ANGÉLICA MARÍA SÁNCHEZ-SARMIENTO

Determinação de pesticidas organoclorados em tecidos de tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*) provenientes da costa sudeste do Brasil: estudo da ocorrência em animais com e sem fibropapilomatose

São Paulo

2013

ANGÉLICA MARÍA SÁNCHEZ-SARMIENTO

Determinação de pesticidas organoclorados em tecidos de tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*) provenientes da costa sudeste do Brasil: estudo da ocorrência em animais com e sem fibropapilomatose

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:
Patologia

Área de concentração:
Patologia Experimental e Comparada

Orientadora:
Profa. Dra. Eliana Reiko Matushima

São Paulo

2013

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2871
FMVZ

Sánchez-Sarmiento, Angélica María
Determinação de pesticidas organoclorados em tecidos de tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*) provenientes da costa sudeste do Brasil: estudo da ocorrência em animais com e sem fibropapilomatose. / Angélica María Sánchez-Sarmiento. -- 2013.
123 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Profa. Dra. Eliana Reiko Matushima.

1. Ecotoxicologia. 2. *Chelonia mydas*. 3. Fibropapilomatose. 4. Agrotóxicos organoclorados. I. Título.

BIOÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Presença de contaminantes ambientais em tecidos de tartaruga-verde (*Chelonia mydas*) provenientes da costa brasileira: prevalência nos animais acometidos pela fibropapilomatose", protocolado sob o nº 2116/2010, utilizando tartarugas verdes, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Eliana Reiko Matushima, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 16/02/2011.

We certify that the Research "Presence of environmental contaminants in tissues of Green Turtle (*Chelonia mydas*) from the Brazilian Coast: prevalence in animals affected by fibropapilomatosis", protocol number 2116/2010, utilizing Green Turtles, under the responsibility Profa. Dra. Eliana Reiko Matushima, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 02/16/2011.

São Paulo, 17 de fevereiro de 2011

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
Fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SÁNCHEZ-SARMIENTO, Angélica María

Título: **Determinação de pesticidas organoclorados em tecidos de tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*) provenientes da costa sudeste do Brasil:** estudo da ocorrência em animais com e sem fibropapilomatose

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: _____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meus pais, Luz Amparo e Herwing;
a meus irmãos Paula Andrea, Santiago, Luis Francisco e Juan Felipe;
a minha sobrinha, Angélica Sofía;
a minha avó, Lilia;
e a minhas tias, Mónica, Amanda e Yaneth.
DEUS tem me privilegiado com a sua existência.
Agradeço o amor, a companhia, os valores recebidos,
Mas, principalmente, o exemplo!

Eu amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeira instância, a DEUS, pela vida e tudo que nela tenho recebido: amor, amigos e experiências. Tenho certeza de que tudo acontece conforme sua divina vontade, ou seja, no momento certo, e é nesse divino momento, por sua vez (exato e preciso, mesmo que às vezes fuja da nossa compreensão), que as pessoas e coisas indicadas aparecem em nosso caminho... Assim, eu vim parar no Brasil, que, como aquela famosa música diz, é *"abençoado por Deus e bonito por Natureza*".

Agradeço a minha linda família por compreender minha ausência, me dar força a distância, apoio nas minhas escolhas e sempre ter orgulho de mim especialmente a Santiago, Angélica Sofia, Paula Andrea e Luz Amparo. Vocês são o mais importante na minha vida! A Jonas, por ser essa pessoa tão maravilhosa que é, por fazer parte da minha vida, me dar apoio e felicidade, te amo!.Também agradeço a sua família pelo carinho!

Meu profundo carinho e gratidão para com minha orientadora, a Profa. Dra. Eliana Reiko Matushima, pela confiança e amizade depositada quando me recebeu como estagiária, abrindo-me as portas para realização dos meus objetivos. Serei eternamente grata pela oportunidade!

Agradeço muitíssimo a minha colega bióloga, amiga e "irmã", Silmara Rossi, por tudo o que tem acrescentado na minha vida tanto acadêmica quanto pessoal. Agradeço as nossas conversas multidisciplinares em inglês, espanhol, português (ou melhor, em portunhol? risos...). Agradeço, também, a sua linda família: Gabi, Sil, Alê, Lourdes e José Antonio por me adotarem como a "irmã mais nova" e ao Dr. Mario Siqueira pelas preces.

A Rodrigo Teixeira e demais profissionais do Zoológico "Quinzinho de Barros", Sorocaba/SP, pelo carinho e enorme aprendizado. São boas lembranças que tenho logo após a minha chegada ao país!

Prof. Dr. Valdemar Luiz Tornisielo, agradeço por abrir as portas do laboratório de Ecotoxicologia (CENA-ESALQ/USP) e pelo interesse e pela ajuda no trabalho com as tartarugas! Dr. Franz Zirena Vilca, também agradeço por todo apoio recebido e pela amizade durante a realização dos testes.

Luiz Américo e demais pessoas do laboratório de Química Verde do IQ-USP, agradeço a todos pela disposição e interesse desde o início do trabalho.

Agradeço o Biólogo Robson Guimarães dos Santos pela amizade e por toda a colaboração e apoio logístico em Vitória/ES.

Agradeço a Dra. Cecília Baptistotte, José Henrique Becker e Renato Velloso do Projeto TAMAR-ICMBio; as Dras. Juliana Marigo e Carolina Bertozzi do Projeto Biopesca; ao Dr. Max Werneck e Marcillo Altóe pelo apoio na realização das coletas.

Sou eternamente grata pelo carinho e vivências que tive com o VPT, com o pessoal do LAPCOM e demais professores, companheiros e amigos da USP, aqueles que estão mais longe ou aqueles que ainda estão por perto. Agradeço o Prof. Dr. José Luiz Catão-Dias pelo carinho e amizade para com os estudantes hispanófonos. Suas sábias palavras foram sempre tão bem-vindas! Lembrarei, também, com carinho, o Prof. Dr. Paulo Maiorka, Luciana Torres Neves, Adriana de Siqueira, Juliana Guerra, Omar A. Gonzáles Viera, Charlene Lújan Veja, Kátia Groch, Fabiola Prioste, Pedro Henrique de Oliveira, Renata Carolina Santos, Marina Bueno, Luis Nuñez, Silvana Santander, Catia Dejuste, Claudia Neimeyer, Rosely Gioia, Stefanie Santos, Marco Aurelio Gattamorta e Marcelo Carvalho. Um agradecimento especial ao Dr. Alexander Genoy pela colaboração e carinho recebido quando recém-chegada a um novo país; ao Ralph Vanstreels pela ajuda nas análises estatísticas em inúmeras ocasiões, e ao técnico Jorge Oyakawa pelo apoio incondicional e disposição. Aos meus colegas tartarurólogos, ou melhor, “tartarugas ninjas da Matu”, Sil, Fa, Marco, Rô e Matu: é uma grandiosa vivência fazer parte disso tudo!

Agradeço também a Jeane Francisco, Sérgio Monteiro, Graziela Andrade, Carlos A. Dorelli e Rodrigo Pimpinato, estagiários e demais pessoas do Laboratório de Ecotoxicologia do CENA/USP; o pessoal do TEXAS/EUA: Evelyn Reategui Zirena, Sarah Webb, Micah Thal, Rebecca Pezdek, Kayla Campasino, Amanda Parra, Francis Loko, Aaron Conti, Luz Merissa, Ivan Garcia, Diego Lazo e a professora Céline Godard-Codding; e o pessoal do México: Lisette e Aram Ayala, Enrique Naranjo, Oscar Melo, Carlos Salas, Paula Clausell e Areli Coronado, e os professores Alan Zavala e Carlos Delgado pelo aprendizado, por toda ajuda e pelos momentos compartilhados durante a visita nos respectivos países.

Agradeço muitíssimo a Heloisa Helena Beraldo pela enorme ajuda com a revisão e também a Mariana Sayuri e a Sra. Elsa Faquim pela grandiosa ajuda com as referencias.

Agradeço o apoio financeiro do CNPq, processo 130082/2011-2 e da FAPESP, processo 2011/04565-7 com a bolsa de estudos concedida e a Pró-reitoria de Pós-Graduação da Universidade de São Paulo, pelo auxílio econômico concedido para a realização do estágio no exterior. E também as outras pessoas que fizeram parte deste trabalho e que eu tenha me esquecido de mencionar, pois sua ajuda foi fundamental. Ficarei sempre grata com aqueles seres que deram um toque especial na minha vida, Violeta, Gil e, naturalmente, as tartarugas marinhas, tão maravilhosas e misteriosas, fonte de inspiração... MUCHAS GRACIAS!

RESUMO

SÁNCHEZ-SARMIENTO, A. M. **Determinação de pesticidas organoclorados em tecidos de tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*) provenientes da costa sudeste do Brasil:** estudo da ocorrência em animais com e sem fibropapilomatose. [Determination of organochlorine pesticides in tissues of green turtles (*Chelonia mydas*) from the southeastern coast of Brazil: study of the occurrence in animals with and without fibropapillomatosis]. 2013. 123 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

O aumento das intervenções antropogênicas, nos âmbitos marinho e costeiro representa grande risco aos ecossistemas de suporte de numerosas populações de animais como as tartarugas marinhas. Desequilíbrios no balanço ecológico desses *habitats* afetam negativamente a sobrevivência de quelônios de longa vida, como a *Chelonia mydas,* seriamente ameaçada de extinção. As ameaças à espécie incluem captura incidental por pesca, doenças e degradação dos habitats de alimentação e nidificação. Uma das principais doenças é a fibropapilomatose (FP) ou *Green Turtle Fibropapiloma Disease* (GTFD), afecção tumoral e de caráter infeccioso que acomete predominantemente espécimes juvenis. Numerosas hipóteses têm surgido a respeito da etiologia da doença, mas ainda nada é conclusivo. Contudo existe o consenso de que a etiologia da mesma seja "multifatorial" envolvendo um α-herpesvírus como agente etiológico primário e a participação de diversos co-fatores genéticos, nutricionais e ambientais. No Brasil a prevalência média de FP en *C. mydas* varia conforme a região, existindo localidades nas quais não há registro da doença. O aumento da prevalência da FP tem sido implicada à degradação dos habitats marinhos, relacionado por sua vez a contaminantes ambientais como os organoclorados e seus metabólitos. Estes compostos caracterizam-se por serem altamente persistentes, bioacumulando e biomagnificando no ambiente marinho através do tempo. Além disso, são conhecidos por causarem inúmeros efeitos na saúde, interferindo na imunidade do indivíduo e favorecendo a manifestação de doenças, inclusive sendo apontados como agentes carcinogênicos. No presente trabalho foi desenvolvida uma técnica de extração e purificação baseada no método QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) para monitoramento pela cromatografia gasosa com captura de elétrons (GC-µECD) dos agrotóxicos clorados: α-BHC, β-BHC, Heptacloro, Dicofol, α-Endosulfan, β-endosulfan, Sulfato endosulfan, pp'-DDD, op'-DDD, pp'-DDE, op'-DDE e Mirex nos tecidos adiposo e hepático de 64 tartarugas-verdes juvenis (Cumprimento Curvo da Carapaça - CCC = 38,68±5,41cm) acometidas ou não pela FP (24 com FP *vs.* 40 sem FP), espécimes que vieram a óbito por captura incidental em redes de pesca ou foram

encontradas encalhadas nas praias de Ubatuba/SP, Praia Grande/SP e Vitória/ES. Objetivou-se esclarecer possíveis correlações das suas concentrações com variáveis como sexo, tamanho (CCC), índice de condição corporal (ICC), severidade; índice de fibropapilomatose (FPI) e escore de fibropapilomatose (FPS) e ocorrência da doença em algumas localidades da região sudeste do país com diferentes taxas de prevalência da FP, na tentativa de inferir o papel dos mesmos na patogenia desta afecção. Foi observada correlação significativa entre a porcentagem lipídica entre as amostras dos tecidos adiposo e hepático, assim como entre a concentração total de organoclorados (ΣOCS) nos tecidos adiposo e hepático. Embora observadas algumas diferenças na presença ou ausência de alguns contaminantes, estas foram dispersas e não determinantes, ou seja, não permitiram estabelecer um padrão em relação aos diferentes fatores do histórico individual. Não foram encontradas diferenças significativas entre a ΣOCS para ambos os tecidos, em relação ao sexo do animal ou localidade, que permitissem inferir alguma relação entre o grau de contaminação e a variação regional da prevalência da FP. Também não foi possível identificar correlações significativas das concentrações dos poluentes em relação à presença da FP nem entre o FPI e o FPS e a ΣOCS nos tecidos adiposo e hepático. Tampouco foi possível identificar correlações significativas entre o ICC ou CCC e a ΣOCS. Os resultados deste trabalho apresentam um registro temporal do perfil de contaminação nas tartarugas-verdes de vida livre da costa sudeste, confirmando a biodisponibilidade de OCs nas diferentes regiões avaliadas. Embora não tenha sido encontrada uma correlação direta entre a concentração de OCs e a Fibropapilomatose, este estudo demonstra que as tartarugas verdes oriundas da costa sudeste do Brasil estão expostas a níveis significativos de pesticidas organoclorados os quais poderiam ter algum papel na etiologia multifatorial da doença. Estes contaminantes ambientais podem agir afetando a taxa de prevalência de FP, agindo possivelmente como agentes imunossupresores ou através da genotoxicidade e promoção tumoral. Estudos futuros serão desenvolvidos para melhor caracterizar a ação dessas substâncias e seus efeitos nas tartarugas marinhas e para esclarecer como outros fatores podem influenciar esses resultados.

Palavras-chave: Ecotoxicologia. *Chelonia mydas*. Fibropapilomatose. Agrotóxicos organoclorados.

ABSTRACT

SÁNCHEZ-SARMIENTO, A. M. **Determination of organochlorine pesticides in tissues of green turtles (*Chelonia mydas*) from the southeastern coast of Brazil: study of the occurrence in animals with and without fibropapillomatosis**. [Determinação de pesticidas organoclorados em tecidos de tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*) provenientes da costa sudeste do Brasil: estudo da ocorrência em animais com e sem fibropapilomatose]. 2013. 123 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The increase of anthropogenic impacts on both marine and coastal environments is threatening the ecosystems of numerous animal populations, including sea turtles. Disturbances in the ecological balance of these habitats negatively affect the survival of long-lived chelonids such as green turtles (*Chelonia mydas*), which are already considered endangered. Threats to this species include incidental capture by fisheries, habitat degradation of nesting and feeding areas, and diseases. One of the most relevant diseases is fibropapillomatosis (FP) or Green Turtle Fibropapilloma Disease (GTFD), an infectious tumoral disease that predominantly affects juveniles. Numerous hypotheses have been proposed to explain this disease's aetiology, and while none has been conclusively demonstrated there is a consensus that it is multifactorial and involves a α-herpesvirus as the primary etiologic agent along with genetic, nutritional and environmental cofactors. The prevalence of FP in *C. mydas* in Brazil varies among regions, with locations in which the disease remains unreported. Prevalence has been correlated to the degree of degradation of marine habitats, which in turn is related to the presence of environmental contaminants such as organochlorines and their metabolites. These compounds are difficult to break down and persist, bioaccumulate and biomagnify in marine environments over long periods of time. They are also known to produce numerous health effects in the organisms in which they accumulate, hampering immunity and favouring the manifestation of opportunistic disease, with some of these compounds being also carcinogens. In this study we developed extraction and purification technique based on the QuEChERS method (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) and used gas chromatography with electron capture (GC-µECD) to detect and quantify organochlorine pesticides (α-BHC, β-BHC, Heptachlor, Dicofol, α-endosulfan, β-endosulfan, Endosulfan sulphate, pp'-DDD, op'-DDD, pp'-DDE, op'-DDE, and Mirex) in adipose and hepatic tissue samples from 64 juvenile green sea turtles [Curved Carapace Length - CCL = 38.68 ± 5.41 cm] affected or not by FP (24 with FP *vs.* 40 without FP). These

specimens died due to incidental capture by fishing nets or were found dead on beaches of Southeast Brazil: Ubatuba / SP, Praia Grande / SP and Vitória / ES. Aiming to clarify the role of the organochlorines in the pathogenesis of FP, we attempted to establish correlations between the concentration of these compounds and variables such as sex, size (CCL), Body Condition Index (BCI) and disease severity [fibropapillomatosis index (FPI) and fibropapillomatosis score (FPS)], and local FP prevalence. A significant correlation was observed between the lipid percentage of adipose and hepatic samples, as well as between adipose and hepatic organochlorine total concentrations (ΣOCS). Although some differences were observed regarding the presence or absence of contaminants in relation to characteristics of the individual history, it was not possible to establish patterns that reflected biological significance. For both adipose and hepatic tissues, no significant differences were found in the ΣOCS with regards to individual sex or capture locality that would allow inferring relationships between the individual contamination levels and the regional variation on the prevalence of FP. It was also not possible to identify significant relationships between each pollutant concentration in the adipose or hepatic tissue and the presence of FP. No correlation was observed between ΣOCS in adipose or hepatic tissues and FPI, FPS, BCI and CCL. The results provide a contamination profile of free-ranging green turtles of the southeast coast during the study period, confirming the bioavailability of OCs in the different locations evaluated. Although a direct correlation between the concentration of OCs and fibropapillomatosis was not found, this study demonstrates that green turtles from the southeast coast of Brazil are exposed to significant levels of organochlorine pesticides that could play a role in the multifactorial etiology of the disease. These contaminants may affect the prevalence of FP, possibly acting as immunosuppressive agents or through genotoxicity and tumor promotion. Future studies will be conducted to better characterize the role of these substances and their effects on sea turtles and to clarify how other factors that may influence their impacts.

Keywords: Ecotoxicology. *Chelonia mydas.* Fibropapillomatosis. Organochlorine pesticides.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Indivíduo juvenil da espécie C. mydas 23
Figura 2 - Características morfológicas da *C. mydas* 25
Figura 3 - Distribuição geográfica da *C. mydas* no Brasil 26
Figura 4 - Estrutura química molecular do DDT e seus metabólitos 42
Figura 5 - Estrutura química molecular do Dicofol..... 43
Figura 6 - Estrutura química molecular do Heptacloro. 44
Figura 7 - Estrutura química molecular do Endosulfan..... 45
Figura 8 - Estrutura química molecular do Mirex. 46
Figura 9 - Estrutura química molecular do α-BHC e β-BHC. 47
Figura 10 - Indivíduo acometido pela fibropapilomatose. 50
Figura 11 - Planilha para registro da localização anatômica dos fibropapilomas e sua classificação por tamanho. 53
Figura 12 - Regiões anatômicas utilizadas para registro da fibropapilomatose 53
Figura 13 - Mapa das regiões de coleta das amostras 55
Figura 14 - Fluxograma do experimento analítico.....61
Figura 15 - Curvas de calibração obtidas para cada um dos compostos em estudo 66
Figura 16 - Cromatograma obtido no CG–μECD da curva de calibração no solvente na concentração de 0,1 μg mL^{-1} 67
Figura 17- Cromatogramas dos brancos. 68
Figura 18 - Correlação entre a massa corpórea e a porcentagem de lipídeos nos tecidos adiposo e hepático. 81
Figura 19 - Correlação entre o ICC e a porcentagem de lipídeos para ambos os tecidos. 81
Figura 20 - Correlação entre as concentrações nos tecidos adiposo e hepático dos pesticidas α-BHC e Heptacloro. 82
Figura 21 - Correlação entre as concentrações nos tecidos adiposo e hepático de ΣOCS..... 83
Figura 22 - Correlação entre ΣOCS e CCC e entre ΣOCS e CCC, para ambos tecidos..... 94
Figura 23 - Comparação da ΣOCS nos tecidos adiposo e hepático..... 94
Figura 24 - Correlação entre o IFP e ΣOCS nos tecidos adiposo e hepático. 95
Figura 25 - Correlações entre o IFP e ΣOCS nos tecidos adiposo e hepático. 95
Figura 26 - Correlação entre ΣOCS e FPS. 96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação dos animais submetidos à necrópsia durante o período de 2011-2012. 51
Tabela 2 - Resultados da recuperação dos agrotóxicos estudados para matriz "Tecido Adiposo". 70
Tabela 3 - Resultados da recuperação dos agrotóxicos estudados para matriz "Tecido hepático". 71
Tabela 4 - Comparação das concentrações dos pesticidas clorados nos tecidos adiposo e hepático de diversas espécies de tartarugas marinhas relatadas na literatura *vs.* as concentrações encontradas no presente estudo. 76
Tabela 5 - Comparação das concentrações dos pesticidas clorados nos tecidos adiposo e hepático de diversas espécies de tartarugas marinhas relatadas na literatura *vs.* as encontradas no presente estudo. 77
Tabela 6 - Valores de P, S e R2 para os diferentes fatores do histórico individual no modelo linear generalizado de cada pesticida no tecido adiposo 85
Tabela 7 - Valores de P, S e R2 para os diferentes fatores do histórico individual no modelo linear generalizado de cada pesticida no tecido hepático. 85
Tabela 8 - Concentrações dos pesticidas analisados (média ± desvio padrão; $ng.g^{-1}$ peso úmido) nas diferentes categorias para os fatores do histórico individual. 86
Tabela 9 - Porcentagem dos animais dentro de uma categoria de histórico individual com concentrações acima do LOQ para cada pesticida. 88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BQL:	abaixo do limite de quantificação (*do inglês: below quantification limit).*
CFPHV*:*	Herpesvirus associado à Fibropapilomatose em *Chelonia (do inglês: Chelonid FP-associated herpesvirus*).
CMS:	Convenção para as Espécies Migratórias *(do inglês: Convention on Migratory Species*)
PAN:	Plano de Ação Nacional
POPS:	Poluentes orgânicos persistentes
POCs:	Pesticidas organoclorados
QuEChERS:	*do inglês:* **Qu**ick, **E**asy, **Ch**eap, **E**ffective, **R**ugged and **S**afe
LD:	limites de detecção do método
LQ:	limites de quantificação do método
MTSG:	*do inglês: Marine Turtle Specialist group*
OCs:	Organoclorados
UICN:	*do inglês: IUCN, International Union for Conservation of Nature.*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17

2 REVISÃO DE LITERATURA 21
2.1 TARTARUGAS MARINHAS 21
2.1.1 *Chelonia mydas* 22
2.1.1.1 Classificação taxonômica 23
2.1.1.2 Nomes populares 23
2.1.1.3 Estado de conservação 23
2.1.1.4 Características biológicas 24
2.2 CONSERVAÇÃO DAS TARTARUGAS MARINHAS 27
2.3 AMEAÇAS ÀS TARTARUGAS MARINHAS 28
2.4 FIBROPAPILOMATOSE 30
2.4.1 Curso clínico 30
2.4.2 Histórico e prevalência 31
2.4.3 Etiopatogenia 33
2.5 SUBSTÂNCIAS TÓXICAS PERSISTENTES (STP) 35
2.5.1 Histórico dos Organoclorados (OCs) 36
2.5.2 Propriedades Físico-Químicas dos OCs 37
2.5.3 Metabolização dos OCs 38
2.5.4 Danos dos OCs à Biota 38
2.5.5 Pesticidas Organoclorados (POCs) 40
2.5.5.1 Metabólitos do DDT (pp'-DDD, op'-DDD, pp'-DDE, op'-DDE) 41
2.5.5.2 Dicofol 42
2.5.5.3 Ciclodienoclorados (Heptacloro, Endosulfan) 43
2.5.5.3.1 Heptacloro 43
2.5.5.3.2 Endosulfan 44
2.5.5.4 Mirex 45
2.5.5.5 HCHS (α-BHC e β-BHC) 46
2.5.6 Exposição a OCs e Carcinogênese 47

3 OBJETIVO GERAL 49
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 49

4 MATERIAIS E MÉTODOS 50
4.1 ANIMAIS 50
4.1.1 Biometria e sexo dos animais 51
4.1.2 Condição corporal dos animais 51
4.1.3 Avaliação da manifestação da Fibropapilomatose 52
4.2 DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO 54
4.2.1 Ubatuba/SP 55
4.2.2 Vitória/ES 56
4.2.3 Praia Grande/SP 56

4.3 COLETA E CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS 57
4.4 DETERMINAÇÃO DE ORGANOCLORADOS EM TECIDOS 58
4.4.1 Limpeza do material 58
4.4.2 Reagentes e materiais 59
4.4.3 Preparo das soluções padrões 59
4.4.4 Equipamento 59
4.4.5 Preparo das amostras 60
4.4.5.1 Extração 62
4.4.5.2 *Clean-up* 62
4.4.5.2.1 *Clean-up por d-SPE (dispersive solid-phase extraction)* *62*
4.4.5.2.2 *Mini coluna de sílica gel* 63
4.4.5.3 Estimativa do peso lipídico 64
4.4.6 Validação do método analítico 64
4.4.6.1 Análise da curva analítica 65
4.4.7 Quantificação dos analitos nas amostras 68
4.4.7.1 Avaliação do efeito matriz 68
4.4.7.2 Estudos de recuperação 69
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA **..... 72**

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 74
5.1 PADRÃO DE DISTRIBUIÇÃO DE OCs NOS TECIDOS 74
5.2 RELAÇÃO ENTRE PORCENTAGEM DE LIPÍDEOS E A CONDIÇÃO DO ANIMAL 80
5.3 COMPARAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DOS OCs NOS TECIDOS ADIPOSO E HEPÁTICO 82
5.4 RELAÇÃO ENTRE OS ORGANOCLORADOS E HISTÓRICO DO ANIMAL (QUANTITATIVO) 84
5.5 RELAÇÃO ENTRE OS ORGANOCLORADOS E HISTÓRICO DO ANIMAL (LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO) 87
5.6 CORRELAÇÃO ENTRE CCC E ICC *VS.* ΣOCS 92
5.7 CORRELAÇÃO ENTRE FIBROPAPILOMATOSE *VS.* ΣOCS 94

6 CONCLUSÕES 99

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS 100

REFERÊNCIAS 102

APÊNDICES 120

1 INTRODUÇÃO

A intervenção humana nos âmbitos marinho e costeiro, refletida no aumento da contaminação de efluentes, da construção de frotas marinhas, tráfego de embarcações e colheita indiscriminada de recursos marinhos traz consequências negativas como a degradação dos habitats marinhos. Combinados, esses efeitos diminuem a saúde dos ecossistemas, repercutindo, por sua vez, em algumas espécies de quelônios, como as tartarugas marinhas (SEMINOFF, 2004). Das 7 especies de tartarugas marinhas, cinco delas são encontradas no Brasil, sendo que todas encontram-se seriamente ameaçadas de extinção. A tartaruga-verde, *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) é catalogada como espécie em perigo pela *International Union for Conservation of Nature* - IUCN (IUCN, 2010) e no Brasil tem sido listada como vulnerável (MARTINS; MOLINA, 2008; MARQUES et al., 2009). Análises de dados históricos e publicações recentes indicam extenso declínio das subpopulações de tartarugas marinhas, particularmente suscetíveis devido à sua vulnerabilidade aos impactos antropogênicos. Além disso, a captura incidental e a degradação do *habitat* de nidificação em praias e áreas de alimentação ao redor do mundo representam sérias ameaças para esses animais (SEMINOFF, 2004).

