#).

Research Elements is a suite of peer-reviewed, open access journals which make your research objects findable, accessible and reusable. Articles place research objects into context by providing detailed descriptions of objects and their application, and linking to the associated original research articles. Research Elements articles can be prepared by you, or by one of your collaborators.

During submission, you will be alerted to the opportunity to prepare and submit a manuscript to one of the Research Elements journals.

More information can be found on the [Research Elements page](#).

Data statement

To foster transparency, we require you to state the availability of your data in your submission if your data is unavailable to access or unsuitable to post. This may also be a requirement of your funding body or institution. You will have the opportunity to provide a data statement during the submission process. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

After acceptance

Online proof correction

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

Anexo F – Protocolo bioquímica adaptado para *Kinosternon scorpioides* (juraré)

PROTOCOLO BIOQUÍMICA - ADAPTADO PARA *Kinosternon scorpioides* (JURARÉ)

PREPARO DAS SOLUÇÕES A SEREM UTILIZADAS NOS ENSAIOS COM GST E CATALASE EM TECIDOS DE JURARÉ: FÍGADO E SANGUE (OS MESMOS REAGENTES SÃO USADOS NO PROTOCOLO PARA SANGUE)

1ª ETAPA: PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES PARA ANÁLISES:

1ª Solução Tampão para juraré (usado na homogeneização da amostra de tecido).

- Tris HCl 50mM (3,027 gramas)
- KCl 0,15M, pH 7,4 (5,60 gramas)
- Volume: 500mL de água destilada ou ideonizada (atenção: esse valor de 500mL é dividido em 5 tubos de ensaio de 100mL).

2ª Solução Tampão de Reação para juraré (ele é usado no ensaio enzimático).

- Fosfato de potássio (KH₂PO₄) monobásico (7,755 gramas).
- Fosfato de potássio (KH₂PO₄) dibásico (4,355 gramas).
- Depois desse preparo, é preciso acertar o pH da solução em 7,0 usando o HCl (ácido clorídrico).
- Na solução, usar 500mL de água destilada ou ideonizada.

3ª Solução – 1Cloro-2-4 di-nitrobenzeno (CDNB) 100mM em etanol.

- Preparar em um eppendorff, 0,02026 gramas de CDNB a ser dissolvido em 1mL de etanol 100% e agitar no vórtex. Atenção: fazer 4 eppendorff cada um com o mesmo volume descrito acima.

4ª Solução – Glutathione reduzida (GSH) 100mM em tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 7,0.

- Pesar em um eppendorff, 0,0305 gramas de GSH em 1mL de tampão de reação para juraré produzido acima. Fazer quadruplicatas (4 tubos).

2ª ETAPA - PROTOCOLO PARA CATALASE EM TECIDO: FÍGADO E SANGUE:

1ª Solução Tampão para Catalase.

- Usar 50mL de água destilada ou ideonizada.
- Tris-base (6,055 gramas);
- EDTA em pó (0,07305 gramas) e dissolver os dois em 50mL de água destilada.
- Após isso, ajustar o pH da solução em 8,0 utilizando o HCl com Phmetro.

2ª Solução Meio de Reação.

- Colocar 100uL de H₂O₂ 10mM 30% (Peróxido de Hidrogênio) em 100 mL de água ideonizada ou Milli-Q.
- Dessa solução acima, retirar 10mL e descartar. Depois disso, adicionar 5mL de Tampão de Catalase nos 90mL restantes e adicionar 4mL de água ideonizada ou Milli-Q.
- Atenção: nunca esquecer de identificar todos os frascos das soluções preparadas.

3ª ETAPA – PARTE DA HOMOGENEIZAÇÃO – PROCEDIMENTO APENAS PARA TECIDO:

Material necessário:

- | | |
|---------------------------------------|------------------------------|
| • Beckers de 50mL | • Pipetas e ponteiras |
| • Tubos de ensaio para homogeneização | • Pipetas pasteur |
| • Caneta para marcação dos tubos | • Pisseta |
| • Eppendorff numerados com furos | • Pinças e palito |
| • Gelo e caixa de isopor | • Vasilhame para descartes |
| • Estante para tubos | • Homogeneizador |
| • Contonetes | • Centrifuga |
| • Papel toalha | • Solução Tampão para juraré |

Observação: antes de iniciar o procedimento, selecionar a quantidade e a numeração das amostras, além de enumerar os tubos, eppendorffs (em duplicatas) e beckers.