Um dos principais fatores potenciais que poderia levar ao declínio populacional são as doenças infecciosas, dentre as quais se destaca a Fibropapilomatose (FP) também conhecida como *Green Turtle Fibropapiloma Disease* (GTFD), considerada uma das mais importantes ameaças à sobrevivência da tartaruga-verde (WORK; BALAZS, 1997), pois acomete quase que exclusivamente esta espécie. Doenças possivelmente relacionadas à poluição, como no caso da fibropapilomatose, conferem um fator relevante para a redução populacional de animais e consequente agravamento no desequilíbrio dos ecossistemas (ROSSI, 2007). A FP é uma afecção tumoral, debilitante e potencialmente fatal para as tartarugas marinhas (BAPTISTOTTE et al., 2001). Esta doença é caracterizada por múltiplas massas tumorais ou fibropapilomas que diferem em tamanho e coloração, localizando-se principalmente nas nadadeiras, pescoço, cloaca e olhos, podendo ser encontrada inclusive na carapaça e plastrão. Tumores internos em esôfago, fígado e rins, má condição corporal e outras alterações hematológicas e fisiológicas também são relacionadas à mesma.

Numerosas hipóteses têm surgido a respeito da etiologia da doença, sendo que a evidência mais forte indica a participação de um alfa herpesvírus específico dos Testudines, que teria anos de coevolução junto a estes répteis, mas nada ainda é conclusivo. Mesmo

existindo uma evidencia convincente de uma etiologia viral, outros fatores como parasitas, suscetibilidade genética, carcinógenos químicos, contaminantes ambientais, biotoxinas, imunossupressão e luz ultravioleta podem ter um papel adicional na etiologia da Fibropapilomatose (AGUIRRE, 1998). A participação de diversos co-fatores já foi pesquisado, por exemplo, o aumento da ocorrência desta doença tem sido implicada à degradação dos habitats marinhos relacionada a diversos contaminantes ambientais e seus metabólitos. Por isto, atualmente há um consenso de que a etiologia da fibropapilomatose esteja associada a vários fatores concorrentes e não somente a um agente primário. Sendo assim, é considerada uma doença de caráter multifatorial, com diferentes fatores físicos, genéticos e ambientais relacionados à incidência e prevalência ou ocorrência desta doença nas diferentes regiões geográficas.

A influência do meio ambiente sobre o estabelecimento da doença foi aventada após estudos realizados na Flórida (EHRHART, 1991) e no Havaí (BALAZS, 1991) sugerindo o envolvimento de poluentes tóxicos e de toxinas (ADNYANA; LADDS; BLAIR, 1997). Muitos poluentes químicos são conhecidos por causarem supressão do sistema imunológico (HERBST; KLEIN, 1995) ou terem efeito carcinogênico. Estes podem diminuir a resistência das tartarugas marinhas a diversos vírus facilitando sua proliferação, pois o stress causado por estes compostos pode resultar na redução da energia disponível para processos fisiológicos básicos causando alterações na imunidade celular aumentando a susceptibilidade a doenças provocadas por agentes infecciosos (AGUIRRE et al., 1994a). Atualmente se discute a possível relação dos poluentes orgânicos persistentes (POPs) ou substancias tóxicas persistentes (STP), tais como os pesticidas organoclorados (OCs) e seus metabólitos na patogenia desta afeção. Pelo histórico de uso e tendo sido amplamente empregados na agricultura e na indústria desde a década de 1940 e mesmo que esses compostos tenham sido banidos ou seu uso restringido na maioria dos países, continuam a representar sério risco ao ecossistema e à saúde ambiental (CASTILLO; GONZÁLEZ; MIRALLES, 2011). São bem conhecidas as propriedades destes compostos de persistir, produzir toxicidade e terem habilidade para se bioacumular através da alimentação e biomagnificar através das cadeias tróficas podendo alcançar altas concentrações em animais de longa vida como nas tartarugas marinhas (AGUIRRE; LUTZ, 2004), nas quais estes compostos acumulam-se nos tecidos com alto teor lipídico. Os OCs têm uma ampla gama de efeitos agudos e crônicos nos organismos, podendo causar hepatoxicidade, imunotoxicidade, toxicidade neurológica, teratogenicidade, e genotoxicidade, enfraquecimento e efeitos no comportamento do animal (KELLER et al., 2004a). Além disso, muitos desses compostos são suspeitos de atuar como

disruptores endócrinos e são relacionados ao desenvolvimento de neoplasias, mais especificamente, são indicados como possíveis imunossupressores (BALAZS; HUTCHINSON; SIMMONDS, 1991). Também pode-se supor que esses poluentes, em sinergia com outros contaminantes como metais, sacos de plástico e vidro, possam interferir na fisiologia animal e determinar outros processos interferindo na sobrevida dos mesmos (STORELLI; MARCOTRIGIANO, 2000).

A prevalência da FP é maior em ambientes marinhos que sofrem com o impacto da atividade humana (HERBST, 1994). O desenvolvimento demográfico, as atividades industriais e agronômicas em ambientes próximos às praias, às baías e aos lagos podem contribuir para o aumento da prevalência da doença (BALAZS , 1991; ADNYANA; LADDS; BLAIR, 1997). São poucos os estudos existentes a respeito da ocorrência desses compostos em tartarugas marinhas e sua possível influência no desenvolvimento da doença, como os realizados no Mar Mediterrâneo (MCKENZIE et al., 1999; CORSOLINI; AURIGI; FOCARDI, 2000; STORELLI; BARONE; MARCOTRIGIANO, 2007) costa do México (GARDNER et al., 2003) Costa Rica (KLEMENS et al., 2002) e Oceano Atlântico norte (RYBITSKI; HALE; MUSICK, 1995; KELLER et al., 2004a; ALAVA et al., 2006). Ainda não se tem estabelecido uma relação direta entre organoclorados e a ocorrência de fibropapilomatose, entre outras razões, pelas baixas concentrações desses compostos encontradas em algumas localidades monitoradas (AGUIRRE et al., 1994a). Nas zonas costeiras do Brasil, há uma exposição dos animais a uma maior concentração de poluentes, o que poderia estar relacionado ao aumento na prevalência da doença em algumas áreas (BAPTISTOTTE, 2007).

Os primeiros estudos realizados no Brasil com o objetivo de elucidar a etiologia dos tumores em tartarugas marinhas foram realizados por Matushima (1999, 2001, 2003). Anos depois, Rossi (2007) analisou o perfil hematológico e função celular de leucócitos sanguíneos de animais com e sem FP. No entanto, poucos são os trabalhos no Brasil que pesquisaram poluentes químicos nas tartarugas marinhas, e comparando localidades com distintos níveis de poluição e taxas de prevalência da enfermidade. Os únicos estudos realizados na costa brasileira foram os desenvolvidos com ovos de *Caretta caretta* (BALDASSIN; TANIGUCHI; MONTONE, 2002) e tecidos de *Chelonia mydas* (SILVA, 2009). Existe a necessidade de um monitoramento mais abrangente desses poluentes através das técnicas disponíveis na área da Toxicologia ambiental.

A cromatografia gasosa (CG) é uma técnica que vem sendo amplamente utilizada, já por mais de meio século. A sua principal aplicação está na determinação numérica de componentes e em que proporção se encontram numa determinada matriz; sendo que a capacidade de estabelecer a natureza e a estrutura química dos compostos separados e quantificados requer uso de detectores espectroscópicos, tais como o espectrômetro de massas (BAKER, 1999). Um método bastante conhecido para análises de resíduos em diferentes matrizes, principalmente usado com sistemas cromatográficos acoplados a espectrometria de massas LC/MS/MS e GC/MS é o método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*), introduzido por Anastassiades et al. (2003).

Através do uso de ferramentas como o método QuEChERS, poder-se-ia fornecer dados sobre contaminantes em tartarugas marinhas. Isto poderá auxiliar na compreensão do seu papel em eventos de doença e mortalidade, proporcionando uma base para a investigação, predição e mitigação desses episódios (STORELLI; MARCOTRIGIANO, 2000). Além disso, dentro do contexto da "Medicina da Conservação", como ciência que avalia as relações entre a saúde animal, humana e ambiental se faz pertinente o estudo dos agentes infecciosos emergentes e reemergentes na fauna selvagem e a sua relação com fatores ambientais como os contaminantes. É assim que a ocorrência de casos de fibropapilomatose poderá ser utilizada na avaliação da saúde do ecossistema, desde que seja correlacionado com variáveis ambientais (REIS et al., 2010). A ocorrência de fibropapilomas não é apenas um indicador da saúde das tartarugas marinhas, mas também da saúde do ecossistema no ambiente marinho. As vantagens de se utilizar a tartaruga marinha como espécie sentinela são claras, pois esses animais são especialmente vulneráveis à degradação da saúde do ecossistema (AGUIRRE; LUTZ, 2004).

Em suma, é necessário ampliar os estudos sobre a presença e distribuição dos contaminantes ambientais, como os pesticidas organoclorados, em *Chelonia mydas* para elucidar a possível participação desses compostos na patogenia da fibropapilomatose.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TARTARUGAS MARINHAS

A extraordinária capacidade de resistência dos quelônios marinhos, em circunstâncias onde a maioria dos outros répteis sucumbiu, as suas extensas migrações, seu ciclo biológico longo e complexo, confere às tartarugas marinhas tamanha notoriedade. O histórico de exploração durante séculos e o fato de continuarem a sofrer, vítimas de inúmeras ameaças como consequência da ação humana (CATRY; BARBOSA; INDJAI, 2010) e doenças emergentes que podem ser influenciadas pela poluição marinha, chama a atenção para estes animais considerados ameaçados.

As tartarugas marinhas ocupam um lugar de destaque, pois são um dos elementos da Biodiversidade mais presentes e conhecidos (CATRY; BARBOSA; INDJAI, 2010). Realizam eficientes funções ecológicas sendo muito importantes no equilíbrio do ecossistema marinho, pois contribuem para a saúde e manutenção dos recifes de corais, estuários e praias arenosas (ECKERT et al., 2000). Além disso, são importantes componentes da cultura de muitas comunidades costeiras no Brasil, e tanto neste país quanto em outros ao redor do mundo, estão associados ao misticismo e simbolismo, sendo parte da vida de muitas pessoas em expressões folclóricas e comemorações. Em muitas áreas, as tartarugas marinhas desempenham um papel econômico e social, uma vez que através de atividades conservacionistas são gerados empregos, desenvolvimento e turismo (SANTOS et al., 2011).

Os quelônios marinhos pertencem à mais antiga linhagem de répteis vivos (PRITCHARD, 1997). Existentes há mais de 150 milhões de anos, sua origem é terrestre, mas evoluíram e se adaptaram para viver no mar, diferenciando-se de outros répteis (CUBAS; BAPTISTOTTE, 2007). A carapaça ficou mais achatada, ligeira e hidrodinâmica e os membros se modificaram em nadadeiras, promovendo uma melhor navegação. São animais pulmonados com uma grande habilidade de mergulho, possuindo uma eficiente distribuição de oxigênio no corpo, uma baixa taxa metabólica e respiração acessória que inclui intercâmbio gasoso através da cloaca e faringe. Possuem sentido da visão, olfato e audição extremadamente desenvolvidos, além de um excelente sentido de orientação (SANTOS et al., 2011).

As tartarugas marinhas encontram-se amplamente distribuídas entre as bacias oceânicas, ocupando desde a região ártica até a Tasmânia. São altamente migratórias com longos e complexos ciclos de vida, que dependendo da espécie, pode demorar de 10 a 50 anos para atingirem a maturidade sexual e retornar a mesma praia onde nasceram (SANTOS et al., 2011). Durante as diferentes etapas do ciclo biológico os indivíduos ocupam diversos ecossistemas (praias de nidificação, zonas litorânea, nerítica, oceânica, pelágica e demersal) atravessando várias zonas econômicas exclusivas e águas internacionais (DOMINGO et al., 2006). Sendo assim, as tartarugas apresentam em comum um ciclo de vida, mas existe alternância de diferentes *habitats* ao longo da sua existência (CUBAS; BAPTISTOTTE, 2007).

Relata-se que as ocorrências reprodutivas ocorrem principalmente em regiões tropicais e subtropicais. O período de nidificação varia entre as diferentes regiões e espécies. No Brasil, a estação reprodutiva, no geral, vai de setembro a abril no continente e de dezembro a junho nas ilhas oceânicas. Durante uma mesma temporada reprodutiva, cada fêmea pode desovar mais de uma vez. Os ciclos reprodutivos podem ser anuais, bianuais, trienais ou irregulares. Estes também variam em função da espécie, ou entre populações da mesma espécie, incrementando ou diminuindo no tempo e sendo reguladas por quantidade de energia armazenada, condições meio-ambientais e a distância entre locais de alimentação e reprodução (SANTOS et al., 2011).

Existem sete espécies no mundo, compondo as famílias Cheloniidae e Dermochelyidae. São cinco as espécies que habitam os mares brasileiros: tartaruga cabeçuda (*Caretta caretta*), tartaruga de pente (*Eretmochelys imbricata*), tartaruga oliva (*Lepidochelys olivacea*), tartaruga de couro (*Dermochelys coriacea*) e tartaruga-verde (*Chelonia mydas*).

2.1.1 Chelonia mydas

A tartaruga-verde, *Chelonia mydas*, herbívoro primário no ecossistema marinho (BJORNDAL; BOLTEN; CHALOUPKA, 2000) habita pastagens tropicais e subtropicais nas principais bacias oceânicas do planeta, tendo distribuição circum-global, entre os trópicos.

Figura 1 – Indivíduo juvenil da espécie *C. mydas*

Fonte: Rossi (2012)

2.1.1.1 Classificação taxonômica

Filo: Chordata
Classe: Reptilia
Ordem: Testudines
Família: Cheloniidae

2.1.1.2 Nomes populares

Tartaruga-verde, aruanã, tartaruga-do-mar, depeia, jereba, suçuarana, tartaruga pedrês (português), Green turtle (inglês), tortuga verde (espanhol) (ALMEIDA et al., 2011).

2.1.1.3 Estado de conservação

Espécie catalogada como *Endangered* ”Em perigo” na lista vermelha da IUCN (última revisão realizada em 2004) (IUCN, 2010).

No Brasil, é classificada como “Vulnerável (VU)” na avaliação do estado de conservação elaborado para esta espécie, com base nos dados disponíveis até 2009 (ALMEIDA et al., 2011).

2.1.1.4 Características biológicas

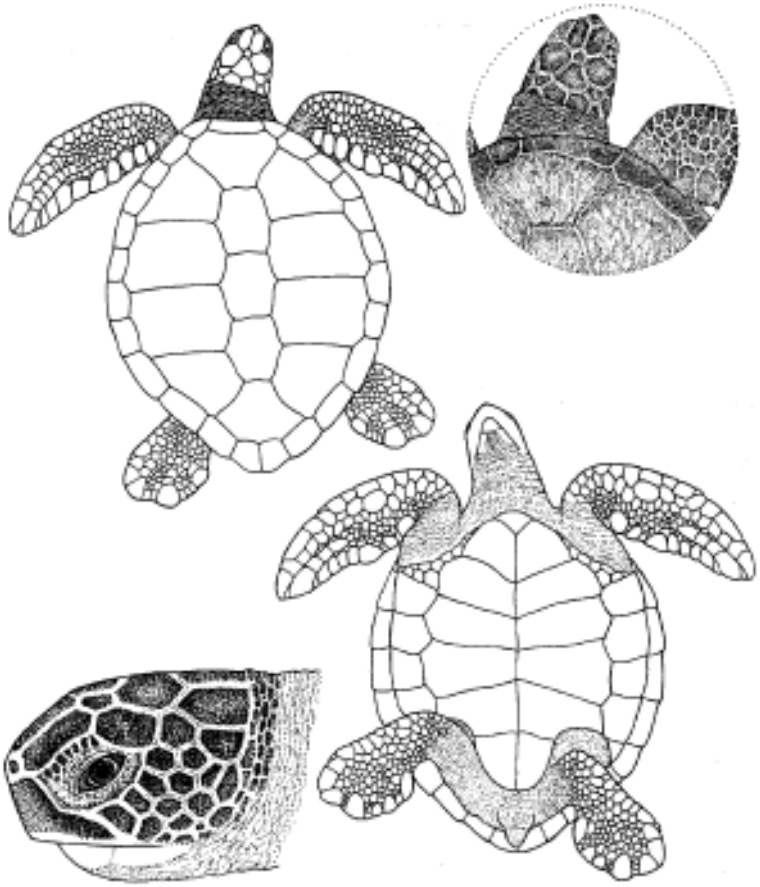
A espécie *Chelonia mydas* possui distribuição cosmopolita, desde os trópicos até as zonas temperadas (ALMEIDA et al., 2011). No atlântico sul-ocidental é conhecida a sua presença desde 0° de latitude até 42°15’S-64°04’W, Fondeadero Sarmiento, península de Valdez, Chubut – Argentina (ALBAREDA et al., 2003).

As características morfológicas utilizadas na diferenciação desta espécie são apresentadas na figura 2. É a espécie de tartaruga marinha que apresenta hábitos mais costeiros, utilizando inclusive estuários de rios e lagos (ALMEIDA et al., 2011). Este táxon apresenta ciclo de vida longo com maturação sexual entre 26 e 40 anos. São onívoras com tendência carnívora durante os primeiros anos de vida e após a fase pelágica, com carapaça medindo entre 30 a 40 cm de comprimento (BALAZS, 1995; BJORNDAL, 1997) adotam dieta exclusivamente herbívora, com uma dieta principalmente de macroalgas e fanerógamas (MORTIMER, 1982). As preferências alimentares podem variar de acordo com a disponibilidade em cada área (ALMEIDA et al., 2011).

É um táxon que apresenta animais altamente migratórios, as fêmeas migram das áreas de alimentação e descanso para as áreas de reprodução em deslocamentos que podem chegar a mais de 1500 km (ALMEIDA et al., 2011). Desovam em grandes colônias nas praias do litoral continental e em ilhas remotas no ambiente oceânico. Praias tropicais e ocasionalmente subtropicais em todos os oceanos (Oceanos Atlântico, Pacífico e Índico; Mar Mediterrâneo e Vermelho) (PRITCHARD; MORTIMER, 2000). No Brasil, as desovas ocorrem principalmente nas Ilhas da Trindade/ES e Fernando de Noronha/PE e no Atol das Rocas/RN. Áreas de desova secundárias ocorrem no litoral norte do estado da Bahia. Esporadicamente ocorrem também desovas nos estados do Espírito Santo, Sergipe e Rio Grande do Norte. Ocorrências não reprodutivas são registradas em toda a costa do Brasil e também nas ilhas (ALMEIDA et al., 2011). A distribuição geográfica no país é apresentada na figura 3. As fêmeas que desovam no Atol das Rocas e Ilha da Trindade apresentam Comprimento Curvilíneo da Carapaça (CCC) médio de 115,6 cm. Em cada desova depositam uma média de

122 a 125 ovos e o intervalo de remigração mais frequente para estas populações é de 3 anos (GROSSMAN, 2001; MOREIRA, 2003).

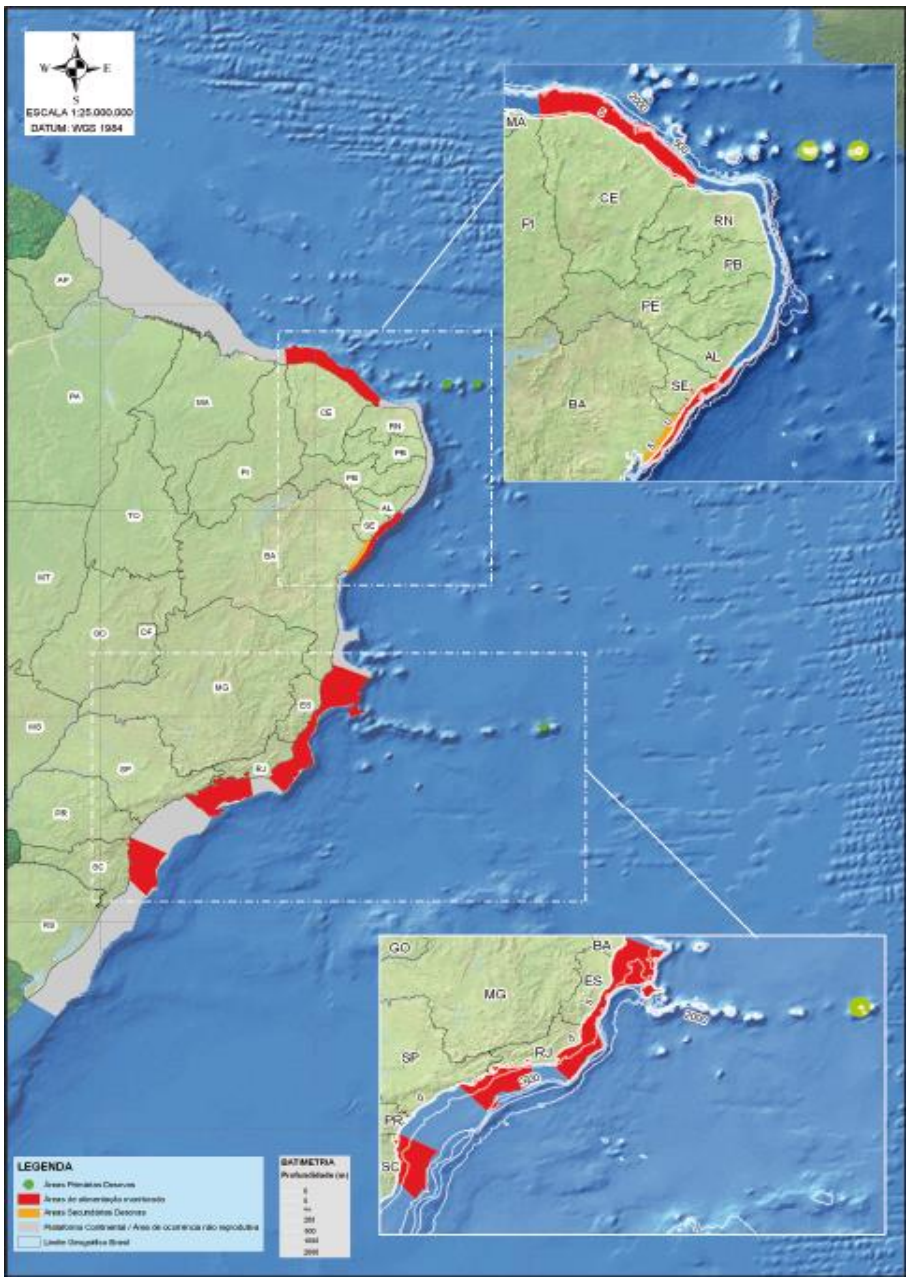
Figura 2 - Características morfológicas da *C. mydas*



Fonte: (PRITCHARD; MORTIMER, 2000).

Notas: Carapaça: forma oval, margem ocasionalmente entrecortada pelas bordas da junção das escamas, mas não serrada, quatro pares de escudos costais; Longitude Reta da Carapaça (LRC) de até 120 cm. Cabeça: anteriormente arredondada; largura de até 15 cm; um par de escamas pré-frontais; quatro pares de escamas pós-orbitais. Extremidades: uma unha em cada nadadeira (raras vezes duas em alguns filhotes). Coloração: preta no dorso nos filhotes, se transformando em marrom com listras radiais nos juvenis, muito variável nos adultos (geralmente marrom, amarelo, creme e outros tons terra; liso, marmorizado ou manchado); ventre esbranquiçado nos filhotes, amarelado nos adultos.

Figura 3 - Distribuição geográfica da *C. mydas* no Brasil



Fonte: (SANTOS et al., 2011).

Notas: Em verde: áreas primárias de desova; em vermelho: áreas de alimentação monitorada; em laranja: áreas secundárias de desova; em cinza: plataforma continental - área de ocorrência não reprodutiva.

2.2 CONSERVAÇÃO DAS TARTARUGAS MARINHAS

Dada a importância das populações de tartarugas marinhas como patrimônio nativo do país, é natural que este grupo tenha merecido especial atenção por parte dos investigadores nacionais e gestores que delinearam as estratégias para o início das atividades conservacionistas no país. Há mais de 30 anos foi criado o projeto TAMAR-ICMBio, que monitora diversas praias do litoral brasileiro através das 23 bases estabelecidas no território. Este projeto desenvolve ações de conservação e pesquisa com o objetivo de assegurar a recuperação e sobrevivência das cinco espécies de tartarugas marinhas encontradas no país, a níveis saudáveis a fim de cumprirem seu rol ecológico (SANTOS et al., 2011).

Nos últimos anos têm sido criados diversos acordos para a conservação das tartarugas marinhas em escala internacional. Organizações como a Organização das Nações Unidas (ONU) para a Agricultura e Alimentação - Divisão de Aquicultura e Pesqueiras (FAO), Convenção para as Espécies Migratórias (CMS), União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN), entre outras tem alertado a comunidade internacional sobre o estado de conservação das tartarugas marinhas (DOMINGO et al., 2006). Atualmente todas as sete espécies de tartarugas marinhas estão incluídas nas listas de espécies ameaçadas de extinção em escala mundial (LUTCAVAGE et al., 1997). Além disso, fazem parte do anexo I da Convenção sobre o Comércio Internacional de espécies ameaçadas de Fauna e Flora Silvestre (CITES), do qual o Brasil é signatário. O país também participa da Convenção Interamericana para a Proteção e Conservação de Tartarugas Marinhas. Com a Portaria n. 135, de 23 de dezembro de 2010, o Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), vinculado ao Ministério do Meio Ambiente (MMA), aprovou o Plano de Ação Nacional (PAN), contemplando 8 metas e 73 ações para a conservação das 5 espécies. A meta No. 7: “Redução dos impactos provocados pela poluição sobre as tartarugas marinhas”, prevê, em 5 anos, 2 ações direcionadas à ocorrência e impactos da poluição nos ambientes costeiros. E a meta No. 8: “Aumento do conhecimento científico relacionado à conservação de tartarugas marinhas”, prevê, em 5 anos, 2 ações também relacionadas aos poluentes marinhos (SANTOS et al., 2011).

Embora o Brasil conte com leis que protegem as tartarugas marinhas e um grande projeto conservacionista (TAMAR-ICMBio), ainda são necessários esforços de cooperação nacional e internacional para a preservação desses animais (BONDIOLI; NAGAOKA; MONTEIRO-FILHO, 2005). Além disso, e apesar da sua riqueza e biodiversidade, a pesquisa

sobre a fauna de répteis no Brasil ainda é restrita (RODRIGUES, 2005). Embora os programas de conservação de tartarugas marinhas têm se voltado cada vez mais para o monitoramento da saúde das populações (DEUS SANTOS, 2009), estudos ecológicos de populações e comunidades que monitorem os efeitos da degradação, fragmentação e perda de hábitat, da poluição e da exploração também são necessários para uma melhor compreensão dos efeitos da extensiva, e cada vez pior degradação dos ecossistemas naturais do Brasil (RODRIGUES, 2005).

2.3 AMEAÇAS ÀS TARTARUGAS MARINHAS

Assim como as tartarugas de água doce, as marinhas sofrem com a sobre-explotação e a destruição do *habitat*; são ameaçadas por serem raras e por terem suas áreas de distribuição extremamente restritas (RODRIGUES, 2005). Pressões antrópicas nas diferentes fases de desenvolvimento levaram inúmeras populações de tartarugas marinhas ao declínio nas diferentes partes do planeta (CUBAS; BAPTISTOTTE, 2007). A interferência humana é a causa do colapso das populações destas espécies. Segundo o *Marine Turtle Specialist Group* (MTSG), atualmente as principais ameaças às tartarugas marinhas são o desenvolvimento costeiro, a captura incidental pela pesca, uso direto para consumo humano, as mudanças climáticas, poluição e patógenos (SANTOS et al., 2011).

Apesar dos progressos realizados na proteção e recuperação de ecossistemas marinhos em algumas áreas, impactos antropogênicos diretos ou indiretos continuam a ocorrer (HAMANN et al., 2010). Os principais fatores ligados ao desenvolvimento costeiro desordenado e que causam um impacto negativo nas populações de tartarugas marinhas são: movimentação da areia da praia (extração de areia e aterros), foto-poluição, tráfego de veículos, presença humana nas praias, portos, ancoradouros e molhes; ocupação da orla (hotéis e condomínios); e a exploração (produção e distribuição de óleo e gás) (ALMEIDA et al., 2011).

Existem diferentes formas de poluição que constituem uma ameaça para os *habitats* marinhos e terrestres das tartarugas marinhas, incluindo som, temperatura, luz, plásticos, produtos químicos, efluentes e outros. De modo geral, a poluição de qualquer tipo, ocorrendo acima de certo limiar, pode produzir uma área inabitável. Em níveis abaixo desse limiar, pode significativamente degradar a qualidade do *habitat*, a capacidade de carga e outros aspectos

da função do ecossistema (HAMANN et al., 2010). Cabe ressaltar que qualquer tipo de poluição agindo ou não em sinergia com vários outros fatores pode vir a ter efeitos nocivos sobre as funções biológicas dos animais, repercutindo negativamente na saúde dos indivíduos.

Um exemplo são os resíduos sólidos, principalmente plásticos, que acabam sendo ingeridos passivamente pela *C. mydas* em áreas de alimentação consideravelmente poluídas, uma vez que o lixo encontra-se aderido às algas, um de seus principais recursos alimentares (REIS et al., 2010). A contaminação por lixo na praia de Intermares na Paraíba pode implicar na perda de hábitat reprodutivo das tartarugas, uma vez que é importante área de reprodução da tartaruga de pente no nordeste brasileiro (MASCARENHAS et al., 2008).

Corpos estranhos podem causar danos na saúde das tartarugas marinhas direta e indiretamente. Plásticos e outros materiais podem obstruir o trato gastrointestinal ou causar ulcerações ou necroses locais. Indiretamente, os resíduos podem degradar as condições das tartarugas por interferir com o metabolismo lipídico, aumentando o tempo de trânsito gastrointestinal ou contribuindo para o acúmulo de gases intestinais e flutuação incontrolável (LUTZ; MUSICK, 1997). A ingestão de lixo pode ser determinante para a morte de tartarugas marinhas, uma vez que pode causar a obstrução completa e/ou paralisia do sistema digestório. Assim, a interação com resíduos sólidos antropogênicos pode ser causa de morte das tartarugas marinhas, essencialmente da *C. mydas* no centro-norte do estado do Rio de Janeiro, e mais uma vez, indica a degradação ambiental da região, alertando para a necessidade de ações mitigadoras urgentes. Nesse contexto, as tartarugas marinhas podem ser consideradas sentinelas da saúde do ecossistema marinho (REIS et al., 2010).

As tartarugas marinhas, por utilizarem também o ambiente terrestre, são duplamente afetadas pela presença de lixo. Nas areias das praias, o lixo pode afetar o sucesso reprodutivo destes animais, pois, pode impedir o acesso das fêmeas aos locais adequados de desovas, bem como impedir os neonatos de emergirem dos ninhos e alcançarem o mar. Restos de alimentos podem atrair animais nocivos como ratos que comem os ovos e os neonatos, além de serem vetores de doenças para a fauna nativa e seres humanos. Os neonatos de tartarugas são os mais afetados, pois fragmentos de plásticos e monofilamentos têm a capacidade de obstruir a abertura da câmara de ovos e/ou impedir a chegada ao mar (MASCARENHAS et al., 2008).

No ambiente natural, as tartarugas marinhas estão expostas a vários poluentes químicos como o petróleo e seus derivados, que causam intoxicação pela pele ou por ingestão (CUBAS; BAPTISTOTTE, 2007). Outros compostos químicos ou substâncias “xenobióticas”, como os organoclorados, são considerados agentes tóxicos, apresentando certo grau de toxicidade, que pode provocar danos aos organismos. A comunidade científica

tem reunido evidências crescentes sobre a reatividade bioquímica e potencial que os vários poluentes orgânicos têm de causar efeitos biológicos (imunotoxicidade, disrupção endócrina e carcinogenicidade) em animais incluindo os humanos. Por estes e outros mecanismos ainda não totalmente conhecidos, relata-se também que os poluentes estariam influenciando a dinâmica das doenças no âmbito marinho.

Vários microrganismos habitam o ecossistema marinho e são capazes de causar doenças infecciosas (REIS et al., 2010). As tartarugas marinhas são afetadas por uma variedade de doenças de caráter infeccioso, entre estas as originadas por diversos agentes virais (ARIEL, 2011), mas nada tem causado tanta preocupação como a fibropapilomatose, importante ameaça para a sobrevivência dos indivíduos da espécie *C. mydas.* Cabendo ressaltar que é reconhecido que mudanças no ambiente marinho contribuem para a manifestação da mesma (REIS et al., 2010).

2.4 FIBROPAPILOMATOSE

A Fibropapilomatose (FP) ou *Green Turtle Fibropapilloma Disease* (GTFD) é uma doença epizoótica que acomete as tartarugas marinhas em todo o mundo, mas afeta predominantemente a tartaruga-verde (CUBAS; BAPTISTOTTE, 2007) mais do que qualquer outra espécie por razões ainda desconhecidas (HIRAMA; EHRHART, 2007). Por este motivo é considerada uma das mais importantes ameaças à sobrevivência desta espécie (WORK; BALAZS, 1997).

2.4.1 Curso clínico

É uma doença tumoral, caracterizada por múltiplas massas que variam de 0,1 cm a 30 cm de diâmetro, surgindo na conjuntiva, pescoço, nadadeiras, cauda, regiões axilar e inguinal, órgãos internos (GEORGE, 1997) e inclusive carapaça e plastrão. Os tumores cutâneos possuem textura lisa a verrucosa, podem ser sésseis ou pedunculados e as maiores formações podem estar ulceradas e necróticas (JACOBSON et al., 1989). As células do estrato espinhoso apresentam-se hipertróficas e com vacúolos citoplasmáticos, podendo conter inclusões

intranucleares eosinofílicas ou basofílicas. As figuras mitóticas são mais frequentes na epiderme, sendo raras na derme (JACOBSON et al., 1991; LACKOVICH et al., 1999). Os tumores viscerais se desenvolvem mais tardiamente (aproximadamente após 2 anos) (HERBST et al., 1999).

A fibropapilomatose é debilitante e potencialmente fatal para as tartarugas marinhas, pois apesar do curso normalmente benigno, os tumores podem ameaçar a sobrevivência das tartarugas em meio natural (CUBAS; BAPTISTOTTE, 2007). Embora as tartarugas com GTFP não morram devido à doença *per se*, os tumores (que podem atingir mais do que 30 cm de diâmetro) afetam o funcionamento normal do organismo, causando debilidade física e expõe o portador a outras ameaças (MILTON; LUTZ, 2003). Os tumores podem interferir na adequada alimentação, movimentação, respiração e condição geral (GEORGE, 1997). Os tumores cutâneos incrementam as possibilidades de ferimentos na pele e podem modificar a visão. Os tumores de grande porte podem dificultar seriamente a capacidade do animal para nadar e mergulhar; fugir dos predadores e localizar, capturar e ingerir o alimento (MILTON; LUTZ, 2003). A taxa de crescimento dos animais pode ser afetada pela FP (GEORGE, 1997), sendo que diminuiria conforme há aumento na severidade da doença. Além disso, a progressão e a regressão na manifestação da doença são comumente observadas (BALAZS, GEORGE et al., 1998).

2.4.2 Histórico e prevalência

A FP foi primeiramente observada em uma tartaruga-verde adulta, em dezembro de 1936, no Aquário de New York em um exemplar que tinha sido trazido de Key West, Flórida, EUA, dois anos antes de manifestar os tumores (SMITH; COATES, 1938). Os papilomas estavam distribuídos na região cervical dorsal, nas áreas de ambas as axilas e virilhas, pálpebra e conjuntiva. Subsequentemente os fibropapilomas foram observados em três das 220 tartarugas marinhas capturadas nas águas costeiras de Key West, Flórida, EUA, no ano de 1938 (SMITH; COATES, 1938). Neste mesmo ano a presença dos tumores foi descrita em uma tartaruga-verde capturada em Cape Sable, Flórida (LUCKES, 1938).

Em 1958 foi relatado a ocorrência de massas fibrosas em fêmeas desovando em Sarawak, Indonésia e Malásia (HENDRICKSON, 1958 [1] apud BAPTISTOTTE, 2007, p. 20). A primeira confirmação de um caso de GTFP no Havaí foi nesse mesmo ano (HERBST, 1994), nesse então a GTFP começou a ser registrada com maior frequência nessa e outras regiões como Florida, com populações apresentando taxas de prevalências maiores ao 80% (BALAZS, 1991). Em 1980 foi registrado um surto de FP em um grupo de fêmeas adultas na fazenda de tartarugas Cayman, Ltda. Grand Cayman (JACOBSON et al., 1989). Na costa oriental dos Estados Unidos a ocorrência de tumores em tartarugas-verdes encalhadas aumentou em aproximadamente 10 % a 30% de 1980 a 1990 (FOLEY et al., 2005). A FP no arquipélago havaiano é fatal e a maior causa de encalhe das tartarugas marinhas em águas havaianas onde completou 30 anos de epidemia, mas relata-se que após o surto de 1980 a FP incrementou rapidamente, atingiu o pico durante meados dos anos 1990, e depois vem diminuindo de forma constante desde então (CHALOUPKA; BALAZS; WORK, 2009).

A fibropapilomatose tem sido registrada em diversas populações de tartarugas marinhas ao redor do mundo, porém a prevalência difere geograficamente e entre classes etárias (ARTHUR et al., 2008). A prevalência varia entre as diferentes localidades do mundo, de 1,4% até 90% (AGUIRRE et al., 1994b). O primeiro registro da doença no Brasil ocorreu em 1986 no estado do Espírito Santo, região desde então endêmica para a doença. A partir daí foi observada frequentemente nas áreas de alimentação (BAPTISTOTTE et al., 2001). Dados obtidos do projeto TAMAR-ICMBio registraram tumores em 15,41% dos 8539 espécimes de *C. mydas* examinados. Os registros parecem indicar aumento da ocorrência no tempo: 3,2% em 1997, 10,6% em 1998, 10,7% em 1999 e 12,4% em 2000. Os dados também indicam o aumento na prevalência da doença por região de 0 a 24% em Ubatuba/SP, entre 1986 e 1998. Em Vitória/ES, a doença alcançou a taxa de 40% no ano 2000. No entanto, em alguns outros lugares como Fernando de Noronha/PE e Atol das Rocas/RN, a incidência é nula ou muito baixa (BAPTISTOTTE et al., 2001; BAPTISTOTTE, 2007).

A variação geográfica na prevalência da doença é provavelmente uma consequência da alta fidelidade das tartarugas com seus *habitats* de forrageio (TAQUET et al., 2006) a qual poderia permitir ou favorecer a exposição crônica a agentes promotores tumorais e poluentes (ARTHUR et al., 2008).

---

[1] HENDRICKSON, J. R. The Green sea turtle *Chelonia mydas* (Linn.) in Malaya and Sarawak. **Proceedings of the Zoological Society of London**, London, v. 130, p. 455-535, 1958.

2.4.3 Etiopatogenia

As informações encontradas sugerem que a ocorrência de fibropapilomas em *C. mydas* pode ser de origem viral, pois várias famílias de vírus como Herpesviridae, Papoviridae, Poxviridae, Adenoviridae e Retroviridae são conhecidas por causarem lesões proliferativas e tumores (HERBST et al., 1998; ORÓS et al., 1998).

Está claro que o fator etiológico primário é um agente infeccioso, uma vez que os tumores podem ser transmitidos a animais não afetados através da inoculação de homogeneizados celulares de fibropapilomas (HERBST; KLEIN, 1995). Partículas virais sugestivas de herpesvirus foram observadas em fibropapilomas de tartarugas (JACOBSON et al., 1991). Mais tarde estudos de sequenciamento genético demostraram que o agente primário da doença seria um alpha-herpesvirus denominado *Chelonid FP-associated herpesvirus* (CFPHV), o qual está presente em 100% das ocorrências naturais e em 100% dos tumores induzidos por inoculação em tartarugas mantidas em cativeiro. O CFPHV possui quatro variantes denominadas "A","B","C" e "D" em três localidades da Flórida, EUA (ENE et al., 2005). Quatro grupos filogeográficos ou variantes do vírus têm sido identificados: Pacífico oriental, Atlântico ocidental / leste do Caribe, Centro-Oeste do Pacífico e Atlântico. O último compreende o golfo da Guiné e Porto Rico, sugerindo fluxo gênico recente entre essas duas regiões. O haplótipo da Flórida representa uma linhagem independente que partilha um ancestral comum com todas as outras variantes identificadas do vírus ou representante da linhagem do Atlântico que deu origem ao grupo do leste do Pacífico. A média de tempo estimada para o ancestral comum mais recente das variantes do vírus moderno foi de 192,90 a 429,71 anos atrás, sugerindo que a pandemia da FP global não é o resultado de uma aquisição recente de uma mutação na virulência. O padrão filogeográfico obtido parece refletir parcialmente a movimentação das tartarugas. Entretanto, os ambientes alterados parecem estar implicados nos surtos de FP e na história evolucionária moderna do CFPHV (PATRÍCIO et al., 2012).

A presença das sequências virais confirmada por PCR em tempo real, tanto em animais com lesões características da FP quanto na pele de animais aparentemente saudáveis (DUARTE et al., 2012), sugere que a progressão das lesões seja multifatorial e envolve potencialmente uma fase de promoção ou fase de desenvolvimento tumoral (QUACKENBUSH et al., 1998). Modelos experimentais que empregaram o *lung-eye-trachea disease LETD-associated herpesvirus* (LETV) para testar a infectividade viral após exposição

à água marinha, demonstraram que o LETV permanece infectante por prolongados períodos, motivo pelo qual é bem possível que também o herpesvírus associado à fibropapilomatose seja estável no ambiente marinho (CURRY et al., 2000). No entanto, o modo de transmissão em vida livre não é totalmente elucidado (WORK, 2005) embora os estudos sobre a FP e o CFPHV estejam direcionados à caracterização dos vírus, assim como o diagnóstico e patogênese no hospedeiro (ARIEL, 2011). É de suma importância a determinação de duas questões: em que fase do ciclo de vida as tartarugas são infetadas e em que localização geográfica ocorre a infecção (ENE et al., 2005).

Infecções por herpesvirus se manifestam com sinais agudos, os quais podem se tornar latentes e permanecerem quiescentes durante o resto de vida do animal ou até que o hospedeiro esteja suficientemente estressado para que o vírus se manifeste e induza a doença (HOFF; HOFF, 1984). Sendo assim, a FP estaria relacionada a situações que comprometem o sistema imunológico (HERBST, 1994; HERBST et al., 1998) como, por exemplo, a intensa infecção parasitária por trematódeos cardiovasculares descrita nesta espécie (JACOBSON et al., 1991; ADNYANA; LADDS; BLAIR, 1997; AGUIRRE et al., 1998). Também tem sido aventada a hipótese que compostos naturais como Lyngbyatoxin A (LA) e Debromoaplysiatoxin (DAT), isolados de *Lyngbya majuscula* (cianobactéria filamentosa), considerados promotores de tumores, desempenham um papel na etiologia da fibropapilomatose (HERBST, 1994; HERBST; KLEIN, 1995; LANDSBERG et al., 1999; ARTHUR et al., 2008). A associação entre a FP e o Ácido Okadaico (OA), composto natural promotor tumoral foi demonstrado recentemente (LANDSBERG et al., 1999). Este ácido é produzido pelo dinoflagelado bentônico *Prorocentrum* sp. e em conjunto com um elemento iniciador causam crescimento tumoral em ratos por inibição das vias 1ª e 2ª da fosfatase (FUJIKI; SUGANUMA, 1993).

Por outro lado, fatores ambientais como raios ultravioletas e agentes químicos podem vir a causar alterações no sistema imunológico ou terem efeito carcinogênico (WEISBURGER, 1989; ANANTHASWAMY; PIERCEALL, 1990). Prevalências mais altas da FP estão relacionadas a ambientes mais antropizados (HERBST, 1994), aventando-se que diversos poluentes químicos, entre estes os organoclorados, poderiam induzir o vírus latente à infecção ou favorecer o desenvolvimento e/ou agravamento da severidade da FP, seja devido a alterações na imunidade do animal, ou ao mecanismo de ação de certos compostos permitindo-lhes agir como promotores tumorais ou agentes carcinogênicos, perante diversos mecanismos e determinadas concentrações no organismo. Entretanto, são escassas as

informações referentes ao rol dos poluentes químicos na etiopatogenia da doença assim como definir quais concentrações poderiam ter algum efeito sobre as tartarugas marinhas.

Em conclusão, na atualidade há um consenso de que a etiologia da doença seja ¨multifatorial¨ e associa o GTFHV como agente primário e a intervenção de outros agentes como co-fatores, podendo estes ser intrínsecos ao indivíduo como os fatores genéticos, imunológicos e até nutricionais ou fatores ambientais como os poluentes químicos.

2.5 SUBSTÂNCIAS TÓXICAS PERSISTENTES (STP)

A crescente demanda e oferta de novos produtos químicos pela sociedade industrializada do século XX levaram ao incremento, no ambiente, de grandes quantidades de diversos compostos químicos provenientes das descargas industriais e de várias outras atividades antrópicas nos diversos compartimentos ambientais (ALMEIDA et al., 2007). A introdução desses produtos químicos sintéticos no ambiente vem alterando profundamente a disponibilidade natural dos elementos químicos para os organismos vivos e, por conseguinte o equilíbrio ecológico já estabelecido e a adaptação da biota lapidada por milhões de anos. Assim, inúmeros produtos químicos que outrora foram criados com a promessa de trazer benefícios infindáveis ao homem, hoje são considerados contaminantes ou poluentes por causa dos desequilíbrios nos ecossistemas e inúmeros impactos demonstráveis ou suspeitos na biota (MIRANDA-FILHO; CARMELA MONTONE; FILLMANN, 2008). Muitos grupos funcionais de caráter orgânico reúnem características peculiares que os fazem particularmente persistentes no ambiente e, por isto são denominados como Substâncias Tóxicas Persistentes (STP) (ALMEIDA et al., 2007).

Diante desse cenário alarmante, vários produtos químicos sintéticos não são mais utilizados. Alguns tratados e convenções foram criados para mitigar esta situação. O primeiro tratado global para a eliminação das substâncias tóxicas persistentes foi resultado da Convenção de Estocolmo, ratificado por 50 países em 2001, visa buscar o controle imediato via banimento ou restrição de 12 POPs (Poluentes Orgânicos Persistentes) pelas nações desenvolvidas. Estes POPs são conhecidos como os “doze sujos”: aldrin, clordano, DDT, mirex, toxafeno, dieldrin, endrin, heptacloro, Bifenilas Policloradas (PCBs), Hexaclorobenzeno (HCB), Dioxinas (PCDD) e Furanos (PCDFs). Além disso, a Convenção de Estocolmo estimula as nações em desenvolvimento a controlar o uso e a desenvolver

políticas mais rigorosas quanto ao descarte e armazenamento dos organoclorados (OCs), assim como a queima de resíduos impróprios municipais, fonte potencial de dioxinas e furanos ao meio ambiente. A Convenção de Roterdã (2004) também tem contemplado o banimento ou restrição do uso de 27 compostos químicos sintéticos (praguicidas e produtos para uso industrial), oito dos quais já estavam incluídos na Convenção de Estocolmo (i.e. PCBs, aldrin, dieldrin, DDT, clordano, HCB, toxafeno e heptacloro). No Brasil, profissionais ligados à área ambiental têm se reunido com representantes de outros países da América do Sul e Caribe e da UNEP - *United Nations Environment Programme*, buscando conhecer as reais potencialidades de cada país com o objetivo de se atingir o que tem sido proposto, com relação aos OCs para os países desenvolvidos (MIRANDA-FILHO; CARMELA MONTONE; FILLMANN, 2008).

As STP compõem uma classe conhecida como POPS, que juntamente com outras substâncias, que apresentam os critérios de persistência e toxicidade, compõem o grupo mais abrangente das STP. Dentre as STP, destacam-se os compostos organoclorados e compostos orgânicos de metais. O grupo dos OCs possui estrutura predominantemente cíclica com elevado peso molecular, incluindo alguns inseticidas, fungicidas, herbicidas, químicos industriais, compostos secundários e outros produtos sintéticos (ALMEIDA et al., 2007).

O uso de agrotóxicos na agricultura é a principal fonte de entrada destas substâncias no ambiente pelas quantidades e frequência de aplicação, embora existam outras fontes (doméstica, industrial e de saúde pública) nas campanhas de controle de vetores de doenças como a dengue e a malária (ROCHA, 2011).

2.5.1 Histórico dos Organoclorados (OCs)

A saga dos OCs teve início na Segunda Guerra Mundial, com a utilização do DDT (Diclorodifeniltricloroetano), o praguicida mais conhecido e empregado no mundo, utilizado para combater pragas na agricultura e alguns vetores de doenças como ocorreu para a erradicação da malária. O DDT foi banido na maioria dos países a partir da década de 1970, alguns anos após a publicação do livro intitulado Primavera Silenciosa *(Silent Spring)* de Rachel Carson que relata os efeitos deletérios na vida selvagem, época em que também se deu início à revolução ambientalista. Porém o seu uso continua em alguns países em via de desenvolvimento. Os OCs foram banidos na maior parte do globo ou seu uso restrito em

função dos efeitos tóxicos gerados em longo prazo sobre a biota (MIRANDA-FILHO; CARMELA MONTONE; FILLMANN, 2008).

Outros praguicidas OCs foram criados depois do DDT, e os mais conhecidos são hexaclorobenzeno (HCB), toxafeno e a família dos ciclodienoclorados, considerados os mais tóxicos dentre os OCs. Outra classe de OCs difundida mundialmente são as Bifenilas Policloradas, descobertos no século XIX. Os PCBs foram muito empregados como fluidos dielétricos em transformadores e capacitores, nas indústrias do papel e plástico, como ingrediente na composição de alguns praguicidas, etc. Compostos secundários formados preferencialmente a partir da queima irregular dos PCBs e praguicidas OCs podem ser lançados na atmosfera sobre a forma de dioxinas (Dibenzodioxinas Policloradas – PCDD) e furanos (Dibenzofuranos Policlorados – PCDF) (MIRANDA-FILHO; CARMELA MONTONE; FILLMANN, 2008).

2.5.2 Propriedades Físico-Químicas dos OCs

O grupo dos OCs possui elevada toxicidade e apresenta características peculiares (MIRANDA-FILHO; CARMELA MONTONE; FILLMANN, 2008):

1. Difícil degradação físico-química e biológica, resultando em uma elevada persistência no ambiente.
2. São semivoláteis, sendo transportados por via área, aquática, terrestre e biológica a longas distâncias.
3. São lipofílicos e hidrofóbicos podendo sofrer bioacumulação nos tecidos adiposos dos seres vivos e biomagnificação ao longo da cadeia trófica.

A tendência de um composto químico em se acumular nos organismos é avaliada através da estimativa do coeficiente de partição ($Log\ K_{ow}$) do mesmo entre octanol e água. O coeficiente de partição octanol/água expressa a persistência do contaminante de acordo com seu grau de lipofilia. Esta é uma medida quantitativa conveniente da lipofilicidade de um soluto, uma vez que o octanol é um solvente orgânico que serve como modelo para lipídeos típicos. O coeficiente de partição de compostos hidrofóbicos é usualmente dado como seu logaritmo ($Log_{10}\ K_{ow}$). Substâncias altamente lipofílicas, tais como o DDT tem $K_{ow}>10^6$ e

uma tendência à partição em lipídeos (MIRANDA-FILHO; CARMELA MONTONE; FILLMANN, 2008).

2.5.3 Metabolização dos OCs

Este processo é atribuído principalmente à ação das enzimas do sistema citocromo P-450 do fígado. Os citocromos P-450 são hemiproteínas presentes em todos os organismos vivos e a função catalítica dessas enzimas está relacionada com a transferência de um átomo de oxigênio a partir do O_2 para vários substratos, reação denominada de monoxigenação. Os compostos xenobióticos são normalmente metabolizados no fígado, rim e intestino, sendo que a atividade enzimática ocorre no fígado, e o sistema citocromo P-450 – dependente das enzimas oxidase de função mista (MFOs) – é elementar nas defesas biológicas. Possuem importância na reprodução porque metabolizam hormônios esteróides e corpos estranhos, facilitando a sua excreção. Por sua atuação, adicionam oxigênio a uma grande gama de compostos, tornando-os mais solúveis em água e mais facilmente excretados. Embora a indução das enzimas do sistema oxidase seja considerada uma resposta adaptativa, os metabólitos de alguns xenobióticos são mais tóxicos que os compostos de origem e por isso o metabolismo pelas MFOs nem sempre é benéfico (MIRANDA-FILHO; CARMELA MONTONE; FILLMANN, 2008).

2.5.4 Danos dos OCs à Biota

Pesticidas e outros contaminantes podem influenciar, direta e indiretamente, a habilidade à sobrevivência e prosperidade de espécies de vida selvagem nos meios aquático ou terrestre, considerando que a exposição ao poluente possa ser aguda ou crônica. A influência direta ocorre devido aos efeitos dos pesticidas ou outros contaminantes ambientais se manifestarem em todos os níveis biológicos (molecular, celular, tecidual e orgânico), podendo influenciar na condição física geral do animal através da alteração de certos

parâmetros biológicos (CHRISTIAN; BAUDINETTE; PAMULA, 1997[2] apud PRESLEY; AUSTIN; DABBERT, 2010, p. 90). Segundo Presley (2010) a habilidade da vida selvagem para prosperar, competir ou funcionar e, por último, de sobreviver pode ser indiretamente afetada pela exposição aos pesticidas e outros contaminantes ambientais que modificam significativamente o comportamento do animal e a sua susceptibilidade a parasitas e patógenos. Literatura recente, relativa aos efeitos diretos ou indiretos dos mesmos em ambas as habilidades fisiológicas e comportamentais apontam quatro pontos chaves para sobrevivência e prosperidade das populações de vida selvagem:

1. Exposição aguda e crônica a contaminantes pode causar danos fisiológicos diretos aos tecidos e órgãos e impedir o funcionamento normal dos processos biológicos (circulação, digestão, respiração) assim como alterando o balanço energético (aquisição e gasto de energia).
2. Inibição prolongada de impulsos neuroquímicos e disrupção de neurotransmissores podem afetar a habilidade do animal em receber, processar e armazenar informações, influenciando seu comportamento.
3. Exposição maternal aos contaminantes durante a gestação pode causar anormalidades no desenvolvimento neurológico do feto e pode causar exposição durante a lactação.
4. Indiretamente, os animais selvagens podem vir a se tornar mais susceptíveis a doenças tumorais, assim como parasitas e doenças infecciosas, como resultado de comprometimento fisiológico e imunológico.