Procedimentos:

- 1 – a solução tampão para jurará que for utilizar deve ficar refrigerando (caixa de isopor com gelo);
 - 2 – Retirar as amostras e colocar em caixas de isopor com gelo;
 - 3 – Retirar e descongelar as amostras sobre o gelo;
 - 4 – Pesar em um Becker, 1 grama de cada amostra; guardá-la sobre refrigeração constante (isopor com gelo).
Atenção: lavar a pinça de uma pesagem para a outra das amostras;
 - 5 – Verificar se o homogeneizador estar limpo; colocar 1 grama de amostra de cada vez em um Becker limpo, acrescentar 4mL de tampão para jurará (proporção de 1:4);
 - Observação:** para 1 grama de tecido, colocar 4mL de solução tampão para jurará.
 - 6 – Guardar o tampão correspondente na caixa com gelo. Manter sempre refrigerado;
 - 7 – Colocar os homogeneizados nos tubos enumerados com o código da amostra e mantê-los em refrigeração enquanto aguarda a **primeira centrifugação**;
 - 8 – Ligar a centrífuga, adequar o programa de centrifugação (Programa 2; tempo de 30 minutos);
 - 9 – Colocar os tubos enumerados na centrífuga;
 - 10 – Equilibrar os tubos no rotor com outros contendo água (mesma medida) antes de iniciar a centrifugação; colocar os tubos em posições opostas;
 - 11 – Após a centrifugação, retirar os tubos e coloca-los em um suporte com gelo (antes, retire de todos os tubos, a camada de gordura (se houver) com cotonete);
 - 12 – Em seguida, com a pipeta de pasteur, transferir todo o sobrenadante cuidadosamente (não sugar os resíduos - pellets) para 3 tubos limpos de eppendorffs (furados e enumerados);
 - 13 – Colocá-los imediatamente em gelo e depois congelar para posterior leitura no espectrofotômetro. Obs: esta etapa deve ser realizada somente se não for feita imediatamente a segunda centrifugação.
- Observação: Lavar o homogeneizador com água normal + água destilada.

SEGUNDA CENTRIFUGAÇÃO: Programa 3, tempo: 70 minutos.

- 1 – Descongelar em refrigeração (caixa de isopor com gelo) 1 tubo eppendorff de cada amostra (desconsiderar este passo, caso o material não esteja congelado);
- 2 – Retirar 1mL da amostra e adicionar em tubo de ensaio enumerado contendo 4mL de solução tampão para jurará (manter os tubos em refrigeração, enquanto aguarda a centrifugação); Obs: trocar as ponteiros sempre de uma amostra para a outra.
- 3 – Fazer a **segunda centrifugação**, após equilibrar os tubos no rotor;
- 4 – Após a centrifugação, retirar os tubos da centrífuga e coloca-los sob refrigeração (estante com gelo); o sobrenadante resultante será usado para calcular a GST.

4ª FASE – ENSAIO ENZIMÁTICO PARA GST - SANGUE

- 1- Ligar o espectrofotômetro 20 minutos antes da leitura;
 - 2 – Fazer a leitura das amostras no espectrofotômetro conforme condições no quadro abaixo;
- ATENÇÃO: iniciar sempre os ensaios com a GST e depois seguir com Catalase.

Condições de Reação apenas para tecido – fígado. Para sangue, foram adaptadas outras condições de reação expressos no final deste protocolo.

Elementos	Branco	Amostra
Volume de Tampão de Reação	980 uL	940 uL
CDNB	10 uL	10 uL
GSH	10 uL	10 uL
		40 uL

- 3 – Pipetar os volumes em cubetas de quartzo ou de vidro de 1mL conforme a ordem na tabela acima. Procurar evitar o contato com os reagentes antes do início da reação, colocando em cada lado da cubeta;
 - 4 – Homogeneizar o conteúdo de cada cubeta por inversão (padronizar 4 vezes);
 - 5 – Imediatamente, registrar em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 340 nm a 30°C durante dois 2 minutos (120 segundos). Salvar os valores gerados.
- Volume final da reação: 1000uL.
Fazer a leitura em 340 nanômetros (absorbância).