Fortes correlações entre a exposição do animal a pesticidas e outros contaminantes ambientais e supressão da resposta imune a mudanças patogênicas específicas através das vias anticolinérgicas e não colinérgicas e respostas como hipersensibilidade e autoimunidade tem sido relatadas. Os efeitos causados por pesticidas e outros contaminantes ambientais nos componentes e funções do sistema imune tem sido relacionados ao comprometimento e à redução da resistência às doenças nos animais expostos. É provável que a exposição a baixos níveis de OCs estimularia o sistema imune do animal e que a depressão na função imunológica se deveria a altos níveis de exposição. Relacionado aos efeitos da

[2] CHRISTIAN, K. A.; BAUDINETTE, R. V.; PAMULA, Y. Energetic costs of activity by lizards in the field. **Functional Ecology**, v. 11, p. 392-397, 1997.

imunossupressão encontrar-se-iam alterações na imunidade não específica, baixa resistência e hipersensibilidade a organismos patogênicos (PRESLEY; AUSTIN; DABBERT, 2010).

A principal forma de saber se um composto químico pode causar dano à biota é através do conhecimento de como este é absorvido, usado e ou liberado para o ambiente (MIRANDA-FILHO; CARMELA MONTONE; FILLMANN, 2008). No entanto, ainda há muitas lacunas nesse sentido, principalmente nos répteis, uma vez que os estudos toxicológicos têm sido realizados na sua maioria, em aves e mamíferos, servindo como base para os estudos em outros táxons (GARDNER; OBERDÖRSTER, 2005). Ademais, nos animais oriundos de vida livre, princípios básicos da ecotoxicologia, tais como: via duração e dose de exposição (os quais englobariam uma melhor compreensão dos efeitos de determinada substância) são na sua maioria desconhecidas, ficando praticamente restritos a condições de laboratório. Na literatura, OCs em vertebrados marinhos são mais comumente, monitorados de maneira oportunista, como por exemplo, em tecidos de animais encalhados. Assim, quando da obtenção de informações sobre os níveis de contaminantes nos oceanos, estes organismos poderiam ser considerados; segundo espécie e condições: sentinelas, monitores ou indicadores da qualidade do ambiente.

2.5.5 Pesticidas Organoclorados (POCs)

Os pesticidas incluem todos os xenobióticos cujo propósito específico é de matar ou de eliminar outra forma de vida, habitualmente insetos ou roedores. Estes compostos podem ser divididos em quatro classes: organofosforados, organotinas, carbamatos e organoclorados (SEILS, A.; NOUJAIM, S. R. 2001). Por seu uso principalmente para fins agrícolas são denominados agrotóxicos, mas também conhecidos por diversos nomes como, por exemplo, defensivos agrícolas, protetores de plantas, agroquímicos, praguicidas, biocidas, venenos, pesticidas, dentre outros (ROCHA, 2011). A partir de 1985, o uso dos agrotóxicos, ficou restrito no Brasil pela Portaria n. 10/SNVS de 08/03/1985 emitida pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA, 1985).

2.5.5.1 Metabólitos do DDT (pp'-DDD, op'-DDD, pp'-DDE, op'-DDE)

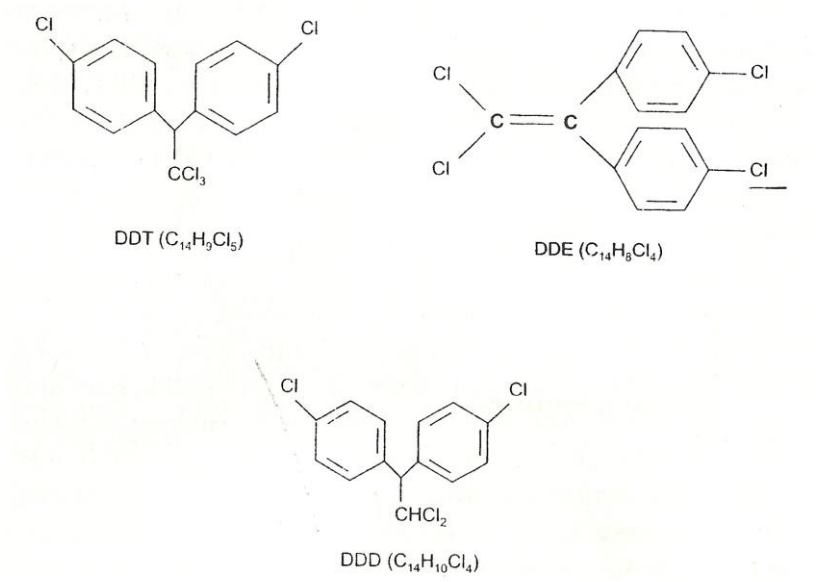
O diclorodifeniltricloroetano, mais conhecido como DDT, tem sido o inseticida mais usado a nível mundial por sua efetividade no controle de pragas. Também tem sido o mais estudado pela sua capacidade de bioacumulação em tecidos de organismos silvestres e os efeitos nocivos relacionados. Salvou várias vidas no controle de pragas como a malária, porém sua persistência e lipofilicidade causou a morte de vários animais. É altamente persistente em solos com cerca de 1,1 a 3,4 anos, também exibe altos fatores de bioconcentração. No ambiente, o DDT tem alta reatividade e atua como interferente endócrino (ALMEIDA et al., 2007).

O DDT foi sintetizado pela primeira vez em 1873, pelo alemão Othmar Zeidler, na Universidade de Estrasburgo, cidade pertencente neste período a Alemanha. Redescoberto pelo entomologista suíço, Dr. Paul Muller, em 1939, o DDT foi introduzido como um inseticida logo após a Segunda Guerra Mundial. Seu sucesso fez com que fosse aceito sem críticas, pois era mais ativo que qualquer outro inseticida conhecido, de produção barata, baixa toxicidade aguda em mamíferos e muito persistente. Os principais metabólitos do DDT são o DDE (diclorodifeniletileno) e o DDD (diclorodifenildicloroetilano), sendo DDE produto de degradação da maioria das reações que ocorrem no meio ambiente (ALMEIDA et al., 2007).

O DDT em grau técnico possui os seguintes constituintes: pp'-DDT (71,1%), op'-DDT (14,9%), pp'-DDD (0,3%), op'-DDD (0,1%), pp'-DDE (4,0%), op'-DDE (0,1%) e produtos não identificados (3,5%). O DDT era encontrado no mercado com uma variedade de nomes comerciais: Anofex®, Gezarex®, Dinocide®, Gesarol®, Guesapon®, Gyron®, Ixodex®, Neocid®, Neocidol® e Zerdane®. A acumulação de DDT na natureza foi pela primeira vez reconhecida na década de 1950. Desde 1940, mais de dois bilhões de quilogramas deste produto foram usados em todo o mundo e 80% foram utilizados na agricultura. Em 1973, o seu uso foi banido nos EUA pela EPA (*Environmental Protection Agency*), mas é sabido que este produto continuou a ser manufaturado e utilizado extensivamente na agricultura e no controle de vetores de enfermidades em alguns países tropicais em desenvolvimento. No México e na África do Sul, os efeitos deste pesticida ainda se fazem presentes devido ao seu uso recente no controle de doenças transmitidas por mosquitos. O DDT e seus metabólitos (Figura 4) podem ser detectados rotineiramente, mesmo nos dias de hoje, em função da sua persistência e migração atmosférica para todas as partes do globo, incluindo as regiões

polares, a partir de países que ainda têm o uso permitido (MIRANDA-FILHO; CARMELA MONTONE; FILLMANN, 2008).

Figura 4 - Estrutura química molecular do DDT e seus metabólitos

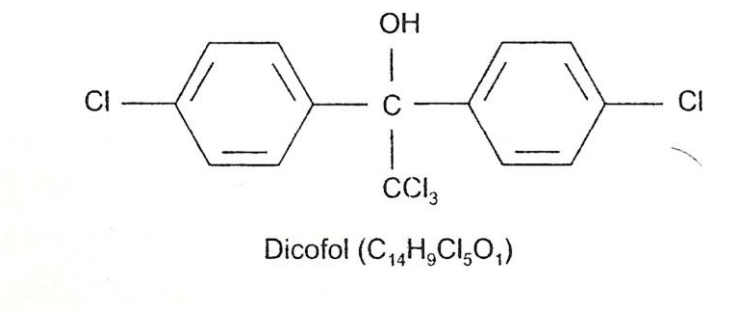


Fonte: (MIRANDA-FILHO; CARMELA MONTONE; FILLMANN, 2008 adaptado de MACKAY; SHIU; MA, 2000).

2.5.5.2 Dicofol

Introduzido comercialmente como acaricida em 1955, o dicofol (Figura 5) é outro praguicida de estrutura química semelhante ao DDT. Também é conhecido como Keltane, Acarin, Carbax, Benzenometanol, entre outros. No solo apresenta persistência moderada, sendo a meia-vida de aproximadamente 60 dias e em condições anaeróbicas 16 dias. Possui toxicidade moderada para mamíferos e aves, sendo altamente tóxico para peixes. Tem sido empregado nas culturas de algodão, frutas cítricas, maçã, pepino, tomate, alface, plantas ornamentais, etc. O isômero p,p’- dicofol é o principal composto do dicofol grau técnico, sendo mais persistente que o,p’- dicofol. O dicofol mostra um padrão de distribuição similar ao do DDT, mas por ser mais polar tende a ser menos persistente no corpo (MIRANDA-FILHO; CARMELA MONTONE; FILLMANN, 2008).

Figura 5 - Estrutura química molecular do Dicofol



Fonte: (MIRANDA-FILHO; CARMELA MONTONE; FILLMANN, 2008 adaptado de MACKAY; SHIU; MA, 2000).

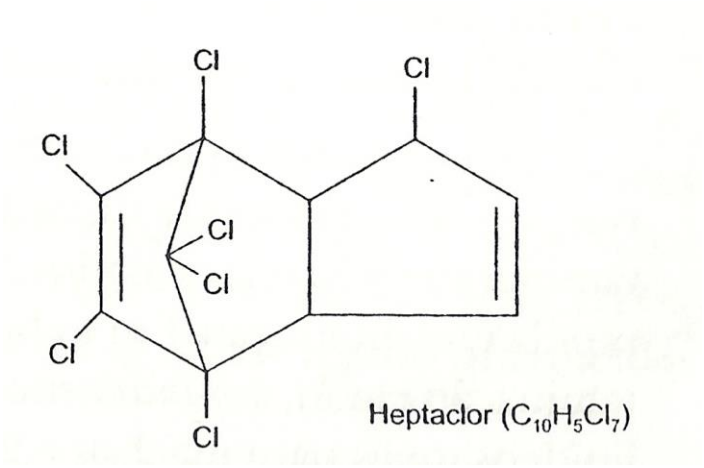
2.5.5.3 Ciclodienoclorados (Heptacloro, Endosulfan)

Os pesticidas ciclodienoclorados foram criados após a Segunda Guerra Mundial e por isso possuem uma origem mais recente que o DDT (1939) e o HCH (1940). Também se destacam por sua persistência no meio ambiente e estão entre os OCs mais tóxicos que se tem conhecimento (MIRANDA-FILHO; CARMELA MONTONE; FILLMANN, 2008).

2.5.5.3.1 Heptacloro

O composto químico Heptacloro (Figura 6) foi obtido a partir do clordano (constituinte com 6-30% em peso) em 1946 e introduzido como praguicida comercial em 1952 para o controle de insetos terrestres e no tratamento de sementes. É considerado mais tóxico que o clordano e depois de aplicado, o heptacloro pode ser assimilado através do solo pelas raízes das plantas. Em mamíferos, o heptacloro é rapidamente oxidado a heptacloro-epóxido que é transformado mais lentamente. Nomes comerciais incluem Heptagran, Heptagranox, Heptamak, Basaklor, Drinox, Soleptax, Gold Crest H-60, Termide e Velsicol 104. Relata-se que seja possível que possua um efeito carcinogênico em humanos (MIRANDA-FILHO; CARMELA MONTONE; FILLMANN, 2008). O Heptacloro é metabolizado em solos, plantas e animais para heptacloro epóxido, que é mais estável em sistemas biológicos, além de ser cancerígeno. No solo de regiões temperadas a persistência é de 0,1 a 2 anos (ALMEIDA et al., 2007).

Figura 6 - Estrutura química molecular do Heptacloro



Fonte: (MIRANDA-FILHO; CARMELA MONTONE; FILLMANN, 2008 adaptado de MACKAY; SHIU; MA, 2000).

2.5.5.3.2 Endosulfan

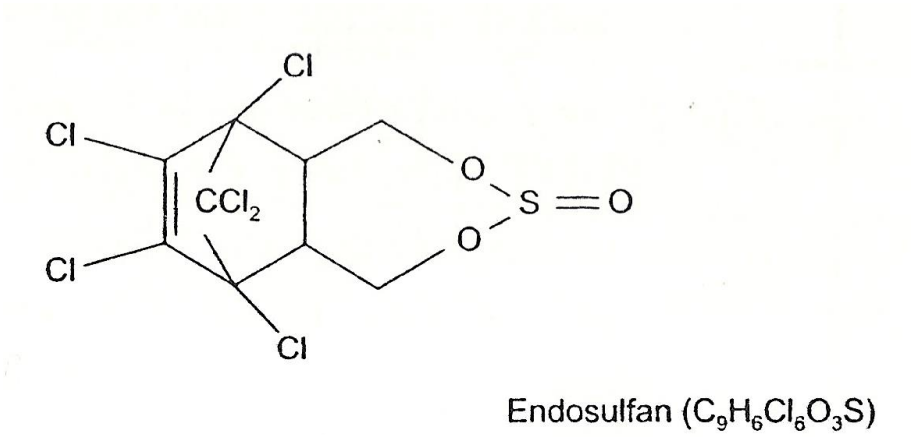
O Endosulfan (Figura 7) é um inseticida de contato e de ingestão utilizado principalmente na cultura de grãos, frutas e legumes, tabaco e algodão. Também é usado como um preservativo de madeira. É uma mistura de dois estereoisômeros, o α-endosulfan e o β-endosulfan, presentes na razão de 7:3, respectivamente. O produto técnico contém de 90 a 95% da mistura dos dois isômeros (70% α-endosulfan e 30% β-endosulfan). α e β-endosulfan são resistentes a fotodegradação, porém os principais metabólitos: endosulfan-sulfato e endosulfan diol são sensíveis à fotólise. O principal metabólito detectado nos tecidos dos animais expostos ao Endosulfan é p-Endosulfan sulfato (MIRANDA-FILHO; CARMELA MONTONE; FILLMANN, 2008). É moderadamente persistente no solo por aproximadamente 50 dias e cerca de 35 a 150 dias para os isômeros α e o β. Nas plantas o Endosulfan é rapidamente degradado para seu sulfato correspondente. Há evidências de que agiria como interferente endócrino (ALMEIDA et al., 2007).

A principal forma de exposição ao Endosulfan se dá através do consumo de alimentos contaminados, mas também pode ocorrer pelo contato da pele com o solo contaminado e através do fumo de cigarros feitos com tabaco que possui resíduos de Endosulfan. Ao contrário dos demais OCs, este não é um produto facilmente bioacumulativo não sendo tão persistente nos tecidos biológicos. Além disso, possui uma solubilidade em água mais elevada

que a grande parte dos outros praguicidas organoclorados, não tendo muita afinidade por lipídeos (MIRANDA-FILHO; CARMELA MONTONE; FILLMANN, 2008).

O Endosulfan e seus derivados estão cadastrados e liberados para uso na agropecuária em vários estados do Brasil. Em países industrializados, o Endosulfan também continua a ser empregado (MIRANDA-FILHO; CARMELA MONTONE; FILLMANN, 2008).

Figura 7 - Estrutura química molecular do Endosulfan

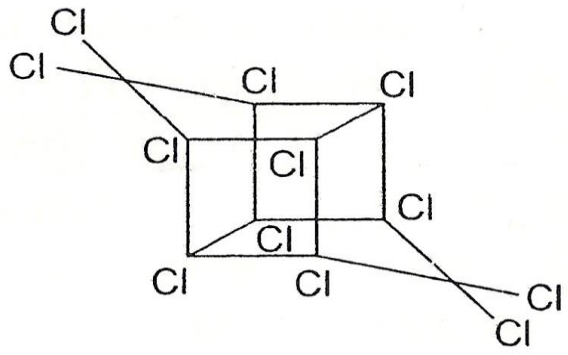


Fonte: (MIRANDA-FILHO; CARMELA MONTONE; FILLMANN, 2008 adaptado de MACKAY; SHIU; MA, 2000).

2.5.5.4 Mirex

O Mirex (Figura 8) foi criado nos Estados Unidos na década de 1950, sendo empregado principalmente no controle de formigas e cupins e como retardante de chamas em plástico, borrachas, tinta, papel e utensílios elétricos com o nome comercial de Dechlorane®, até o início da década de 1970. No meio ambiente, o Mirex pode ser transformado em Fotomirex, que é considerado mais tóxico que o seu precursor. Uma vez no organismo, o Mirex não é metabolizado sendo acumulado na gordura (MIRANDA-FILHO; CARMELA MONTONE; FILLMANN, 2008).

Figura 8 - Estrutura química molecular do Mirex



Mirex ($C_{10}Cl_{12}$)

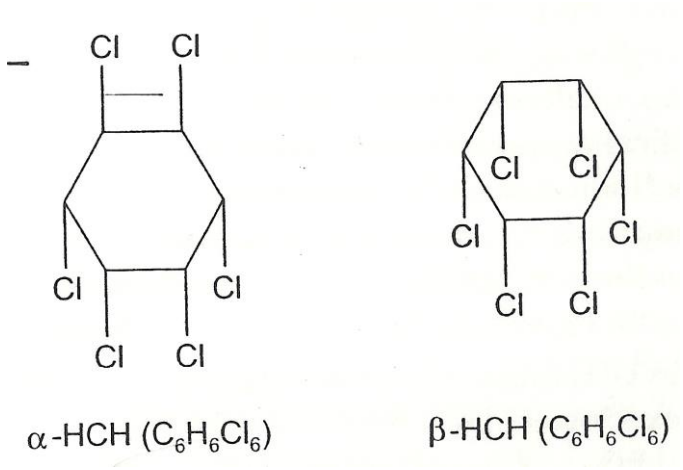
Fonte: (MIRANDA-FILHO; CARMELA MONTONE; FILLMANN, 2008 adaptado de MACKAY; SHIU; MA, 2000).

2.5.5.5 HCHS (α-BHC e β-BHC)

Dentre os praguicidas cicloexano/benzeno-clorados, o HCH (Figura 9) ou erroneamente denominado Benzeno-hexacloro (BHC), foi o primeiro OC a ser sintetizado dando origem aos praguicidas sintéticos. Este composto foi criado em 1825, mas foi utilizado como praguicida somente em 1940, tendo sido redescoberto por entomologistas franceses e britânicos. O HCH tem sido produzido comercialmente desde 1948. Dos cinco isômeros de HCH, somente o gama (γ), denominado lindano e o HCH em grau técnico (mistura dos isômeros β-9%,γ-14%;α-70%) possuem propriedades inseticidas. São caracterizados por possuírem baixa lipofilia e maior degradabilidade que os DDTs, também pela sua elevada pressão de vapor, que lhes confere elevada mobilidade aérea (MIRANDA-FILHO; CARMELA MONTONE; FILLMANN, 2008). Os HCHs são menos bioacumulativos que outros organoclorados devido as suas baixas lipofilicidades, enquanto as altas pressões de vapor facilitam o transporte para longas distâncias na atmosfera. O lindano apresenta persistência no solo superior a um ano e atua como interferente endócrino (ALMEIDA et al., 2007).

O HCH é assimilado pelo corpo através da alimentação, água contaminada, pelas mucosas dérmica e respiratória. Entre os isômeros de HCH, o HCH β é eliminado do corpo mais lentamente (MIRANDA-FILHO; CARMELA MONTONE; FILLMANN, 2008).

Figura 9 - Estrutura química molecular do α-BHC e β-BHC



Fonte: (MIRANDA-FILHO; CARMELA MONTONE; FILLMANN, 2008 adaptado de MACKAY; SHIU; MA, 2000).

2.5.6 Exposição aos OCs e Carcinogênese

Vários fatores podem estar relacionados ao aparecimento do câncer, como agentes físicos (radiações ionizantes e raios ultravioleta), biológicos (vírus) e, principalmente, químicos (MÍDIO; MARTINS, 2000[3] apud PAOLIELLO; DA SILVA, 2004). Existem evidências que sugerem que a exposição aos OCs é importante na etiologia do câncer. Por exemplo, o sistema imune é alvo da toxicidade gerada pelos compostos organoclorados e através da utilização de modelos animais, verificou-se que a exposição a essas substâncias favoreceria a carcinogênese por mecanismos de imunosupressão ou promoção tumoral (KLAASSEN, 2001).

O processo de carcinogênese envolve interações complexas entre vários fatores, tanto exógenos (ambientais), quanto endógenos (genéticos, hormonais, etc.). Duas fases compreendem este processo: iniciação e promoção. A iniciação geralmente é induzida por um potente agente mutagênico e é irreversível. Pode ser considerada uma fase crítica, uma vez

[3] MÍDIO, A. F.; MARTINS, D. I. **Toxicologia de alimentos.** São Paulo: Varela, 2000. 295 p.

que a célula com mutação permanece dormente até que um evento epigenético (alteração no padrão gênico decorrente de outros fatores além da mutação) se manifeste. A promoção é a fase seguinte, de duração variável e representada por uma série de eventos reversíveis que envolvem, principalmente, a ativação da transcrição de genes. A transformação maligna de células normais a cancerígenas se origina devido à acumulação por longo período de eventos genéticos e epigenéticos (KUMAR; PAWAIYA, 2010).

De acordo com a ação biológica dos compostos, estes podem ser considerados carcinógenos químicos imunossupressores e os de tipo hormonal. Sendo que a interação de vários componentes celulares e humorais do sistema imune com xenobióticos (fármacos, contaminantes ambientais e substâncias químicas) podem induzir alterações que comprometam a imunocompetência. Os carcinógenos químicos imunossupressores são responsáveis pela supressão total ou pela diminuição da resistência imunológica, facilitando a produção de câncer, tanto por outros agentes químicos, quanto principalmente por agentes biológicos, como o vírus. Já os agentes carcinógenos hormonais, tanto os naturais como os sintéticos, apresentam evidências bastante consistentes da produção de neoplasmas quase sempre relacionadas aos locais em que devem agir ou são produzidos. Por outro lado, muitos compostos químicos podem causar danos no DNA e agir especificamente nas fases de iniciação ou promoção do tumor (MÍDIO; MARTINS, 2000[4] apud PAOLIELLO; DA SILVA, 2004). E quando há exposição a mais de dois toxicantes, deve-se considerar a possibilidade de um composto interferir na ação do outro (PAOLIELLO; DA SILVA, 2004).

Tendo em vista que muitos vírus oncogênicos, como o alpha herpesvirus – *GTFHV* relacionado à FP precisariam de cofatores incluindo os de tipo ambiental (BALAZS,1991; ADNYANA; LADDS; BLAIR, 1997), para serem ativados perante diversos mecanismos e partindo da hipótese: “Os OCs podem interferir na saúde de *C. mydas* e favorecer consequentemente o desenvolvimento ou manifestação da fibropapilomatose”, pretendeu-se dar cumprimento aos objetivos do presente estudo.

[4] MÍDIO, A. F.; MARTINS, D. I. **Toxicologia de alimentos.** São Paulo: Varela, 2000. 295 p.

3 OBJETIVO GERAL

Monitorar pesticidas organoclorados em tecidos de tartarugas marinhas juvenis da espécie *Chelonia mydas* com e sem fibropapilomatose.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Monitorar as concentrações dos agrotóxicos clorados: α-BHC, β-BHC, Heptacloro, Dicofol, α-endosulfan, β-endosulfan, Sulfato endosulfan, pp'-DDD, op'-DDD, pp'-DDE, op'-DDE e Mirex nos tecidos adiposo e hepático de espécimes de *C. mydas* acometidas ou não pela fibropapilomatose.

- Analisar a variação das concentrações destes poluentes em relação à presença ou ausência da FP, a gravidade na sua manifestação através da utilização do escore de severidade da fibropapilomatose (FPS) e o índice de fibropapilomatose (FPI), assim como sobre o índice da condição corporal (ICC).

- Estudar as concentrações destes poluentes de acordo com a procedência das tartarugas-verdes, para melhor compreender a relação entre o grau de contaminação e a variação da FP, de acordo com registros da prevalência da FP nestas regiões.

- Comparar as concentrações dos contaminantes em relação ao tipo de tecido ou matriz analisada e segundo o tamanho e sexo do animal.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

As tartarugas-verdes *(Chelonia mydas)* foram capturadas em diversas praias do litoral sudeste do Brasil onde habitualmente há ocorrência de animais com e sem fibropapilomatose (Figura 10). Normalmente as tartarugas marinhas são capturadas incidentalmente em redes de pesca ou resgatadas de encalhes na praia; podendo ser entregues vivas ou mortas ao Projeto TAMAR-ICMBio.

Figura 10 – Indivíduo acometido pela fibropapilomatose. Note-se a gravidade e ampla distribuição das lesões

Fonte: Rossi (2011).

Para obtenção das amostras teciduais foi realizado exame necroscópico durante o período de 2011-2012 dos animais nas bases do Projeto TAMAR-ICMBio (Ubatuba/SP e

Vitória/ES). Adicionalmente, trabalhou-se com tartarugas-verdes provenientes da Praia Grande/SP, as quais foram encaminhadas pelo Projeto Biopesca (Tabela 1).

Tabela 1 - Relação dos animais submetidos à necrópsia durante o período de 2011-2012

Localidade	**No. animais submetidos à necropsia**
Ubatuba/SP	28
Vitória/ES	39
Praia Grande/SP	24

Informações sobre a forma de captura das tartarugas encaminhadas aos projetos TAMAR-ICMBio ou Biopesca, marcação nas nadadeiras anteriores e/ou posteriores, Ficha clínica, data de óbito e data da necropsia, foram registradas quando possível. Para a realização deste trabalho, foram avaliadas as seguintes características:

4.1.1 Biometria e sexo dos animais

A biometria (Comprimento Curvilíneo da Carapaça em cm (CCC), Largura Curvilínea da Carapaça em cm (LCC) e Massa Corpórea em kg (MC)) foi realizada conforme procedimentos do TAMAR-ICMBio. O CCC é medido com precisão de 0.1 cm utilizando-se fita métrica flexível, da extremidade anterior na linha média (escudo nucal) até o ponto médio do segmento da linha que conecta as extremidades posteriores dos escudos supracaudais (TOREZANI et al., 2009); esta medida é posteriormente convertida em Comprimento Retilíneo da Carapaça (CRC). O CRC é estimado a partir CCC segundo Seminoff et al. (2003): CRC = (CCC - 2.2464) / 1.0363. O sexo do animal foi determinado pela observação das gônadas.

4.1.2 Condição corporal dos animais

Foi avaliada através de duas maneiras: avaliação visual ou subjetiva e mediante a obtenção do Índice de Condição Corporal (ICC).

Avaliação visual ou subjetiva: É obtida por meio da avaliação visual do estado geral do animal e da forma ou ¨concavidade¨ do plastrão (THOMSON et al., 2009). Segundo Walsh (1999) a classificação da condição geral de um animal é: normal, abaixo do peso ou emaciado. Desta forma, um animal é considerado ¨normal¨ se o plastrão é convexo, os olhos preenchem a órbita, a musculatura no pescoço possui tecido adiposo e as áreas axilares e inguinais são protuberantes; ¨abaixo do peso¨ se o plastrão está levemente côncavo, os olhos preenchem a órbita ou fundos, os músculos na área do pescoço possuem tecido adiposo circundante e as áreas axilares ou inguinais estão ligeiramente afundadas; ou ¨emaciado¨ se o plastrão se encontra extremamente côncavo, os olhos estão fundos, os músculos na área dos pescoço são mais óbvios com pouco ou nada de tecido adiposo circundante, e as áreas axilares e inguinais muito magras. Para efeitos desse trabalho, as tartarugas marinhas foram subjetivamente classificadas em um Escore de Condição Corporal (ECC) incluindo três categorias: ruim, regular e boa.

Índice de Condição Corporal (ICC): Os dados biométricos (CCC, LCC e MC) foram utilizados na obtenção do ICC que foi calculado segundo Bjorndal et al. (2000): ICC = MC / CRC^3, sendo MC a massa corpórea (kg) e CRC o Comprimento Retilíneo da Carapaça (cm).

Testes preliminares realizados demonstraram que a classificação subjetiva é confiável para animais classificados na categoria “ruim”, porém, não é clara no que se refere a indivíduos estimados como “regular” ou “bom”. Por outro lado, a classificação objetiva (ICC) é um indicador apropriado da condição corporal (SÁNCHEZ-SARMIENTO et al., 2012e; SÁNCHEZ-SARMIENTO et al., 2012c). Por este motivo embora também feita avaliação visual, somente o ICC foi utilizado nas análises estáticas como indicador de condição corporal.

4.1.3 Avaliação da manifestação da Fibropapilomatose

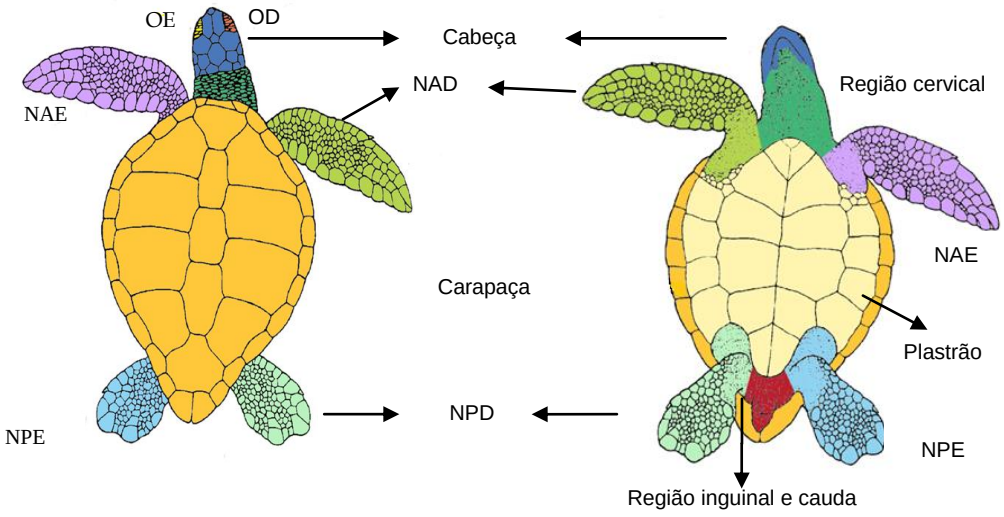
Foi registrada a ausência ou presença dos fibropapilomas visíveis externamente, quantidade, tamanho e localização anatômica dos mesmos (SÁNCHEZ-SARMIENTO et al., 2012d) segundo protocolo modificado, do Projeto TAMAR-ICMBio, com base nas

classificações de tamanho estabelecidas por (WORK; THIERRY; BALAZS, 1999) (Ver Figuras 11 e 12).

Figura 11 - Planilha para registro da localização anatômica dos fibropapilomas e sua classificação por tamanho

Localização anatômica	**Tipo (cm)**			
	A(FP<1)	**B**(1≤FP≤4)	**C**(4<FP≤10)	**D**(FP>10)
Olho direito				
Olho esquerdo				
Cabeça				
Região cervical				
Carapaça				
Plastrão				
Nadadeira anterior direita				
Nadadeira anterior esquerda				
Nadadeira posterior direita				
Nadadeira posterior esquerda				
Região inguinal e cauda				

Figura 12 - Regiões anatômicas utilizadas para registro da fibropapilomatose. OD: olho direito; OE: olho esquerdo; NAD: nadadeira anterior direita; NAE: nadadeira anterior esquerda; NPD: nadadeira posterior direita; NPE: nadadeira posterior esquerda



(A) Vista dorsal. **(B) Vista ventral.**

Fonte: Figuras adaptadas de Pritchard e Mortimer (2000) com edição de Ralph E. T. Vanstreels, Silmara Rossi e Angélica María Sánchez-Sarmiento (2012).

A avaliação do grau de acometimento ou severidade da FP pode ser feita através do uso de escores de fibropapilomatose (FPS) que variam entre FPS-0 (não acometida), FPS-1 (levemente acometida), FPS-2 (moderadamente acometida) e FPS-3 (altamente acometida). O uso de escores destaca a importância de se quantificar a severidade da doença em populações animais. O FPS pode ser relacionado ao estado fisiológico das tartarugas-verdes acometidas por FP. Com o refinamento apropriado destes e outros métodos a nível local (conforme variação regional da FP), o FPS pode servir como um preditor para se avaliar se as tartarugas estão aptas a sobreviver ou sucumbir à doença. Além disso, é um indicador útil para monitorar em campo a severidade da FP (WORK; BALAZS, 1999).

A partir disso e considerando número e o tamanho dos tumores, foi utilizada uma nova proposta que classifica objetivamente a severidade da FP nas tartarugas da costa brasileira (ROSSI et al., 2012; ROSSI et al., 2013). Assim, foi utilizado o número de tumores de acordo com as categorias de tamanho (A, B, C e D). O número de tumores em cada categoria foi posteriormente usado para calcular um índice para cada indivíduo: Índice de Fibropapilomatose (FPI) = $(1 \times FP_A) + (2 \times FP_B) + (4 \times FP_C) + (8 \times FP_D)$, onde FP_x é o número de tumores em cada categoria de tamanho que foi contabilizado no indivíduo. O índice de Fibropapilomatose resultante foi usado para classificar a severidade da doença em escores: “leve” (FPI < 50), “moderada” ($50 \leq$ FPI < 100) ou “severa” (FPI ≥ 100). Através deste índice, indivíduos com o mesmo número de tumores pode ser classificado de maneira diferente, mas procurando sempre diferenciar seu real grau de acometimento (ROSSI et al., 2012).

Desta forma, para cada tartaruga nesse estudo foi calculado o FPI e designado um escore da severidade da fibropapilomatose (FPS; “leve”, “moderada” ou “severa”) sendo que nos animais sem FP a categoria designada foi “ausente”.

4.2 DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

A seguir são apresentadas informações sobre as localidades de procedência dos animais analisados no presente estudo, e sua localização geográfica (Figura 13).

Figura 13 - Mapa das regiões de coleta das amostras

Fonte: (Sánchez-Sarmiento, 2013), com edição de Ralph E. T. Vanstreels e Angélica María Sánchez-Sarmiento.

4.2.1 Ubatuba/SP

Ubatuba está localizada na região norte do estado de São Paulo, no sudeste do Brasil. A área monitorada pelo TAMAR-ICMBio na base de Ubatuba (23°26’S - 45°05’W) vai da divisa com Paraty/RJ (norte), até o município de Caraguatatuba/SP (sul) totalizando 106 km de extensão, onde estão localizadas cerca de 73 praias (BAPTISTOTTE, 2007).

O turismo é a atividade econômica principal da região, a qual também abriga uma pequena atividade pesqueira comercial, visando principalmente o camarão (GALLO et al., 2006). Com isto, o litoral norte do estado de São Paulo apresenta características ambientais derivadas de atividades não agrícolas. Os problemas ambientais existentes nessa região estão associados à intensa atividade turística durante o período de verão e a presença do porto de São Sebastião e o Duto e Terminais Centro Sul (DTCS). Nessa região não são encontradas grandes indústrias, e não é relatado o uso de agrotóxicos clorados na literatura (SILVA, 2009).

Nessa região as tartarugas-verdes são mais abundantes durante o inverno austral e a primavera (GALLO et al., 2006), sendo um *habitat* exclusivamente de alimentação e desenvolvimento para as tartarugas-verdes juvenis (BAPTISTOTTE, 2007).

A prevalência de fibropapilomatose no estado de São Paulo é de 10,73% frente à média da prevalência nacional geral de 15,41% (BAPTISTOTTE, 2007).

4.2.2 Vitória/ES

A Baía do Espírito Santo está localizada na porção central do litoral do estado do Espírito Santo, sudeste brasileiro. Nesse estado, o TAMAR-ICMBio monitora descontinuamente 224 km de litoral, situados entre Itaúnas (18°24’S; 39°42’W) ao norte, na divisa com a Bahia e Anchieta (20°48’S; 40°38’W) ao sul. A maior parte da área monitorada está localizada na região do extremo norte, uma parte na região costeira central, localizada na região da grande Vitória e a outra área no litoral sul (BAPTISTOTTE, 2007).

Esta região é uma área com densa urbanização, com intensas atividades portuárias, recebendo elevadas cargas de efluentes domésticos e industriais (SANTOS, 2009). É reconhecida como uma área de alimentação e desenvolvimento de *Chelonia mydas*. A prevalência de fibropapilomatose no estado de Espírito Santo é de 27,43% frente à média de prevalência nacional geral de 15,41% (BAPTISTOTTE, 2007).

4.2.3 Praia Grande/SP

Esta localidade é monitorada pelo projeto Biopesca, as comunidades monitoradas são: Boutique de Peixes (24° 1'30.98"S; 46°24'33.61"O) e Peixaria Ocian (24° 2'29.38"S; 46°28'51.31"O) no município de Praia Grande, na Baixada Santista, região mais urbanizada e populosa do litoral paulista. No Estado de São Paulo, o Complexo Estuarino de Santos e São Vicente é hoje uma das regiões mais críticas quanto à contaminação dos diferentes compartimentos que integram os ecossistemas aquáticos - água, sedimento e biota (LAMPARELLI, 2001). Esse fato ocorre porque além do saneamento básico insuficiente, em alguns municípios, abriga o maior porto da América Latina e um expressivo complexo

industrial (CETESB, 2004) composto por portos, pólos petroquímicos e siderúrgicos e outras indústrias (SANTOS; FURLAN, 2010 [5] apud FERNANDES et al., 2011, p. 141). Essa região constitui a maior concentração de problemas ambientais do país. Suas principais fontes de poluição são as indústrias com descarga de efluentes líquidos, atmosféricos e sólidos; esgotos domésticos; descarga da Represa Billings; depósito de lixo doméstico e industrial; mineração e ocupação desordenada do solo; turismo sem planejamento e o porto de Santos (DIEGUES, 2002 [6] apud FERNANDES et al., 2011, p. 142).

A somatória desses fatores causa impactos negativos às populações de animais no local, como por exemplo, aumento do índice de mortalidade das tartarugas marinhas nessa região, considerada uma importante área de alimentação para *C. mydas* (MARANHO et al., 2008). Ao não ser uma região monitorada pelo projeto TAMAR-ICMBio não foi inclusa no levantamento realizado por Baptistotte (2007), que caracterizou espacial e temporalmente a fibropapilomatose em tartarugas marinhas da costa brasileira. Segundo informações obtidas através do projeto Biopesca, não tem sido relatada a presença de FP na região de Praia Grande.

4.3 COLETA E CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS

Fragmentos dos tecidos adiposo e hepático, com aproximadamente 5 - 10 g (3 x 4cm) foram coletados em duplicata durante o procedimento necroscópico e envelopados em folhas de papel alumínio (SÁNCHEZ-SARMIENTO et al., 2011). O material foi armazenado separadamente em recipientes de alumínio (um por animal), identificado e mantido congelado a -20 °C no Laboratório de Patologia Comparada de Animais Selvagens do Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (LAPCOM/VPT/FMVZ/USP) até sua análise química.

Conforme legislação vigente para atividades com finalidade científica, este trabalho recebeu a licença n. 26667-1, com validade até 02/2013, emitida pelo Sistema de Autorização

---

[5] SANTOS, A. L. G.; FURLAN, S.A. Manguezais da Baixada Santista, São Paulo – Brasil: uma bibliografia. In: VI Seminário Latino Americano de Geografia Física. In: II SEMINÁRIO IBERO AMERICANO DE GEOGRAFÍA FISICA, 2., 2010, Coimbra, Portugal: Universidade de Coimbra., 2010.

[6] DIEGUES, A. C. **Povos e águas; inventário de áreas úmidas brasileiras.** São Paulo; NUPAUB-USP, 2002.

e Informação em Biodiversidade (SISBIO) - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) do Ministério do Meio Ambiente (MMA).

4.4 DETERMINAÇÃO DE ORGANOCLORADOS EM TECIDOS

As análises para determinação de pesticidas organoclorados foram realizadas no Laboratório de Ecotoxicologia do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA-USP) na cidade de Piracicaba/SP.

Conforme metodologia já padronizada para análise de poluentes de caráter orgânico em tecidos de mamíferos marinhos (YOGUI, 2002), tartarugas marinhas (SILVA, 2009) assim como para qualquer matriz de caráter ambiental, o processamento do material foi feito segundo os respectivos cuidados analíticos que incluiu: limpeza do material e uso de reagentes apropriados, preparação das soluções padrões, preparação dos tecidos para análise (extração e *clean-up*) e estimativa do peso lipídico das amostras. A partir da definição dessas etapas, foi realizada a validação do método analítico conforme diretrizes do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO, 2010) para validação de análises químicas. A determinação (detecção e quantificação) dos pesticidas organoclorados foi realizada através da Cromatografia Gasosa com detector de captura de elétrons (GC-µECD).

4.4.1 Limpeza do material

A vidraria utilizada foi lavada, sequencialmente, com solução Extran® Alcalino diluído a 2% (MERCK®), água em abundância seguida de três lavagens com água MilliQ e, por fim, três lavagens com n-hexano. As colunas de vidro utilizadas na purificação foram imersas em Extran® alcalino por pelo menos 24 h e lavadas como mencionado acima; isto é necessário para evitar contaminações que possam influenciar nos resultados das análises (LIMA et al., 2003).

4.4.2 Reagentes e materiais

Os padrões analíticos de α-BHC, β-BHC, α-endosulfan, β-endosulfan, Sulfato endosulfan, pp'-DDD, op'-DDD, pp'-DDE, op'-DDE, Heptacloro, Dicofol e Mirex, com mais de 98,9% de pureza foram obtidos do Dr. Ehrnstorfer® (Augsburg, Germany) e ChemService (West Chester, PA, USA).

Os solventes utilizados foram acetonitrila, n-hexano e tolueno foram de grau HPLC (pureza> 98 %, J.T. Baker, Tedia Company INC® e Macron TM Chemicals®).

Durante as análises também foram empregados: sulfato de magnésio anidro ($MgSO_4$, J.T Baker e Sigma-Aldrich®), amina primária secundária (PSA, Agilent Technologies®), sílica gel (ø mm 0,05÷0,20 RS, densidade aparente (g/L) 400÷440, Analyticals®, Carloerba) e sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4, Mallinckrodt AR®). Quando necessário, utilizou-se água destilada e purificada em sistema Milli-Q Academic da Millipore.

4.4.3 Preparo das soluções padrões

Foram preparadas soluções estoque individuais em uma concentração de 1 mg/mL em tolueno e posteriormente armazenadas a -18 °C. As soluções de trabalho na diluição apropriada foram preparadas imediatamente antes do seu uso.

4.4.4 Equipamento

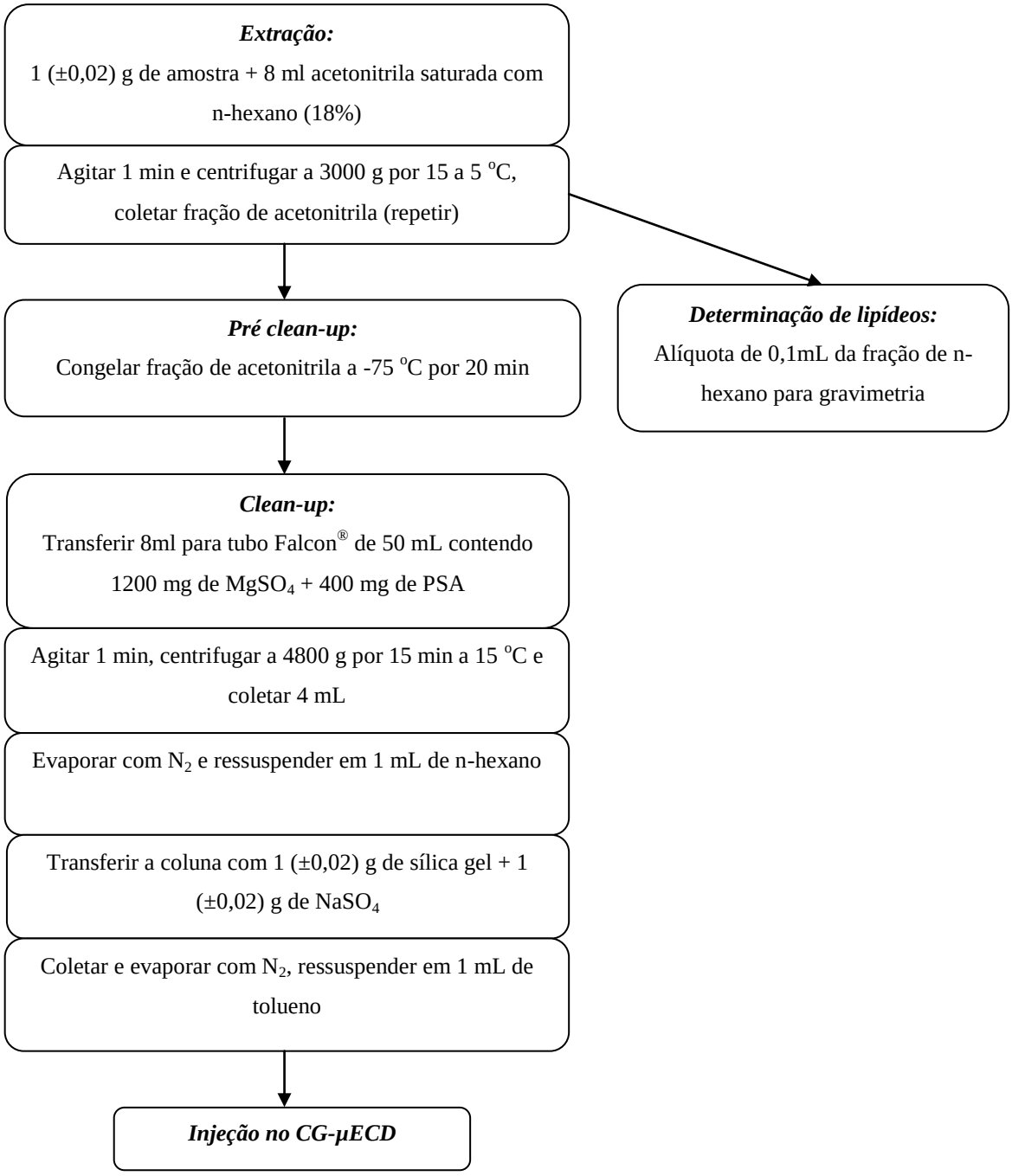
Um sistema cromatográfico de fase gasosa (Agilent, modelo 7890A), equipado com um micro detector de captura de elétrons (µECD) e coluna capilar Agilent HP (30 m x 320 µm x 0.25 µm) foi utilizado para a separação, detecção e quantificação dos agrotóxicos organoclorados. O software ChemStation B.04.02 foi utilizado para o controle do instrumento e aquisição de dados. As condições de operação do sistema CG-µECD foram: forno com temperatura inicial de 100 °C rampa de 210 °C a 20 °C min^{-1} mantido por 3 min; 210 °C rampa de 230 °C a 15 °C min^{-1} mantido por 5 min, 230 °C rampa de 280 °C a 10 °C min^{-1}

mantido por 3 min gás de arraste (N_2) com um fluxo constante de 1 mL min^{-1}; temperatura do detector 300 °C, gás *make-up* (N_2) de 39 mL min^{-1}. O tempo total da corrida analítica foi de 22,8 min.

4.4.5 Preparo das amostras

As amostras de tecidos mantidas a -20 °C até o início do processamento foram descongeladas e em seguida finamente cortadas com lâmina de bisturi. Posteriormente foram homogeneizados durante aproximadamente um minuto com *Ultraturrax*. O preparo das amostras para análise de agrotóxicos clorados por GC- µECD incluiu as etapas de extração e *clean-up;* limpeza ou purificação das amostras, prévio à injeção no cromatógrafo de gases. A extração visa remoção do(s) analito(s) da matriz, enquanto a etapa de *clean-up* foca na eliminação de interferentes. Na maioria dos métodos "clássicos" de análise as duas etapas geralmente são separadas (LANÇAS, 2004), assim foram direcionados os testes preliminares na procura de um método idôneo para a análise dos compostos nas matrizes estudadas garantindo um bom *clean-up* e boas porcentagens de recuperação. Conforme mostra a figura 14, foi proposto um novo método de extração, *clean-up* e análise dos compostos por Cromatografia Gasosa (GC-µECD) para os tecidos adiposo e hepático (SÁNCHEZ-SARMIENTO et al., 2012b; a).

Figura 14 - Fluxograma do experimento analítico



Fonte: (SÁNCHEZ-SARMIENTO, 2013)

4.4.5.1 Extração

A extração foi adaptada a partir do método de extração com acetonitrila saturada com n-hexano (18%) (CASTILLO; GONZÁLEZ; MIRALLES, 2011).

O procedimento consistiu em: 1 (±0,02) grama de tecido foi pesado e colocado em tubo Falcon® de 50 mL com base cônica. Ao tubo contendo amostra foram adicionados 8 mL da solução extratora saturada. Em seguida, foi agitado em *vortex* durante 1 minuto e centrifugado a 3000xg, a 5 °C por 15 min. Em seguida foi coletada a fração de acetonitrila com auxílio de pipeta *Pasteur* e colocada num frasco, separando-a da fração de n-hexano. Este procedimento foi repetido mais uma vez. No total foi usado (14 mL de acetonitrila e 3 mL de n-hexano) por amostra.

4.4.5.2 *Clean-up*

Primeiramente o extrato foi submetido a um pré *clean-up* deixando-o no *ultra freezer* por 20 min, para precipitação da gordura e uma melhor separação das fases.

4.4.5.2.1 Clean-up por d-SPE (dispersive solid-phase extraction)

Foi adaptado segundo protocolo proposto por Castillo, González e Miralles (2011), baseado em QuEChERS (ANASTASSIADES et al., 2003). A seguir 8 mL do extrato de acetonitrila foi colocado em um tubo Falcon® de 50 mL contendo 1,200 mg de MgSO4 e 400mg de PSA. Procedeu-se a agitação em *vortex* por um minuto e centrifugação a 4800xg, 15 °C durante 15 minutos. Do sobrenadante limpo foram coletados 4 mL os quais foram evaporados por influxo de nitrogênio até secura completa. Em seguida foi feita ressuspensão em 1 mL de n-hexano e o frasco passado 10 segundos em ultrasom para prosseguir com a segunda etapa do *clean-up*.

4.4.5.2.2 Mini coluna de sílica gel

Para o preparo da mini coluna de sílica gel foi empregado o método descrito por Pastor Ciscato (2008) o qual consiste em:

Preparação da sílica gel: A sílica foi seca a 120 °C por 4 h e resfriada em dessecador. Em seguida, este adsorvente foi parcialmente desativado por adição de água Milli-Q na proporção percentual de 1,5% em relação à sua massa. Após homogeneização e agitação por uma hora através do equipamento TE-240 massa agitadora pendular, o material foi deixado em repouso por 24 h e (desativado ou não), tendo sido armazenado ao abrigo da luz.

Preparo da coluna. Foi pesado um grama de sílica gel e transferido lentamente para a coluna (previamente lavada com n-hexano), ajustando-se o pó até a formação de um gel homogêneo. Durante esse procedimento o gel deve assentar no fundo da coluna evitando a formação de bolhas de ar.

Para isto deve-se agitar continuamente ao longo da mesma para que todo o ar seja expulso, de modo a se obter uma compactação uniforme. A existência de ar entre as partículas leva a formação de canais na coluna, os quais alargam as bandas eluídas. Nunca se deve permitir que o nível do solvente desça abaixo do nível do adsorvente, o que poderia acarretar rachaduras, comprometendo a eficiência da coluna (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998). Para isto, deve-se adicionar n-hexano aos poucos de maneira a sempre cobrir a parte final do gel.

Após o gel estar assentado na coluna, foi adicionado 1 g de sulfato de sódio anidro (previamente muflado a 400 °C por 4 horas). Tanto a coluna de sílica gel quanto o sulfato de sódio anidro devem ficar imersos em n-hexano.

Adicionando a amostra. Inicialmente abriu-se a torneira e retirou-se o n-hexano até a altura do sulfato de sódio. Com ajuda de uma pipeta *Pasteur* foi colocado 1 mL da amostra e eluído até a altura do sulfato de sódio. Foi adicionado 1 mL de n-hexano e do novo eluído até a altura do sulfato de sódio. Todo o volume eluído até o momento foi descartado. Na saída da coluna foi posicionado o frasco coletor para proceder a eluição.

Eluição da coluna: para a eluição da coluna foram empregados 2 eluentes, os quais seriam suficientes para carregar os analitos de interesse:
eluente 1: n-hexano:tolueno (65:35) e eluente 2: tolueno (100). Procedeu-se a lavagem do frasco que continha a amostra com 2 mL do eluente 1 e em seguida adicionou-se à coluna. Foi eluído até a altura do sulfato de sódio e em seguida colocado mais 6 mL do eluente 1 e eluído novamente até a altura do sulfato de sódio. Procedeu-se da mesma maneira para o eluente 2, recolhendo o extrato no mesmo frasco. O extrato purificado obtido (aproximadamente 18 mL) foi evaporado e ressuspendido em 1 mL de tolueno para injeção no GC-µECD.

4.4.5.3 Estimativa do peso lipídico

O peso lipídico foi calculado conforme Silva (2009), separando-se uma alíquota de 0,1mL da fração de n-hexano, após etapa de extração. Este volume foi colocado em pequenos frascos de vidro, previamente pesados. Após a total evaporação cada frasco foi novamente pesado e a diferença entre a pesagem inicial e a pesagem após a adição e evaporação da alíquota foi utilizada no cálculo da porcentagem de lipídeos, através da formula abaixo:

% lipídeos: resíduo (mg) / massa extraída

O método da gravimetria é amplamente usado na determinação do teor lipídico em amostras da biota, conforme mostram diversos estudos na área segundo Yogui (2002).

4.4.6 Validação do método analítico

A validação do método analítico foi realizada seguindo os seguintes parâmetros: linearidade, efeito matriz, limites de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão e repetibilidade (INMETRO, 2010). A linearidade foi determinada através da análise e construção de curvas analíticas. Amostras dos tecidos adiposo e hepático de um espécimen de *C. mydas* sem fibropapilomatose, proveniente da Praia Grande, Santos, uma das áreas de coleta, foram utilizadas como branco da matriz para o processo de validação do método.