5ª FASE – ENSAIO ENZIMÁTICO PARA CATALASE - SANGUE

Elementos	Branco	Amostra
Volume de Tampão Meio de Reação para Catalase	1000 uL	960 uL
		40 uL

Volume final da reação: 1000uL.

Fazer a leitura em 240 nanômetros (absorbância).

Condições de reação apenas para tecido – fígado. Para sangue, foram adaptadas outras condições de reação expressos no final deste protocolo.

CONDIÇÕES DE REAÇÃO – SANGUE DE JURARÁ (ADAPTADO)**1ª PARTE:**

Diluição do sangue total em 1:5 (10uL de sangue total em 490uL de água Milli-Q, Ideonizada ou destilada).

ENSAIO ENZIMÁTICO – GST EM SANGUE (340 nM) – OS VALORES FORAM DUPLICADOS PARA UM VOLUME FINAL DE 2,0 mL

Tampão de Reação para jurará	940 uL x 2	1880 uL
CDNB	10 uL x 2	20 uL
GSH	10 uL x 2	20 uL
Amostra (diluída)	40 uL x 2	80 uL
Volume Final		2,0 mL

ENSAIO ENZIMÁTICO – CATALASE EM SANGUE (240nM) - OS VALORES FORAM DUPLICADOS PARA UM VOLUME FINAL DE 2,0 mL

Meio de Reação para Catalase	960uL x 2	1920 uL
Amostra (diluída)	40uL x 2	80 uL
Volume Final		2,0 mL

2ª PARTE – QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS EM SANGUE TOTAL DILUÍDO

	Branco	Padrão	Amostra
Amostra	-	-	80 uL
Padrão	-	50 uL	-
Biureto	2,5 Ml	2,5 mL	1.920 uL

- Fazer a leitura no espectrofotômetro em 545 nm (lembrar de alterar no programa do computador).
- Homogeneizar bem e deixar em repouso por 10 minutos, acertar o zero com o branco. A cor é estável por 30 minutos.

Anexo G – Protocolo Teste de Micronúcleos adaptado para *Kinosternon scorpioides***PROTOCOLO - TESTE DE MICRONÚCLEOS****PREPARO DAS SOLUÇÕES:****GIEMSA**

- 1g de Giemsa em pó (Merck)
- 54 ml de glicerina
- 84 ml de metanol P. A
- Dissolver o pó (Giemsa) em glicerina aos poucos e em banho maria a 60°C durante 1h30 a 2h, sempre mexendo. Deixar esfriar a temperatura ambiente. Colocar o Giemsa em um frasco escuro e adicionar aos poucos 84 ml de metanol P. A, agitando o frasco para não sedimentar. Deixar o frasco em ambiente escuro por 1 semana, agitando-o 2 vezes ao dia. Antes de usar, filtra-lo e coloca-lo em outro frasco agitando sempre (pode sobrar um pouco de pó no fundo). Este frasco será o estoque que deverá ser filtrado e colocado em um frasco menor e escuro para o uso. Manter em temperatura ambiente.

TAMPÃO FOSFATO

- Preparar duas soluções A e B e guarda-las na geladeira misturadas ou não na proporção 1:1.

SOLUÇÃO A: (solução ácida)

- 4.0827g de KH_2PO_4 (fosfato de potássio nonobásico 0.06M) e diluir em 500 ml de água destilada.

SOLUÇÃO B: (solução básica)

- 10.7442g de Na_2HPO_4 (fosfato de sódio dibásico 0.06M) e diluir em 500 ml de água destilada.
- Misturando-se as duas soluções em um erlemeyer obtém-se 1L de solução tampão A + B, que quando medido seu pH deve ser igual a 6,8. Se der diferente acertar.

PREPARAÇÃO DOS ESFREGAÇOS

- As lâminas a serem utilizadas para os esfregaços devem ser mantidas em álcool 70%. No momento de realizar o esfregaço e retirar a lâmina do álcool secar rigorosamente com pano de algodão (para evitar que fiquem felpas aderidas à lâmina).
- Pingar 1µl de sangue total fresco e fazer o esfregaço com uma lâmina com os cantos lixados. Deixar secar por 24h.
- Fixar em metanol 100% gelado e deixar secar por 24h.
- Corar com giemsa 10% (40 ml de giemsa + 360 ml de tampão Fosfato) por 20 mim (volumes calculados para uma cuba de vidro de volume 400 ml). Com essa solução é possível corar até 20 lâminas).