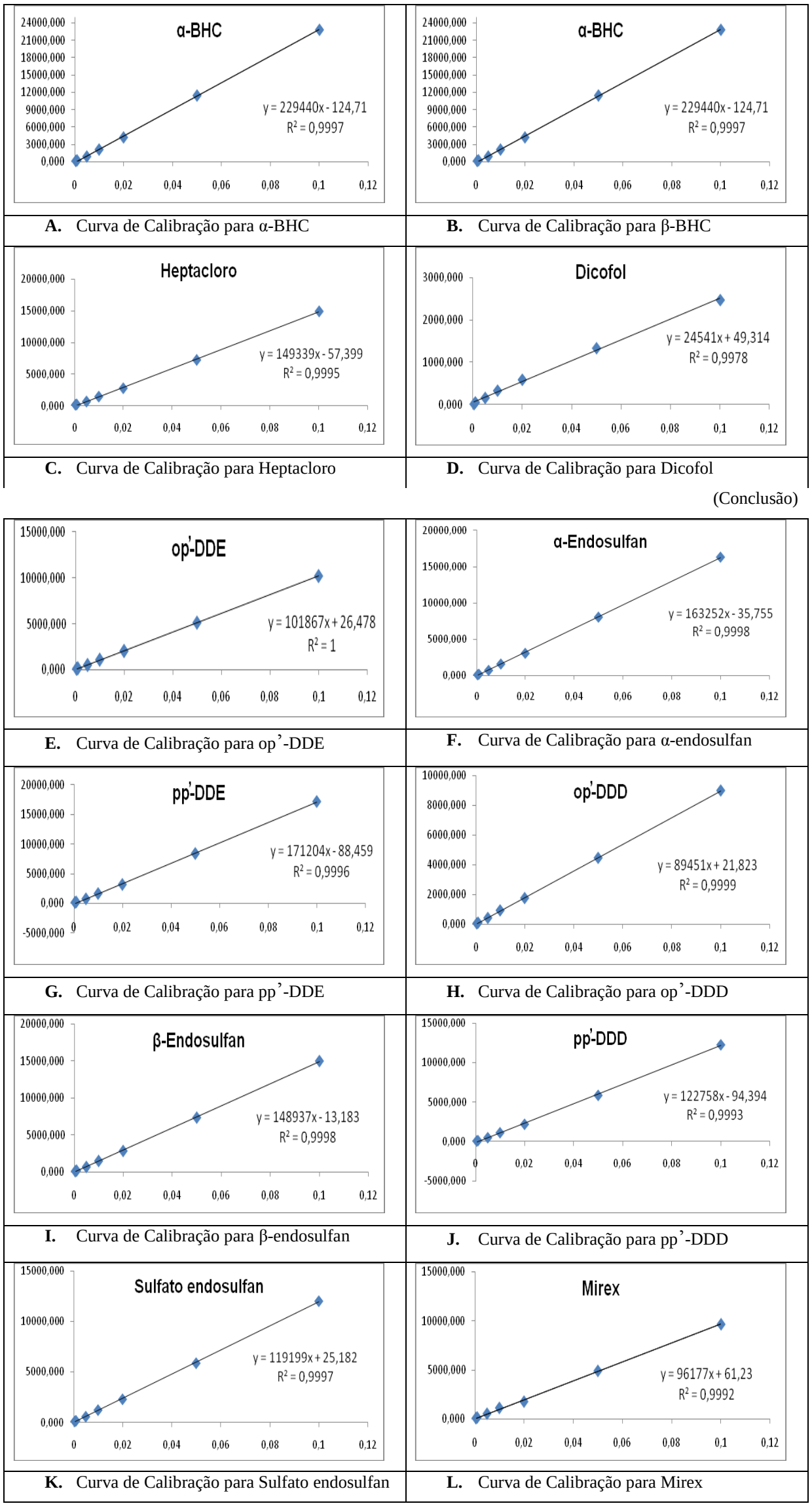
4.4.6.1 Análise da curva analítica

A curva analítica ou de calibração é construída para poder assegurar a extrapolação da resposta do cromatógrafo às concentrações dos analitos dentro de uma faixa apropriada. Assim, a curva de calibração para os pesticidas organoclorados foi feita em relação a sete pontos, nas concentrações de 0,0005, 0,001, 0,005, 0,01, 0,02, 0,05 e 0,1µg/mL.

Os dados obtidos foram transformados em gráficos, nos quais foi feita uma análise de correlação. Esta seria aceitável se $r^2 \geq 0.98$ (CRAM; POLITE, 2002 [7] apud CERÓN, 2004). Todos os compostos analisados no presente estudo seguiram este procedimento. As curvas de calibração para cada composto são apresentadas na figura 15.

[7] CRAM, S. P.; POLITE, L. N. **How to develop, validate, and troubleshoot G. C. and HLPC Methods**. CA. USA: American Chemical Society Short Course, Agilent Technologies, 2002.

Figura 15 - Curvas de calibração obtidas para cada um dos compostos em estudo



A. Curva de Calibração para α-BHC

B. Curva de Calibração para β-BHC

C. Curva de Calibração para Heptacloro

D. Curva de Calibração para Dicofol

(Conclusão)

E. Curva de Calibração para op'-DDE

F. Curva de Calibração para α-endosulfan

G. Curva de Calibração para pp'-DDE

H. Curva de Calibração para op'-DDD

I. Curva de Calibração para β-endosulfan

J. Curva de Calibração para pp'-DDD

K. Curva de Calibração para Sulfato endosulfan

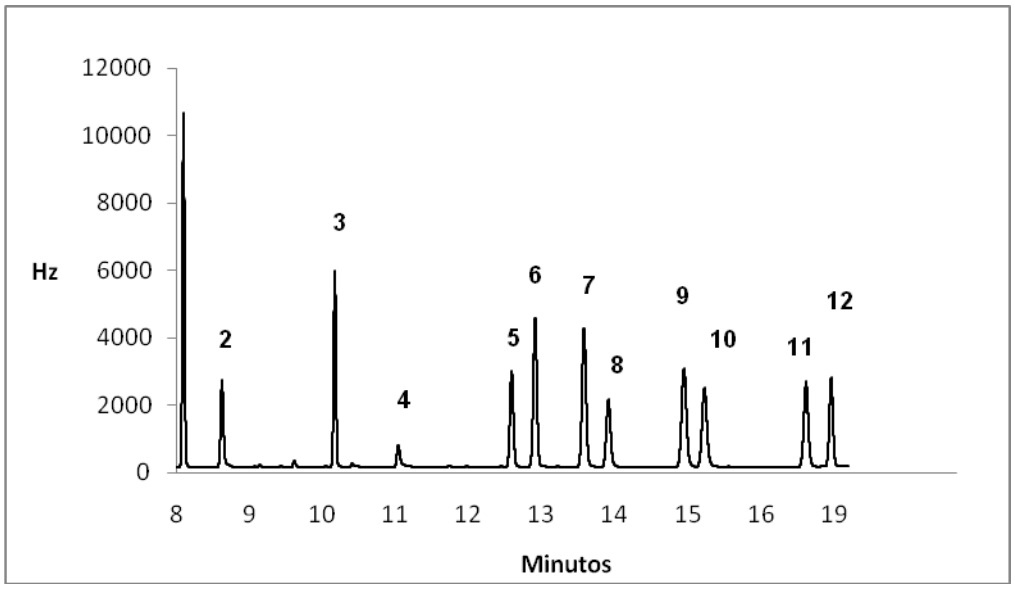
L. Curva de Calibração para Mirex

Além disso, para cada rodada de análises de amostras foi injetada uma curva de calibração.

Dois tipos diferentes de curvas de calibração foram preparados por uma série de diluições das soluções estoque, uma em tolueno e outra no extrato da matriz (tecido adiposo e tecido hepático). Este extrato foi obtido conforme os procedimentos analíticos, descritos no item preparo das amostras (4.4.5)

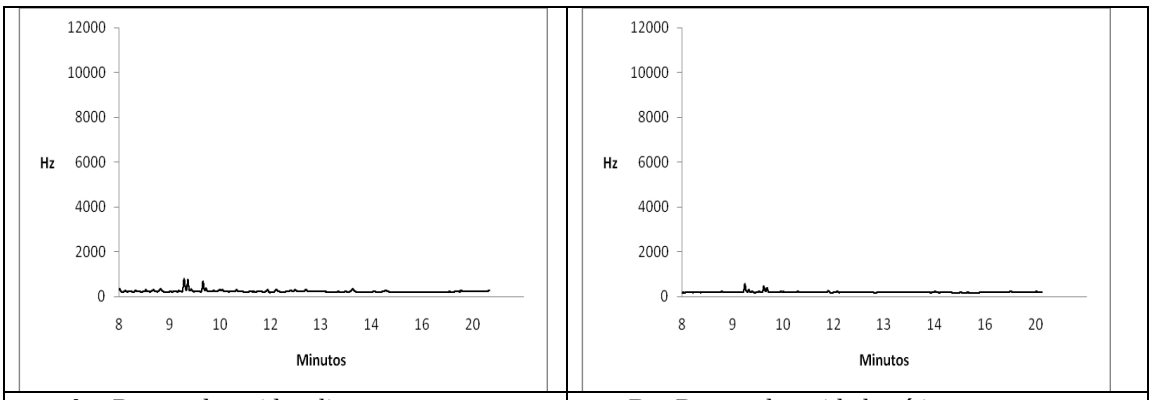
O cromatograma da curva no solvente com os doze agrotóxicos (Figura 16) mostra que houve uma separação eficiente para todos os compostos em estudo. Nos cromatogramas dos brancos das matrizes tecido adiposo (Figura 17-A) e tecido hepático (Figura 17-B) não são observados picos no tempo de retenção dos compostos em estudo o qual garante a seletividade do método.

Figura 16 - Cromatograma obtido no CG–µECD da curva de calibração no solvente na concentração de 0,1 µg mL^{-1}



Legenda: (1) α-BHC, (2) β-BHC, (3) Heptacloro, (4) Dicofol, (5) op'-DDE, (6) α-endosulfan, (7) pp'-DDE (8) op'-DDD, (9) β-endosulfan, (10) pp'-DDD, (11) Sulfato endosulfan (12) Mirex.

Figura 17 – Cromatogramas dos brancos



A. Branco de tecido adiposo | **B.** Branco de tecido hepático

4.4.7 Quantificação dos analitos nas amostras

A identificação dos pesticidas considerou os tempos de retenção dos picos no cromatograma. A quantificação dos compostos foi feita em relação à área dos picos dos padrões. A mesma foi realizada com curvas de calibração feitas no extrato da matriz. O coeficiente de correlação para todos os compostos estudados foram $r^2 \geq 0,99$. Os valores obtidos nas equações da reta para cada um dos compostos foram utilizados para o cálculo das recuperações. Para isto também foi realizada a marcha analítica na qual se determinou o fator de diluição que foi empregado na fórmula.

4.4.7.1 Avaliação do efeito matriz

Foi estudada pela comparação dos valores da inclinação das duas curvas de calibração feitas na matriz e no solvente. Incremento do sinal ocorre se a porcentagem da diferença entre as inclinações é positivo, e se for negativo existe supressão do sinal analítico. Dependendo do valor destas porcentagens, diferentes efeitos de matriz podem ser observados. Uma porcentagem entre -20% e 20% foi considerado como não existência de efeito matriz. Um efeito de matriz médio ocorre quando os valores estão entre -50% e -20% ou 20% e 50%, e um efeito forte da matriz seriam abaixo de -50% ou acima de 50% (FERNANDEZ-ALBA, 2004). As tabelas 2 e 3 apresentam os valores de efeito matriz para cada composto estudado.

4.4.7.2 Estudos de recuperação

Foram realizados fortificando 1 g de amostra de cada tecido, com a solução padrão dos pesticidas em dois níveis de fortificação: 6 $ng.g^{-1}$ e 60 $ng.g^{-1}$ (correspondentes aos LQs e 10 vezes estes valores). Os valores de recuperação foram estabelecidos para cada agrotóxico, com sete repetições para cada nível de fortificação. Depois da fortificação as amostras foram deixadas em repouso por uma hora e preparadas de acordo com o procedimento previamente descrito no item 4.4.5.

Nos experimentos de recuperações realizados nesses dois níveis se obtiveram recuperações que foram de 27,7% a 173,7% no tecido adiposo e de 47,7% a 186,2% no tecido hepático, mas que para a maioria dos compostos ficaram na ordem de 70 e 120%, valores que estão próximos dos parâmetros estabelecidos pela Comunidade Europeia e pelo Brasil (INMETRO, 2010). Na maior parte dos compostos analisados, os desvios padrões relativos das recuperações realizadas a zero e sete dias após foram $\leq$ 19% o qual mostra precisão e exatidão do método (INMETRO, 2010; EUROPEAN COMMISSION, 2012).

Os tempos de retenção (TR), limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) dos agrotóxicos analisados são apresentados nas tabelas que resumem a validação do método para cada um dos tecidos (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2 - Resultados da recuperação dos agrotóxicos estudados para matriz "Tecido Adiposo"

COMPOSTO	TEMPO DE RETENÇÃO (min)	EFEITO MATRIZ (%)	LD ng.g^{-1}	LQ ng.g^{-1}	RECUPERAÇÃO % (n:7)				REPETIÇÃO (n:7)	
					6 (ng.g^{-1})	DPR %	60 (ng.g^{-1})	DPR %	60 (ng.g^{-1})	DPR %
α-BHC	7,8	26,9	2	2,1	171,0	14,1	98,5	8,9	103,0	9,0
β-BHC	8,3	31,7	0,8	1,2	173,7	25,4	158,2	7,4	165,8	4,9
Heptacloro	9,9	32,8	3,1	5,3	148,2	26,0	65,5	6,6	68,2	18,1
Dicofol	10,7	42,1	1,3	1,6	27,7	20,1	130,5	8,1	115,2	10,9
op'-DDE	12,3	34,4	0,4	0,6	88,0	85,0	100,7	10,4	102,5	9,5
α-endosulfan	12,6	32,8	1,5	1,8	124,4	11,9	109,9	6,7	112,2	5,7
pp'-DDE	13,3	32,0	1,9	2	131,1	23,5	88,0	8,4	91,3	8,8
op'-DDD	13,6	31,2	0,4	0,9	116,8	53,4	121,5	5,9	123,3	6,3
β-endosulfan	14,7	31,1	0,5	0,6	129,6	6,2	120,5	3,7	125,7	4,1
pp'-DDD	14,9	31,5	0,5	0,6	152,9	21,7	110,5	5,9	110,2	6,1
Sulfato endosulfan	16,3	31,6	0,44	0,6	81,6	21,5	121,3	5,0	124,7	5,3
Mirex	19,4	39,0	1,4	2,4	103,6	112,5	58,4	17,2	90,7	74,8

Notas: Tempos de retenção (TR), limites de detecção (LD), limites de quantificação (LQ) e precisão DPR = Desvio padrão relativo.

Tabela 3 - Resultados da recuperação dos agrotóxicos estudados para matriz "Tecido hepático"

COMPOSTO	TEMPO DE RETENÇÃO (min)	EFEITO MATRIZ (%)	LD $ng.g^{-1}$	LQ $ng.g^{-1}$	RECUPERAÇÃO % (n:7)			REPETIÇÃO (n:7)		
					6 ($ng.g^{-1}$)	DPR %	60 ($ng.g^{-1}$)	DPR %	60 ($ng.g^{-1}$)	DPR %
α-BHC	7,8	26,8	2	2,1	180,7	15,2	74,9	27,5	77,3	27,6
β-BHC	8,3	30,9	0,8	1,2	80,1	69,0	134,2	13,8	132,6	18,5
Heptacloro	9,9	40,5	3,1	5,3	147,4	31,2	56,3	36,5	60,9	35,5
Dicofol	10,7	44,7	1,3	1,6	123,3	18,0	176,9	29,1	138,1	33,4
op'-DDE	12,3	30,3	0,4	0,6	151,8	38,6	107,8	13,0	111,5	14,4
α-endosulfan	12,6	31,1	1,5	1,8	146,5	14,4	108,9	8,7	114,1	10,1
pp'-DDE	13,3	29,8	1,9	2	132,2	5,8	93,5	10,5	96,4	11,3
op'-DDD	13,6	29,6	0,4	0,9	138,5	9,9	116,1	16,1	112,8	18,2
β-endosulfan	14,7	29,3	0,5	0,6	145,6	4,8	126,7	6,5	134,2	8,9
pp'-DDD	14,9	30,9	2,8	2,9	158,0	5,0	103,8	18,7	101,9	19,7
Sulfato endosulfan	16,3	26,4	0,4	0,6	186,2	16,0	124,6	8,3	117,4	12,1
Mirex	19,4	39,3	1,4	2,4	47,7	15,2	76,7	17,9	89,1	21,8

Notas: Tempos de retenção (TR), efeito matriz, limites de detecção (LD), limites de quantificação (LQ) e precisão DPR = Desvio padrão relativo.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As concentrações dos agrotóxicos clorados >LQ (acima do limite de quantificação) foram analisadas por composto (α-BHC, β-BHC, op'-DDE, pp'-DDE, op'-DDD, pp'-DDD, α-endosulfan, β-endosulfan, Sulfato endosulfan, Heptacloro, Dicofol, Mirex) e/ou agrupados por estrutura molecular: ΣHCH (α-BHC, β-BHC), ΣDDT (op'-DDE, pp'-DDE, op'-DDD, pp'-DDD), ΣEndosulfan (α-endosulfan, β-endosulfan, Sulfato endosulfan). A somatória de todos os contaminantes (ΣOCs) também foi avaliada.

As seguintes variáveis qualitativas foram analisadas para cada indivíduo: Localidade (Vitória, Praia Grande, Ubatuba), Contexto (Encalhe/Boiando, Pesca, Reabilitação), Sexo (Macho, Fêmea), Fibropapilomatose (Presente, Ausente), Escore de severidade da fibropapilomatose (FPS: Leve, Moderada, Severa), Presença de cada contaminante ou grupo de contaminantes em níveis superiores ao limite de quantificação nos tecidos hepático e adiposo (Presente, Ausente). As seguintes variáveis quantitativas foram analisadas para cada indivíduo: Massa, em kg; Comprimento Curvilíneo da Carapaça (CCC) em cm; Índice de Condição Corporal (ICC), em kg/cm^3; Índice da Fibropapilomatose (FPI); Fração de lipídeos nos tecidos hepático e adiposo, em %; Concentração de cada contaminante ou grupo de contaminantes nos tecidos hepático e adiposo, em $ng.g^{-1}$ peso úmido; Concentração total de contaminantes (ΣOCs) nos tecidos hepático e adiposo, em $ng.g^{-1}$ peso úmido.

Média, desvio-padrão (D.P.), mínimo, primeiro quartil (Q_1), mediana, terceiro quartil (Q_3) e máximo foram utilizados para descrever a distribuição dos dados. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para testar se os dados apresentavam distribuição normal.

Análises de regressão linear foram utilizadas para avaliar a correlação entre duas variáveis quantitativas: (1) Massa *vs.* Fração de lipídeos, (2) ICC *vs.* Fração de lipídeos, (3) Concentração de cada contaminante no tecido hepático *vs.* Concentração de cada contaminante no tecido adiposo, (4) ΣOCs *vs.* CCC, (5) ΣOCs *vs.* ICC, (6) ΣOCs *vs.* FPI.

Modelos lineares generalizados (*GLM – General Linear Model*) foram utilizados para analisar a relevância de diferentes fatores do histórico individual (Localidade, Contexto, Sexo, Fibropapilomatose) sobre a concentração de cada contaminante ou grupo de contaminantes nos tecidos hepático e adiposo. Comparações *post-hoc* de Tukey foram utilizadas para identificar diferenças entre categorias para os fatores que apresentaram significância nos modelos.

Teste Qui-Quadrado ou Teste exato de Fisher foram utilizados para comparar se diferentes fatores do histórico individual (Localidade, Contexto, Sexo, Fibropapilomatose) apresentavam diferenças na presença de cada contaminante ou grupo de contaminantes em níveis superiores ao limite de quantificação nos tecidos hepático e adiposo.

Testes de Mann-Whitney foram utilizados para comparar a concentração total de contaminantes (ΣOCs) entre indivíduos com presença ou ausência de fibropapilomatose, tanto para o tecido adiposo quanto hepático. Testes de Kruskal-Wallis foram utilizados para comparar a concentração total de contaminantes (ΣOCs) entre indivíduos com diferentes escores de fibropapilomatose (FPS).

O nível de significância (alfa) foi de 0,05 para todos os testes. Nas análises de regressão, a intensidade da correlação foi classificada em função do valor de R^2: “fraca” se $R^2 < 0,4$, “moderada” se $0,4 < R^2 < 0,6$, “forte” se $0,6 < R^2 < 0,8$, e “muito intensa” se $R^2 > 0,8$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este estudo, realizado com 64 animais, proporciona a visão mais abrangente no que se refere à contaminação por POCs em tartarugas-verdes na costa brasileira. Os estudos que relatam concentrações de contaminantes em tecidos de tartarugas marinhas são limitados e muito dispersos entre os tipos de contaminantes, localização geográfica, espécies e tecidos (KELLER et al., 2004b). Para uma revisão completa, veja Pugh e Becker (2001). Esse fato torna de caráter complexo as comparações entre o presente estudo e os disponíveis na literatura. Por exemplo, alguns estudos analisaram vários tecidos em diversas espécies de quelônios com faixas etárias e condições de amostragem diferentes (indivíduos vivos ou mortos, em circunstâncias variadas (RYBITSKI; HALE; MUSICK, 1995; CORSOLINI; AURIGI; FOCARDI, 2000; STORELLI; MARCOTRIGIANO, 2000; GARDNER et al., 2003; KELLER et al., 2004b; INNIS et al., 2008; KELLER et al., 2004a; MONAGAS et al., 2008; SWARTHOUT et al., 2010; VAN DE MERWE et al., 2010; LAZAR et al., 2011; KOMOROSKE et al., 2011; LABRADA-MARTAGÓN et al., 2011; MALARVANNAN et al., 2011; RAGLAND et al., 2011; IKONOMOPOULOU; HODGE; WHITTIER, 2012). Além das diferenças nas condições de processamento e análise amostral (utilização de metodologias não padronizadas para as tartarugas marinhas), podemos citar alguns trabalhos realizados com pequeno grupo amostral e de espécies diferentes: 4 indivíduos (CORSOLINI; AURIGI; FOCARDI, 2000); 9 indivíduos (GARDNER et al., 2003); 12 indivíduos (MALARVANNAN et al., 2011).

5.1 PADRÃO DE DISTRIBUIÇÃO DE OCs NOS TECIDOS

No tecido adiposo, as concentrações ($ng.g^{-1}$) de pesticidas seguiram a ordem: Dicofol > Heptacloro > α-endosulfan > op'-DDD > β-BHC > Mirex > op'-DDE > Sulfato endosulfan > β-endosulfan > pp'-DDE > α-BHC > pp'-DDD. Ao se analisar a ocorrência destes compostos por grupos, maiores concentrações ($ng.g^{-1}$) foram encontradas para ΣHCH (somatória de α-BHC e β-BHC), seguida de ΣDDT (somatória de op'-DDE, pp'-DDE, op'-DDD e pp'-DDD) e, por último, ΣEndosulfan (somatória de α-endosulfan, β-endosulfan e Sulfato endosulfan). As concentrações ($ng.g^{-1}$) da somatória de todos os pesticidas

monitorados (ΣOCS) foram de 103,871±290,447, com um valor máximo de 2150,083. Já no tecido hepático, as concentrações ($ng.g^{-1}$) seguiram a ordem: Mirex > Dicofol > Heptacloro > α-endosulfan > Sulfato endosulfan > op'-DDE> op'-DDD > pp'-DDD > β-endosulfan > pp'-DDE > β-BHC > α-BHC. Na análise grupal, obteve-se a seguinte resposta: ΣEndosulfan > ΣHCH > ΣDDT, e a máxima concentração ($ng.g^{-1}$) foi encontrada na ΣEndosulfan. As concentrações ($ng.g^{-1}$) da ΣOCS (54,361±99,328) foram menores no tecido hepático quando comparado ao tecido adiposo. O valor máximo ($ng.g^{-1}$) da ΣOCS (642,953) também foi menor no tecido hepático. A estatística descritiva para ambos os tecidos encontra-se disponível nos apêndices.

Uma grande variação foi observada por Keller et al. (2004b) entre indivíduos. Em termos gerais, no presente estudo, as concentrações de POPs nos tecidos de *C. mydas* variaram consideravelmente em relação à localidade, ao contexto e ao sexo (SÁNCHEZ-SARMIENTO et al., 2013a) e quando comparadas às concentrações relatadas por outros estudos (Tabelas 4 e 5).

O alto grau de variação encontrado neste estudo pode ser atribuído a fatores bióticos e abióticos, espaciais e temporais, entre os quais se destacariam condição corporal, estado de saúde, idade, sexo, localização geográfica, origem populacional, aspectos biológicos da espécie (hábitos alimentares, comportamento migratório) e metabolismo dos xenobióticos (transformação ou vias de eliminação), propriedades físico-químicas dos compostos, exposição recente e altos níveis de exposição (grau de exposição) podem ter influenciado a dinâmica dos mesmos além dos fatores relacionados às técnicas analíticas aplicadas (% recuperação e tipo de matriz). Deve-se, também, levar em consideração que as metodologias de análise não são padronizadas para as tartarugas marinhas e que há diversas metodologias empregadas para análise desses compostos. Todas essas variáveis tornam difícil inferir qual delas influenciaria em maior escala a carga de contaminantes. Estes e outros fatores serão mais bem abordados no decorrer desta seção.

Tabela 4 - Comparação das concentrações dos pesticidas clorados nos tecidos adiposo e hepático de diversas espécies de tartarugas marinhas relatadas na literatura *vs.* as concentrações encontradas no presente estudo

Localidade	**Espécie/ Maturidade**	**Tecido (n)**	**op'-DDT**	**op'-DDE**	**op'-DDD**	**pp'-DDT**	**pp'-DDE**	**pp'-DDD**	**ΣDDT**	**Fonte**
Flórida, EUA	*C. caretta*	T. hepático (9)					2-100		<0,1-51	(MCKIM JR; JOHNSON, 1983)
	C. mydas	T. hepático (4)					<10			
Havaí, EUA	*C. mydas*	T. adiposo (10)	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD		(AGUIRRE et al., 1994a)
Long Island, EUA	*L. kempii*	T. hepático (22)					29,8-547			(LAKE et al., 1994)
		T. adiposo (13)					64,1-720			
Atlântico Ocidental, Carolina do Norte, Virgínia, EUA	*C. caretta*	T. hepático (18)				<LD-3,44	<LD-458	<LD-4,08	<2-458	(RYBITSKI; HALE; MUSICK, 1995)
		T. adiposo (20)				<LD-10,8	2,86-1210	<LD-35,6	206±268 (6,1-1224)	
	L. kempii	T. hepático (3)				<LD	54,2-56,8	4,94-11,4		
		T. adiposo (3)				<LD-5,19	95,7-292	15,5-42,1		
Mar Mediterrâneo do Leste	*C. caretta, diversos*	T. hepático (4)				<0,5-<0,7	49-76	<0,2-<0,5	49-77	(MCKENZIE et al., 1999)
		T. adiposo (3)				<2-8	376-705	<1,8-<6,6	(391-739)	
	C. mydas	T. hepático (9)					<1-21			
		T. adiposo (3)					2,4-19			
Escócia	*C. caretta, diversos*	T. hepático (1)				-	149	-	152	
	D. coriacea, diversos	T. hepático (2)				<0,6-<0,7	1,7-6,5	<0,6-<0,7	9,1-14	
		T. adiposo (2)				<3,2-<6,2	10-57	<6,2-<8,1	14-58	
Mar Adriático do Sul, Itália	*C.caretta, Juvenis*	T. hepático (5)	<LD		<LD	<LD	1420±250 (1150-1810)*	<LD		(STORELLI; MARCOTRIGIANO, 2000)
	C.caretta, Fêmeas adultas	T. hepático (6)	<LD		<LD	<LD	410±250 (250-460)*	<LD		
Península da Baixa Califórnia, México	*C. mydas agassizii*	T. hepático (7)							ND-7,8[a]	(GARDNER et al., 2003)
		T. adiposo (7)							ND-12,2 [a]	
	L. olivacea	T. hepático (1)							10,4[a]	
		T. adiposo (1)							5,1[a]	
	C. caretta	T. hepático (1)							ND	
		T. adiposo (1)							ND	
Carolina do Norte	*C. caretta*	T. adiposo (44)	7,03±13,1* 25%				445±643*93,18%	<LD	452±643 *93,18%	(KELLER et al., 2004b)
	L. kempii	T. adiposo amarelo (10)					154±111 * 90%	2,76±4,58 * 40%	156±113 *90%	
		T. adiposo marrom (10)					254±332 * 100%	2,96±5,11 * 50%	257±332 * 100%	
Atlântico Ocidental, Core Sound, Carolina do Norte, EUA	*C. caretta*, Juvenis	T. adiposo (44)							67±68,7 (<LD-287)	(KELLER et al., 2004a)
Mar Adriático	*C. caretta*	T. hepático (11)	11,6 (<LD-21,7)			19,6(<LD-70,6)	40,6 (3,6-217,3)	16,9 (<LD-61,2)		(PERUGINI et al., 2006)
		T. adiposo (11)	9,5 (<LD-9,5)			32,9 (<LD-52)	280,9 (1,5-621)	26,2 (<LD-39,6)		
Mar Adriático	*C. caretta*	T. hepático (19)							18,27±18,40 (2,32-73,61)	(STORELLI; BARONE; MARCOTRIGIANO, 2007)
Ilhas Canárias, Espanha	*C. caretta Machos, fêmeas e juvenis*	T. hepático (23)	22,20±63,72 (<LD-250,92) 17,39%	2,78±7,74 (<LD-26,24) 13,04%	48,78±166,52 (<LD-798,79) 30,43%				73,77±174,60 (<LD-810,85) 43,47%	(MONAGAS et al., 2008)
		T. adiposo (23)	23,99±71,23 (<LD-327,22) 21,73%	<LD	6,79±25,58 (<LD-121,78) 13,04%				30,75±95,33 (<LD-449,01) 26,8%	
Cape Cod, Massachusetts, EUA	*L. kempii, Juvenis*	T. hepático (3)				ND (n=3)	<LD(n=1), 14 (n=1), 15 (n=1)	ND (n=2), <LQ; 10 (n=1)		(INNIS et al., 2008)
Gold Coast, Austrália	*C. mydas*	T. hepático (16)					0,0355±0,0137 (<LOD-0,1144) 68,75%			(VAN DE MERWE et al., 2010)
Mar Adriático do Leste (Eslovênia, Croácia)	*C. caretta*	T. adiposo (27)				13±13,9/8,7 (<LD-59) 89%	92,4±53/81 (19,1-282) 100%	7±11,1 /3,9 (<LD-51,1) 96%	112,5±72,3/96,4 (39,3-393) 100%	(LAZAR et al., 2011)
Ilha Ishigaki e Kochi, Japão	*C. mydas*	T. hepático(5)							0,008-0,27	(MALARVANNAN et al., 2011)
	E. imbricata	T. hepático (3)							0,56-9	
	C. caretta	T. hepático (4)							2-3,8/1,7-2,4	
Costa Sudeste do Brasil	*C. mydas*, juvenis	T. hepático (64)		10,744±8,195 (0,814-29,211) 14,06%>LQ	10,297±4,626 (2,639-13,948) 9,37%>LQ		6,435±3,768 (2,042-13,478) 23,43%>LQ	8,456±3,253 (6,156-10,756) 3,12%>LQ	4,249±8,503 (0-39,511)	Presente estudo
		T. adiposo (51)		10,145±13,451 (0,747-34,915) 11,76%>LQ	13,876±15,483 (0,964-41,296) 23,52%>LQ		7,007±4,873 (1,978-20,914) 50,98%>LQ	4,233 1,96%>LQ	8,114±13,723 (0-69,253)	

Nota: Resultados expressos em média ou mediana e/ou intervalo (mín.-máx.) $ng.g^{-1}$ peso úmido. NA: Não analisado; ND: Não detectado; <LD: Abaixo do limite de detecção; %: porcentagem de tartarugas com resíduos de pesticidas detectados (% Detecção); % >LQ: porcentagem de tartarugas com resíduos de pesticidas acima do limite de quantificação [a]ΣDDT= op'-DDD, pp'-DDD, op'-DDE, pp'-DDE, op'-DDT, pp'-DDT. *Resultados expressos em $ng.g^{-1}$ peso lipídico. Adaptado de Monagas et al. (2008). Os dados ou estão disponíveis na literatura ou foram calculados a partir da fonte.

Tabela 5. Comparação das concentrações dos pesticidas clorados nos tecidos adiposo e hepático de diversas espécies de tartarugas marinhas relatadas na literatura *vs.* as encontradas no presente estudo.

Localidade	Espécie/ Maturidade	Tecido (n)	Composto								Fonte
			α-BHC	β-BHC	α-endosulfan	β-endosulfan	Sulfato endosulfan	Heptacloro	Mirex	Dicofol	
Península da Baixa Califórnia, México	*C. mydas agassizii*	T. hepático (7)			<LD	ND		ND-10,4[a]	<LD		(GARDNER, SUSAN C. et al., 2003)
		T. adiposo (7)			<LD	ND-7,8		ND-65,1 [a]	<LD		
	L. olivacea	T. hepático (1)			<LD	32		45,3 [a]			
		T. adiposo (1)			<LD	ND		8,1 [a]			
	C. caretta	T. hepático (1)			<LD	3,9		ND			
		T. adiposo (1)			<LD	ND		ND			
Carolina do Norte	*C. caretta*	T. adiposo (44)	0,270±1,46* 4,55%	0,358±1,03* 11,36%					43,7±62,1* 88,63%		(KELLER et al., 2004b)
	L. kempii	T. adiposo amarelo (10)	6,09±4,59* 70%	50,8±100* 50%					5,26±6,82* 60%		
		T. adiposo marrom (10)	10,2±15,8* 70%	41,4±68,6* 80%					5,34±6,13* 70%		
Atlântico Ocidental – Core Sound, Carolina do Norte, EUA	*C. caretta*, juvenis	T. adiposo (44)							4,41±4,17 (<LD-18,8)		(KELLER et al., 2004a)
Cape Cod, Massachusetts, EUA	*L. kempii, Juvenis*	T. hepático (3)	ND	ND	ND	ND	ND	ND			(INNIS et al., 2008)
Gold Coast, Austrália	*C. mydas*	T. hepático (16)	0,0247±0,0118 (<LOD-0,0922) 62,5%	0,1065±0,0559 (0,0151-0,5861) 100%	<LOD				0,07351±0,03528 (0,00592-0,35739) 100%		(VAN DE MERWE et al., 2010)
Mar Adriático do Leste	*C. caretta*	T. adiposo (27)	0,5±0,3/0,4 (<LD-1,2) 89%								(LAZAR et al., 2011)
Costa Sudeste do Brasil	*C. mydas*, juvenis	T. hepático (64)	5,073±2,041 (2,246-13,356) 76,56%>LQ	6,016±5,424 (1,230-25,952) 48,43%>LQ	17,248±28,083 (2,579-111,157) 28,12%>LQ	8,049±8,363 (0,770-28,016) 12,5%>LQ	14,819±30,285 (1,102-89,424) 12,5%>LQ	18,022±12,433 (5,369-54,436) 56,25%>LQ	31,596±32,140 (2,012-93,903) 23,43%>LQ	88,922±175,810 (2,660-597,458) 20,31%>LQ	Presente estudo
		T. adiposo (51)	6,667±6,881 (2,120-48,061) 84,31%>LQ	13,105±8,053 (2,338-33,931) 84,31%>LQ	14,921±36,847 (1,900-136,350) 25,49%>LQ	9,504±14,411 (0,751-38,639) 11,76%>LQ	9,520±16,426 (0,825-61,796) 29,41%>LQ	21,263±15,301 (6,256-69,921) 82,35%>LQ	251,154±541,139 (4,225-2141,058) 31,37%>LQ	13,068±5,970 (4,999-19,569) 11,76%>LQ	

Nota: Resultados expressos em média ou mediana e/ou intervalo (mín.-máx) $ng.g^{-1}$ peso úmido. NA: Não analisado; ND: Não detectado; <LD: Abaixo do limite de deteção; %: porcentagem de tartarugas com resíduos de pesticidas detectados (% Detecção); % >LQ: porcentagem de tartarugas com resíduos de pesticidas acima do limite de quantificação; [a] Σchlordanos = heptacloro, heptacloro epóxido, *cis*-chlordane, *trans*-chlordane, *cis*-nonachlor, *trans*-nonachlor e oxychlordane*. Resultados expressos em $ng.g^{-1}$ peso lipídico. Os dados são referidos como disponíveis na literatura ou foram calculados a partir da fonte.

Dentre os OCs, estuda-se, com maior frequência, o grupo do Diclorodifeniltricloroetano (DDT). Neste estudo, o metabólito encontrado em maior número de indivíduos desse grupo foi o pp'-DDE, e o metabólito encontrado em menor proporção correspondeu ao pp'-DDD (Tabela 4). A tendência do pp'-DDE ser o metabólito predominante tem sido verificada em outros estudos e ele chega a representar 80% dos DDTs (LAZAR et al., 2011). O pp'-DDE é o pesticida presente em maiores concentrações nas tartarugas marinhas devido à sua natureza altamente persistente (LAKE et al., 1994; RYBITSKI; HALE; MUSICK, 1995; MCKENZIE et al., 1999; STORELLI; MARCOTRIGIANO, 2000; KELLER et al., 2004a; STORELLI; BARONE; MARCOTRIGIANO, 2007; MONAGAS et al., 2008). No entanto, diferentes padrões de distribuição dos DDTs também foram vistos, por exemplo, em *C. caretta*; op'-DDD > op'-DDT > op'-DDE no tecido hepático e op'-DDT > op'-DDD e op'-DDE (ND) no tecido adiposo (MONAGAS et al., 2008). Em *C. mydas agassizzi*, *L. olivacea* e *C. caretta*, pp'-DDD foi o maior contribuinte à ΣDDT e op'-DDE não foi detectado (GARDNER et al., 2003). Essas diferenças podem significar capacidade metabólica espécie-específica e/ou exposição específica em condições redutivas de anóxia (MONAGAS et al., 2008).

Outro fator a ser considerado é que, nos tecidos adiposo e hepático, alguns pesticidas podem se bioacumular, atingindo altas concentrações, e persistir por um longo período no corpo do animal (p. ex., Diclorodifeniltricloroetano (DDT) e seus metabólitos (MILTON; LUTZ, 1997). Isto se deve às propriedades físico-químicas com elevado coeficiente de partição octanol/água ($Log\ K_{ow}$) > 5 para compostos como pp'-DDE (6,5) e Mirex (7,01) (SOLLA, 2010), já que equivaleria a um maior grau de lipofilicidade e consequentemente, a uma maior tendência em se acumular no organismo (MIRANDA-FILHO; CARMELA MONTONE; FILLMANN, 2008), o que explicaria parcialmente os resultados (ver tabelas 4 e 5). Entretanto, fatores relativos à exposição ao produto (tempo e dose), informações na sua maioria desconhecidas para este tipo de estudo, devem ser consideradas quando obtidas. No presente estudo, devem ser consideradas quando obtidas. No presente estudo, o fato de não ter analisado todos os isômeros para alguns dos compostos como o DDT (não foram analisados op'-DDT e pp'-DDT) não permite inferir se essa exposição foi recente ou não.

Dentre os pesticidas organoclorados, os monitorados e detectados com maior frequência tanto neste estudo quanto em diversos autores são Mirex, Heptacloro e HCHs. Nos resultados relatados aqui *vs.* os disponíveis na literatura, foram observadas maiores concentrações para α e β-endosulfan e Mirex, concentrações similares para o Heptacloro e concentrações menores ou maiores para o α e β-endosulfan (Tabela 5). Não há, disponíveis na

literatura, outras informações sobre as concentrações de alguns dos pesticidas aqui pesquisados. Talvez isso se deva ao fato de não terem sido pesquisados ou, então, foram pesquisados, mas não foram detectados.

Obter o perfil de alguns pesticidas é mais complicado em alguns tipos de matriz devido às baixas concentrações detectadas nas amostras, que estão, usualmente, abaixo dos Limites de Quantificação (LQ) ou de Detecção (LD). Outros problemas podem estar relacionados aos fatores analíticos, como a variação nas % de recuperação, que, nos ovos, pode ser de 18 a 62% em comparação com o sangue, em que pode chegar a mais de 90%. A extração de poluentes orgânicos pode ser trabalhosa particularmente em matrizes complexas com alto teor de lipídeos e proteínas, e os métodos utilizados provavelmente requerem algumas adaptações. Outra dificuldade está na variabilidade de métodos analíticos, porcentagens de recuperação obtidas e falta de informações sobre os procedimentos disponibilizados na literatura (IKONOMOPOULOU; HODGE; WHITTIER, 2012).

Outra causa potencial da variação entre resultados de estudos diversos é a amostragem, uma vez que a matriz ou tipo de tecido selecionado e estado do mesmo podem acarretar diferenças. Os resultados obtidos com amostras sanguíneas refletem uma exposição recente a toxinas (LABRADA-MARTAGÓN et al., 2011). Por esse motivo, alguns estudos como, por exemplo, os realizados em matrizes como sangue ou ovos (SWARTHOUT et al., 2010; KOMOROSKE et al., 2011; LABRADA-MARTAGÓN et al., 2011; RAGLAND et al., 2011; IKONOMOPOULOU; HODGE; WHITTIER, 2012) não foram considerados na discussão. Tecidos provenientes de carcaças de animais que vieram a óbito por alguma doença poderiam ter maiores concentrações de OCs que animais vivos e aparentemente saudáveis, portanto, a utilização desse tipo de matriz poderia complicar a interpretação dos dados (KELLER et al., 2004b). Desta maneira, os resultados obtidos no presente estudo devem ser interpretados com cuidado, pois algumas amostras vieram de animais encalhados, às vezes em condições corporais pobres e desconhecendo-se a data exata e causa do óbito. Contudo, considerando que as tartarugas marinhas são espécies ameaçadas e a obtenção de amostras costuma ser oportunista, optou-se por dar um maior aproveitamento utilizando amostras de animais avaliados como com óbitos mais recentes (mais “frescos”). Estudos futuros examinarão mais de perto a influência disto sobre os resultados.

5.2 RELAÇÃO ENTRE PORCENTAGEM DE LIPÍDEOS E A CONDIÇÃO DO ANIMAL

Houve significativa correlação entre a massa corpórea do animal e a porcentagem de lipídeos no tecido adiposo ($P<0,0001$, $R^2=0,5385$) e no tecido hepático ($P=0,0009$, $R^2=0,2786$) (Figura 18), assim como entre o índice de condição corporal (ICC) e a porcentagem de lipídeos no tecido adiposo ($P<0,0001$, $R^2=0,4355$) e no tecido hepático ($P=0,0490$, $R^2=0,1093$) (Figura 19). Sendo a condição corporal importante para avaliar o estado geral do animal – e também a perda ou ganho de massa corpórea, uma vez que os lipídeos são mobilizados a partir dos tecidos de depósito ou vice-versa, podendo alterar drasticamente as concentrações dos contaminantes –, poder-se-ia esperar que animais com melhor condição corporal e maior porcentagem de lipídeos apresentassem maiores cargas de contaminantes (ROUTTI et al., 2010). O principal fator biótico que pode influenciar a toxicidade de um composto lipofílico é o conteúdo lipídico do organismo. Animais com altos conteúdos de lipídeos podem acumular e tolerar maiores concentrações de compostos químicos, pois os poluentes lipofílicos são armazenados no tecido adiposo e, por isso, estão menos disponíveis para atingir órgãos e receptores. Em contraste, animais emaciados, que teriam mobilizado suas reservas lipídicas, estariam mais suscetíveis aos efeitos tóxicos, como resultado da remobilização de poluentes (GEYER et al., 1994[8] apud RYBITSKI; HALE; MUSICK, 1995, p. 383).

[8] GEYER, H. J. et al. The relevance of aquatic organisms lipid content to the toxicity of lipophilic chemicals: toxicity of lindane to different fish species". **Ibid.**, v. 28, p. 53-70, 1994.

Figura 18 - Correlação entre a massa corpórea e a porcentagem de lipídeos nos tecidos adiposo e hepático

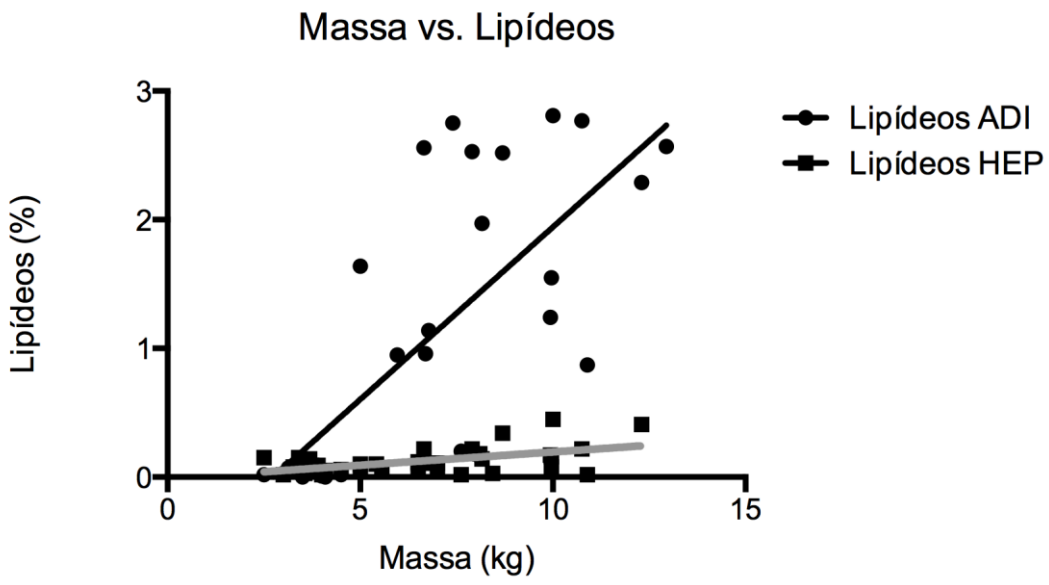
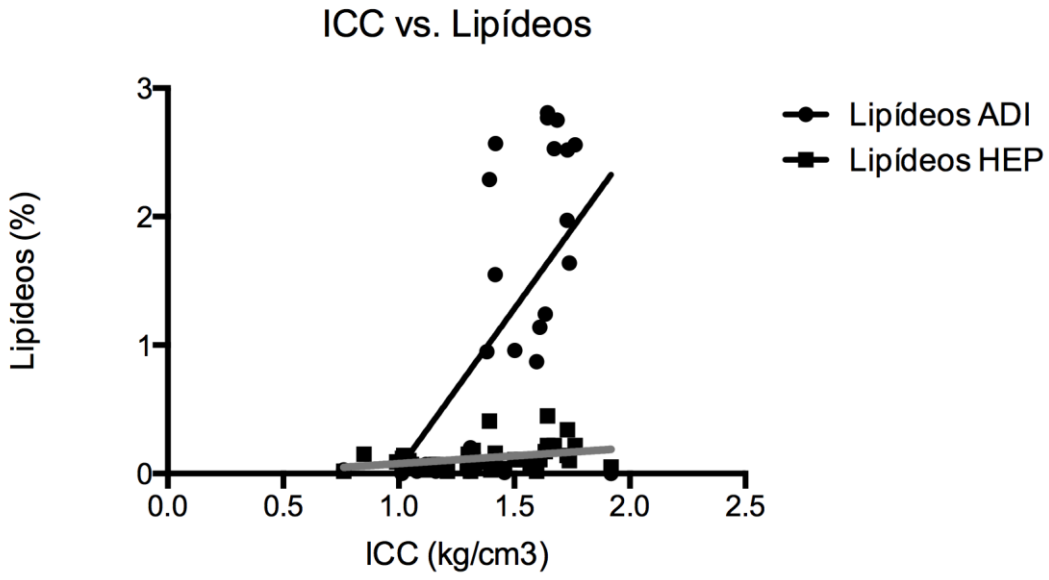


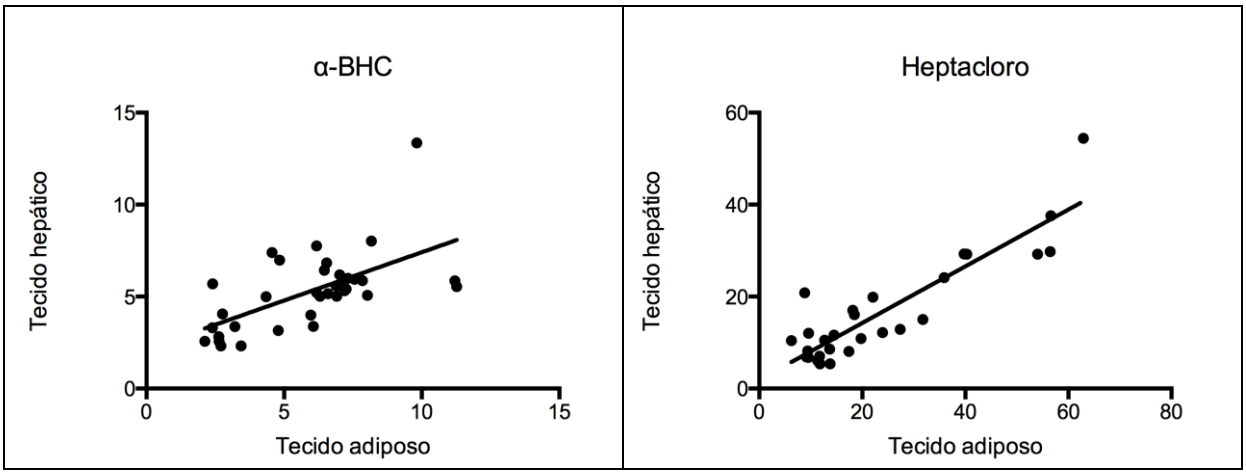
Figura 19 - Correlação entre o ICC e a porcentagem de lipídeos para ambos os tecidos



5.3 COMPARAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DOS OCs NOS TECIDOS ADIPOSO E HEPÁTICO

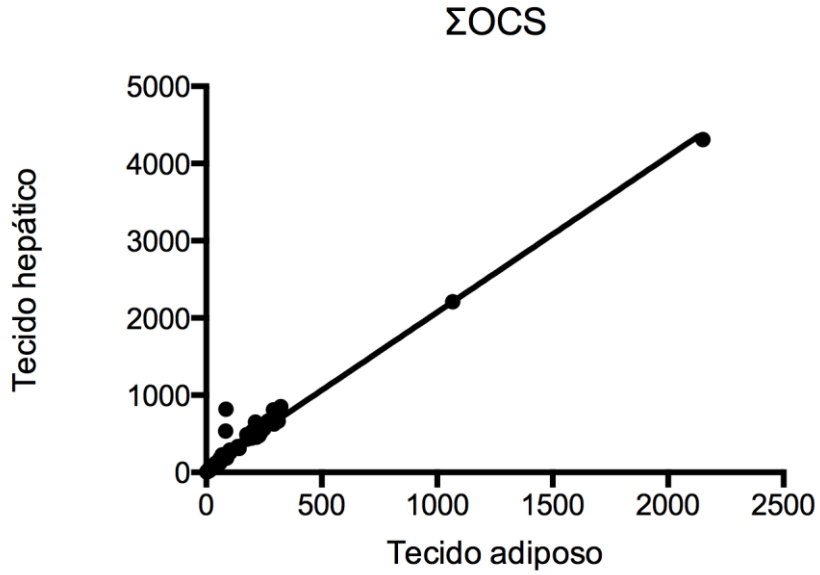
Houve uma correlação significativa entre a porcentagem lipídica das amostras de tecido adiposo e hepático (P<0,0001, R^2=0,5859) e entre as concentrações do tecido adiposo e hepático de α-BHC (P=0,0001, R^2=0,3672) e de Heptacloro (P<0,0001, R^2=0,7984) (Figura 20). Esta última, porém, não foi significativa para β-BHC (P=0,2771), pp'-DDE (P=0,7222), α-endosulfan (P=0,6350), Sulfato endosulfan (P=0,2951), Dicofol (P=0,5155) e Mirex (P=0,9734), e também não pôde ser testada para op'-DDE, op'-DDD, pp'-DDD e β-endosulfan, devido à insuficiência de animais com concentrações quantificáveis em ambos os tecidos.

Figura 20 - Correlação entre as concentrações nos tecidos adiposo e hepático dos pesticidas α-BHC e Heptacloro



Com relação aos grupos de pesticida, houve correlação significativa entre as concentrações dos tecidos adiposo e hepático para ΣOCS (P<0,0001, R^2=0,9733) (Figura 21). Por outro lado, a correlação não foi significativa para ΣHCH (P=0,305, R^2=0,0920), ΣDDT (P=0,2940) e ΣEndosulfan (P=0,6546).

Figura 21 - Correlação entre as concentrações nos tecidos adiposo e hepático de ΣOCS



Os POPs têm acumulação de tecido específica em função das variáveis físico-químicas dos diferentes compostos que afetam sua assimilação e metabolização em tecidos diversos (VAN DE MERWE et al., 2010). O tecido adiposo teria o maior conteúdo lipídico e a maior porcentagem de triglicerídeos, o que sugere que este seja o tecido preferencial para monitorar a contaminação por OCs nas tartarugas marinhas (RYBITSKI; HALE; MUSICK, 1995). Além disso, as concentrações dos contaminantes no tecido adiposo são menos influenciáveis que no sangue, se forem considerados, por exemplo, processos como migração, reprodução e disfunção na saúde dos animais (KELLER et al., 2004b).

Sendo assim, o padrão relatado para a distribuição de OCs, como os DDTs em tecidos de tartarugas marinhas, apresentaria a seguinte tendência: tecido adiposo > tecido hepático > tecido muscular (RYBITSKI; HALE; MUSICK, 1995; MCKENZIE et al., 1999), conforme observado neste estudo, em que as maiores concentrações foram descritas para o tecido adiposo. No entanto, em um estudo realizado com animais que apresentavam caquexia severa, as maiores concentrações de ΣDDT foram encontradas no tecido hepático e não no tecido adiposo, o que indica que as tartarugas teriam passado por um período prévio de remobilização de lipídeos e de contaminantes (MONAGAS et al., 2008). Essa tendência também foi observada no estudo desenvolvido com *C. mydas* na Austrália, em que o tecido hepático apresentou as maiores concentrações detectáveis de POPs em peso úmido (37%) (VAN DE MERWE et al., 2010).

No presente estudo, puderam-se observar correlações nas concentrações de OCs nos tecidos adiposo e hepático conforme descritas por Keller et al. (2004a) em *C. caretta*, e no estudo realizado por Gardner et al. (2003) com *C. mydas*, *C. caretta* e *L. olivacea*, no Oceano Pacífico. Os compostos lipofílicos seriam sequestrados da circulação sanguínea e depositados, preferencialmente, nos tecidos com alto teor de gordura, podendo ser remobilizados quando os depósitos de gordura são reduzidos por demanda energética ou situações adversas à saúde (RAGLAND et al., 2011).

5.4 RELAÇÃO ENTRE OS ORGANOCLORADOS E HISTÓRICO DO ANIMAL (QUANTITATIVO)

Modelos lineares generalizados (GLM – *General Linear Model*) foram utilizados para analisar a relevância de diferentes fatores do histórico individual sobre a concentração de cada pesticida: localidade (Vitória/ES, Praia Grande/SP, Ubatuba/SP); contexto (encalhe ou boiando, pesca, reabilitação); sexo (macho, fêmea) e Fibropapilomatose (presente, ausente). Os seguintes pesticidas não puderam ser incluídos nas análises, devido à insuficiência de animais com concentrações acima do limite de quantificação em ambos os tecidos: op'-DDE, op'-DDD, pp'-DDD, β-endosulfan, Sulfato endosulfan e Dicofol. Pelo mesmo motivo, Mirex e pp'-DDE não puderam ser incluídos nas análises.

As tabelas 6 e 7 resumem os valores de P para os diferentes fatores do histórico individual (os valores com diferença significativa estão marcados em cinza), assim como o valor de S e R^2 para o modelo linear generalizado de cada pesticida. Para os casos em que o fator do histórico individual teve influência significativa sobre a concentração de um pesticida, análises *post-hoc* de Tukey foram utilizadas para identificar as diferenças entre as categorias. A tabela 8 apresenta as concentrações dos pesticidas analisados (média ± desvio padrão; $ng.g^{-1}$) nas diferentes categorias para os fatores do histórico individual (letras diferentes sobrescritas indicam diferença significativa).

Tabela 6 - Valores de P, S e R^2 para os diferentes fatores do histórico individual no modelo linear generalizado de cada pesticida no tecido adiposo

	Tecido Adiposo								
	α-BHC	**β-BHC**	**pp'-DDE**	**α-endosulfan**	**Heptacloro**	**ΣHCH**	**ΣDDT**	**ΣEndosulfan**	**ΣOCS**
Localidade	0,951	0,089	0,466	0,048	0,123	0,089	0,035	0,011	0,056
Contexto	0,430	0,004	0,423	0,032	0,456	0,382	0,156	0,095	0,402
Sexo	0,632	0,164	0,780	0,211	0,179	0,083	0,527	0,998	0,116
Fibropapilomatose	0,387	0,565	0,237	0,011	0,367	0,837	0,078	0,013	0,014
S	6,894	6,860	5,422	23,018	13,407	13,179	13,417	24,497	277,863
R^2	0,036	0,273	0	0,610	0,245	0,068	0,081	0,148	0,125

Notas - Cinza: valores com diferença significativa; resultados expressos em $ng.g^{-1}$ peso úmido; 0: valor numérico nulo.

Tabela 7 - Valores de P, S e R^2 para os diferentes fatores do histórico individual no modelo linear generalizado de cada pesticida no tecido hepático

	Tecido Hepático								
	α-BHC	**β-BHC**	**α-endosulfan**	**Heptacloro**	**Mirex**	**ΣHCH**	**ΣDDT**	**ΣEndosulfan**	**ΣOCS**
Localidade	0,918	0,045	0,046	0,025	0,857	0,356	0,646	0,867	0,934
Contexto	0,548	0,959	0,460	0,210	0,954	0,943	0,699	0,163	0,299
Sexo	0,720	0,110	0,010	0,294	0,931	0,640	0,708	0,337	0,623
Fibropapilomatose	0,424	0,338	0,007	0,070	0,855	0,484	0,165	0,651	0,555
S	2,099	4,889	17,737	11,196	228,435	6,609	8,405	22,762	101,615
R^2	0	0,199	0,621	0,212	0	0,007	0,058	0	0

Notas - Cinza: valores com diferença significativa; resultados expressos em $ng.g^{-1}$ peso úmido; 0: valor numérico nulo.

Tabela 8 - Concentrações dos pesticidas analisados (média ± desvio padrão) nas diferentes categorias para os fatores do histórico individual

	Tecido adiposo					Tecido hepático		
	β-BHC	**α-endosulfan**	**ΣDDT**	**ΣEndosulfan**	**ΣOCS**	**β-BHC**	**α-endosulfan**	**Heptacloro**
Localidade								
Praia Grande/SP		2,93 ± 0,61 ^{A}	11,9 ± 12,8 ^{A}	2,96 ± 3,06 ^{A,B}		11,0 ± 8,89 ^{A}	9,43 ± 10,6 ^{A}	9,94 ± 5,3 ^{B}
Ubatuba/SP		33,7 ± 57,9 ^{A,B}	8,21 ± 17,8 ^{A,B}	16,1 ± 40,6 ^{A}		4,02 ± 2,53 ^{B}	17,0 ± 22,4 ^{A}	14,9 ± 14,1 ^{B}
Vitória/ES		3,91 ± 2,27 ^{B}	3,93 ± 5,34 ^{B}	1,61 ± 2,38 ^{B}		5,68 ± 3,27 ^{A,B}	31,3 ± 53,2 ^{A}	22,8 ± 12,4 ^{A}
Contexto								
Encalhe/boiando	20,3 ± 9,29 ^{A}	34,2 ± 57,6 ^{A}						
Pesca	11,2 ± 6,89 ^{B}	2,98 ± 0,57 ^{A,B}						
Reabilitação	10,0 ± 4,33 ^{A,B}	1,9 ^{B}						
Sexo								
Macho							40,2 ± 61,4 ^{A}	
Fêmea							13,1 ± 17,3 ^{B}	
Fibropapilomatose								
Presente		47,9 ± 76,6 ^{A}		16,4 ± 46,4 ^{A}	66,5 ± 84,6 ^{A}		57,9 ± 75,4 ^{A}	
Ausente		5,02 ± 5,87 ^{B}		4,45 ± 11,1 ^{B}	126,3 ± 361,5 ^{B}		2,2 ± 16,4 ^{B}	

Notas - Letras sobrescritas diferentes indicam diferença significativa ao teste *post-hoc* de Tukey. Resultados expressos em $ng.g^{-1}$ peso úmido.

5.5 RELAÇÃO ENTRE OS ORGANOCLORADOS E HISTÓRICO DO ANIMAL (LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO)

A tabela 9 resume a porcentagem dos animais dentro de uma categoria de histórico individual que apresentava concentrações acima do limite de quantificação (LQ) para cada pesticida. O que está marcado em cinza indica que houve diferença significativa entre as categorias de um mesmo fator do histórico individual (teste Qui-Quadrado para Localidade e Contexto; teste exato de Fisher para Sexo e Fibropapilomatose). Os resultados apontam que os 12 pesticidas organoclorados monitorados foram detectados em pelo menos uma (1) amostra ou mais.

Tabela 9 - Porcentagem dos animais dentro de uma categoria de histórico individual com concentrações acima do LQ para cada pesticida

	Localidade			Contexto			Sexo		Fibropapilomatose	
Composto	**Praia Grande/SP**	**Ubatuba/SP**	**Vitória/ES**	**Encalhe/boiando**	**Pesca**	**Reabilitação**	**Macho**	**Fêmea**	**Presente**	**Ausente**
Tecido adiposo (n=51)										
α-BHC	100%	80%	73%	75%	89%	88%	50%	88%	71%	89%
β-BHC	100%	80%	73%	63%	93%	100%	67%	86%	64%	92%
op'-DDE	6%	10%	20%	19%	7%	13%	0%	14%	29%	5%
pp'-DDE	100%	20%	40%	19%	78%	25%	33%	51%	50%	51%
op'-DDD	38%	25%	7%	13%	33%	13%	17%	26%	21%	24%
pp'-DDD	0%	0%	7%	6%	0%	0%	0%	2%	7%	0%
α-endosulfan	38%	25%	13%	31%	26%	13%	33%	26%	21%	27%
β-endosulfan	6%	15%	13%	19%	7%	13%	17%	12%	21%	8%
Sulfato endosulfan	25%	25%	40%	38%	26%	25%	0%	35%	43%	24%
Heptacloro	75%	85%	87%	88%	85%	63%	83%	84%	100%	76%
Dicofol	38%	5%	60%	44%	33%	0%	17%	33%	50%	24%
Mirex	0%	10%	27%	25%	7%	0%	17%	12%	21%	8%
Tecido hepático (n=64)										
α-BHC	88%	73%	73%	65%	87%	70%	80%	75%	67%	83%
β-BHC	44%	62%	36%	52%	42%	60%	30%	53%	38%	55%
op'-DDE	25%	8%	14%	9%	16%	20%	10%	14%	8%	18%
pp'-DDE	44%	12%	23%	22%	32%	0%	10%	27%	17%	28%
op'-DDD	19%	12%	0%	4%	16%	0%	10%	10%	0%	15%
pp'-DDD	6%	4%	0%	0%	6%	0%	0%	4%	0%	5%
α-endosulfan	44%	27%	18%	17%	39%	20%	30%	27%	8%	40%
β-endosulfan	6%	12%	18%	17%	6%	20%	20%	12%	13%	13%
Sulfato endosulfan	19%	8%	14%	9%	16%	10%	10%	12%	13%	13%
Heptacloro	50%	38%	82%	57%	61%	40%	50%	61%	71%	48%
Dicofol	31%	12%	32%	26%	26%	10%	0%	29%	33%	18%
Mirex	25%	23%	14%	17%	26%	10%	10%	22%	8%	28%

Nota - Cinza: diferença significativa.

Por terem sido encontradas poucas diferenças significativas nos fatores de histórico individual para alguns dos compostos, não é possível estabelecer um padrão. Desta maneira, é difícil afirmar qual fator poderia ter tido maior peso sobre os resultados. Como colocado nos outros tópicos, múltiplos fatores podem ter influenciado vastamente os resultados, a seguir alguns deles são analisados.

Localidade

Foi observada a seguinte variação nas concentrações: Ubatuba/SP > Vitória/ES> Praia Grande/SP para α-endosulfan adiposo; Praia Grande/SP > Ubatuba/SP > Vitória/ES para ΣDDTs adiposo; Ubatuba/SP > Praia Grande/SP > Vitória/ES para ΣEndosulfan adiposo; Praia Grande/SP > Vitória/ES > Ubatuba/SP para β-BHC hepático; Vitória/ES > Ubatuba/SP > Praia Grande/SP para α-endosulfan hepático; Vitória/ES > Praia Grande/SP > Ubatuba/SP para ΣEndosulfan hepático (Tabela 8). Tartarugas de Vitória/ES apresentaram concentrações quantificáveis de Heptacloro e Dicofol com maior frequência que tartarugas de Praia Grande/SP e Ubatuba/SP. Já para o pp'-DDE, a tendência foi Praia Grande/SP > Vitória/ES > Ubatuba/SP (Tabela 9).

Com relação às localidades, diferenças regionais podem ser influenciadas pelas condições do *habitat*, como as correntes e ressurgências marítimas e as atividades agrícolas (LABRADA-MARTAGÓN et al., 2011), que podem expor os indivíduos a diferentes misturas de poluentes e alimentos (RAGLAND et al., 2011). Talvez por isso tenham sido encontrados diferentes padrões de concentração dos compostos nas três localidades analisadas (α-endosulfan, ΣDDT e ΣEndosulfan nos tecidos adiposo, e β-BHC, α-endosulfan e Heptacloro no tecido hepático).

A separação das tartarugas marinhas por localidade, levando-se em conta as concentrações de contaminantes no sangue, por exemplo, sugerem diferenças no *habitat* e nas condições ambientais, particularmente por causa das atividades agrícolas (LABRADA-MARTAGÓN et al., 2010b; LABRADA-MARTAGÓN et al., 2010a). Diferenças regionais, como grandes áreas de industrialização, uso diferencial dos solos (agrícola *vs.* urbano), grandes concentrações humanas e grandes bacias hidrográficas influenciam notoriamente a carga de contaminação (RAGLAND et al., 2011). Embora nem todos os OCs sejam utilizados com a mesma intensidade ao redor do mundo, tendo sido banidos ou tendo seu uso restringido, é documentado que, devido à sua natureza, podem atingir qualquer região do planeta através da circulação atmosférica (MIRANDA-FILHO; CARMELA MONTONE; FILLMANN, 2008).

Fidelidade sazonal e comportamentos de tartarugas juvenis sugerem que os níveis de contaminantes estariam relacionados ao seu local de alimentação preferencial (RAGLAND et al., 2011). Assim, níveis de POPs em tartarugas marinhas refletiriam a contaminação de seus *habitats* de forrageio, o qual seria dependente das fontes locais de contaminação (VAN DE MERWE et al., 2010). A ampla diversidade nos *habitats* de distribuição dos quelônios marinhos predispõe a diferenças na exposição, pois alguns deles se alimentariam em regiões mais contaminadas, enquanto outros se alimentariam em locais mais limpos.

A ingestão é, provavelmente, a maior via de exposição aos contaminantes para as tartarugas. Fontes de contaminação incluiriam alimentos contaminados e ingestão do sedimento durante a alimentação (RYBITSKI; HALE; MUSICK, 1995). A via predominante de exposição a contaminantes bioacumulavéis no ambiente marinho se dá através da transferência trófica. *Habitats* com diferentes tipos de forrageio resultam, por sua vez, em diferentes perfis de contaminação através do alimento, o que poderá ser observado conforme ascendemos na cadeia trófica (RAGLAND et al., 2011), por exemplo, as tartarugas marinhas com hábito alimentar carnívoro seriam mais susceptíveis de serem afetadas por tóxicos ambientais (MILTON; LUTZ, 1997). O índice de contaminação varia entre as diferentes espécies de tartarugas marinhas (*C. caretta* > *C. mydas* > *D. coriácea*) tanto no Mar Mediterrâneo como no Oceano Atlântico (MCKENZIE et al., 1999). Por sua vez, no estudo realizado no Oceano Pacífico, concentrações de OCs nos tecidos da tartaruga oliva foram maiores que as detectadas nas tartarugas-verdes e cabeçudas (GARDNER et al., 2003).

Em répteis como as tartarugas, processos biológicos são regulados em função da temperatura e suas variações podem exercer papel importante nos padrões localidade específico. Por isso, futuros estudos que procurem entender melhor a assimilação, transformação e eliminação de certos poluentes nessas espécies são requeridos (RAGLAND et al., 2011).

Em suma, o local de forrageio dos indivíduos pode influenciar a exposição e os padrões de POPs em espécies altamente migratórias como as tartarugas marinhas. Além disso, deve-se levar em consideração a origem dessas populações e o padrão migratório da espécie, uma vez que a exposição aos poluentes varia conforme a distância de migração das tartarugas marinhas (RYBITSKI; HALE; MUSICK, 1995). Sem conhecer exatamente a história migratória dos indivíduos e a exposição prévia aos contaminantes, apenas pode-se elaborar uma possível explanação (KELLER et al., 2004b).

Sexo

Observou-se que machos apresentaram concentrações mais elevadas de α-endosulfan hepático (Tabela 8). Por outro lado, fêmeas apresentaram concentrações quantificáveis de α-BHC com maior frequência que machos (Tabela 9).

Pelo seu potencial de bioacumulação, as concentrações de OCs exibem aumento de acordo com a idade do animal. Porém, fêmeas em idade reprodutiva podem transferir cargas de contaminantes através dos ovos, o que resultaria em menores níveis de OCs em fêmeas adultas que nos machos (LAZAR et al., 2011). Os indivíduos que compuseram o "n" amostral do presente estudo eram todos juvenis e, com isso, não foram verificadas maiores diferenças nas concentrações de OCs entre machos e fêmeas, apenas para o α-endosulfan. Dados semelhantes foram encontrados em *Caretta caretta*, segundo Keller et al. (2004b), e também em outro estudo realizado no Mar Adriático com a mesma espécie (LAZAR et al., 2011).

Contexto

Observaram-se concentrações mais elevadas de β-BHC e α-endosulfan na ordem de proveniência encalhe-boiando > pesca > reabilitação (Tabela 8). Outras concentrações quantificáveis de β-BHC foram detectadas com maior frequência na ordem reabilitação > pesca > encalhe-boiando. Para o composto pp'-DDE, seguiu-se a ordem pesca > reabilitação> encalhe-boiando (Tabela 9).

Segundo Van der Merwe et al. (2010), existiria uma diferença no perfil de POPs entre tartarugas saudáveis e debilitadas de vida livre, ou seja, entre os indivíduos saudáveis capturados por pesca, as tartarugas debilitadas que vieram a óbito durante o tratamento ou aquelas encontradas encalhadas na praia ou boiando. Quando as tartarugas estão debilitadas, geralmente apresentam-se com afagia (VAN DE MERWE et al., 2010) e mobilizam reservas lipídicas do seu corpo para obtenção de energia. Isto foi observado durante exame necroscópico de alguns dos indivíduos que apresentaram severa depleção do tecido adiposo. Portanto, a concentração de POPs em um organismo estaria mais fortemente relacionada à condição corporal que ao contexto. No presente estudo, foram observadas diferenças unicamente para o α-endosulfan e o β-BHC no tecido adiposo em relação ao contexto, ou seja, a maneira como o animal foi encontrado.

FP

Observou-se que tartarugas com Fibropapilomatose apresentavam concentrações mais elevadas de α-endosulfan adiposo, ΣEndosulfan adiposo e α-endosulfan hepático. Por outro

lado, ao contrário do que se esperava, constatou-se que as concentrações de ΣOCS adiposo foram mais elevadas nas tartarugas sem Fibropapilomatose (Tabela 8). As demais tartarugas com FP apresentaram concentrações quantificáveis de Heptacloro e op'-DDE com maior frequência que tartarugas sem FP; entretanto, o oposto ocorreu para β-BHC e α-endosulfan (Tabela 9). Isto poderia ser parcialmente explicado se considerarmos que indivíduos com FP apresentam, na maior parte das vezes, boa condição corporal, sem diferenças significativas em comparação aos animais sem FP (SÁNCHEZ-SARMIENTO et al., 2013b).

5.6 CORRELAÇÃO ENTRE CCC E ICC *VS.* ΣOCS

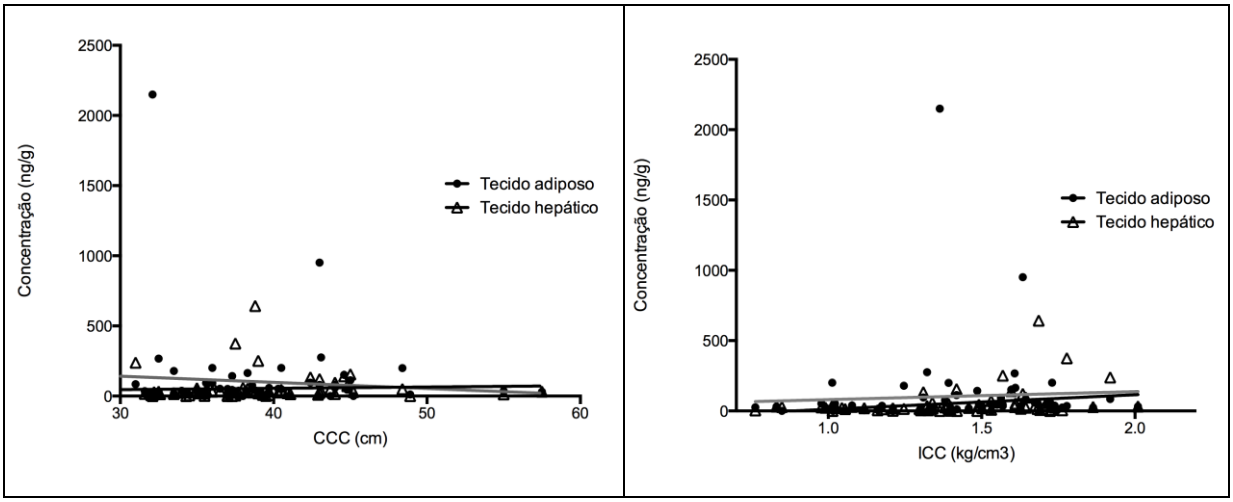
No presente trabalho, todos os animais analisados foram juvenis (CCC=38,68±5,41 cm) e 57,5 cm o CCC máximo registrado, não foi encontrada correlação significativa entre a concentração total de organoclorados (ΣOCS) e o comprimento curvilíneo da carapaça (CCC) tanto no tecido adiposo (P=0,5190, R^2=0,0067) quanto no tecido hepático (P=0,6918, R^2=0,0025) (Figura 22). No entanto, em um estudo realizado no Mar Adriático com *C. caretta*, as concentrações dos POPs pp'-DDD, pp'-DDT e α-BHC apresentaram incremento conforme o aumento do CCC (LAZAR et al., 2011) e entre alguns POPs com o CCC em machos adultos da mesma espécie (RAGLAND et al., 2011). A explicação para correlações com tamanho seria a de que as tartarugas maiores, que têm maior atividade migratória, precisariam consumir grandes quantidades de alimento para manter as demandas metabólicas e, consequentemente, teriam maior acúmulo de contaminantes. Outra hipótese é que conforme o animal cresce, acontece o fenômeno de diluição (RAGLAND et al., 2011). No entanto, é provável que a tendência da diminuição das concentrações não se deva unicamente ao fenômeno de diluição, mas também ao tamanho amostral (KELLER et al., 2004b). Sugere-se, também, que poderia haver redução nos níveis de contaminação das tartarugas, como na *C. mydas*, em função da idade, pelas mudanças de hábitos alimentares nas respectivas fases de evolução, ou seja, de hábito carnívoro nos primeiros estágios de desenvolvimento passando a hábito herbívoro quando juvenis e adultos (MCKENZIE et al., 1999; SAKAI et al., 2000b; SAKAI et al., 2000a).

A condição corporal nos animais marinhos está sujeita a mudanças durante os vários estágios da vida e diferentes estresses como doença, migração, reprodução e disponibilidade dos recursos alimentares. Na mobilização de lipídeos associada à perda de peso, pode ocorrer

redistribuição de OCs a outros tecidos. Em situação contrária, a retenção de OCs no tecido adiposo resultaria no aumento das concentrações (YLITALO et al., 2005). Diferente do esperado, não houve correlação significativa entre a concentração total de organoclorados (ΣOCS) e o índice de condição corporal (ICC) no tecido adiposo (P=0,6645, R^2=0,0031). Uma fraca correlação positiva foi encontrada para as concentrações no tecido hepático (P=0,0184, R^2=0,0877, coeficiente=103,2 ± 42,6) (Figura 22). Em tartarugas-verdes estudadas em dois *habitats* diferentes na Península da Baixa Califórnia, México, uma tendência similar foi encontrada, não existindo diferenças significativas entre aparência física (animais com lesões e animais saudáveis) entre as classes de tamanho: (A) Juvenil, (B) Subadulto e (C) Adulto *vs.* concentração de OCs (LABRADA-MARTAGÓN et al., 2011), embora a avaliação corporal tenha sido realizada de maneira subjetiva diferentemente da análise realizada no presente estudo, no qual foi definido um índice de condição corporal (ICC). Análises prévias indicaram que a utilização deste índice traria um resultado mais acurado (SÁNCHEZ-SARMIENTO et al., 2012e; SÁNCHEZ-SARMIENTO et al., 2012c).

Informações obtidas a partir de outro estudo realizado nas Ilhas Canárias com espécimes de *C. caretta*, avaliadas em duas categorias de condição corporal, demostraram que animais emaciados apresentavam maiores concentrações de ΣDDT no tecido hepático (98,56±55,3 $ng.g^{-1}$) que no adiposo (15,31±45,56 $ng.g^{-1}$) *vs.* animais em condições de massa corpórea regular (normal), os quais mostraram maiores concentrações no tecido adiposo (42,97±75,3 $ng.g^{-1}$) seguido pelo hepático (36,36±52,58 $ng.g^{-1}$) (MONAGAS et al., 2008). Em estudo realizado por Keller et al. (2004a), a condição corporal foi negativamente correlacionada com o Dieldrin no sangue.

Figura 22 - Correlação entre ΣOCS e CCC e entre ΣOCS e ICC, para ambos tecidos

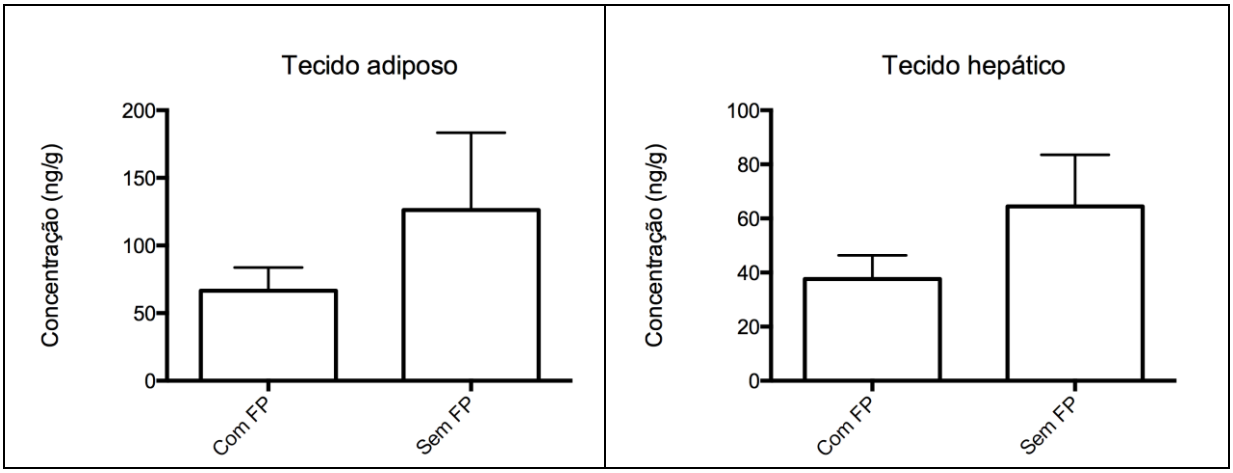


Legenda: Uma fraca correlação positiva foi encontrada entre ΣOCS e o ICC no tecido hepático.

5.7 CORRELAÇÃO ENTRE FIBROPAPILOMATOSE *VS.* ΣOCS

Não houve diferença significativa entre a concentração total de organoclorados (ΣOCS) em tartarugas com ou sem fibropapilomatose, tanto para o tecido adiposo (Mann-Whitney, P=0,5173) como para o tecido hepático (Mann-Whitney, P=0,8298) (Figura 23).

Figura 23 - Comparação da ΣOCS nos tecidos adiposo e hepático. Não houve diferença significativa entre a concentração total de organoclorados (ΣOCS) em tartarugas com ou sem fibropapilomatose



Conforme apresentado nas figuras 24 e 25, não foi possível identificar correlação significativa entre o índice de fibropapilomatose (IFP) e a concentração total de organoclorados (ΣOCS) no tecido adiposo (regressão linear R^2=0,0104; quadrática

R^2=0,0383; cúbica R^2=0,1675) e tecido hepático (linear R^2=0,0010; quadrática R^2=0,0012; cúbica R^2=0,0092).

Figura 24 - Correlação entre o IFP e ΣOCS nos tecidos adiposo e hepático

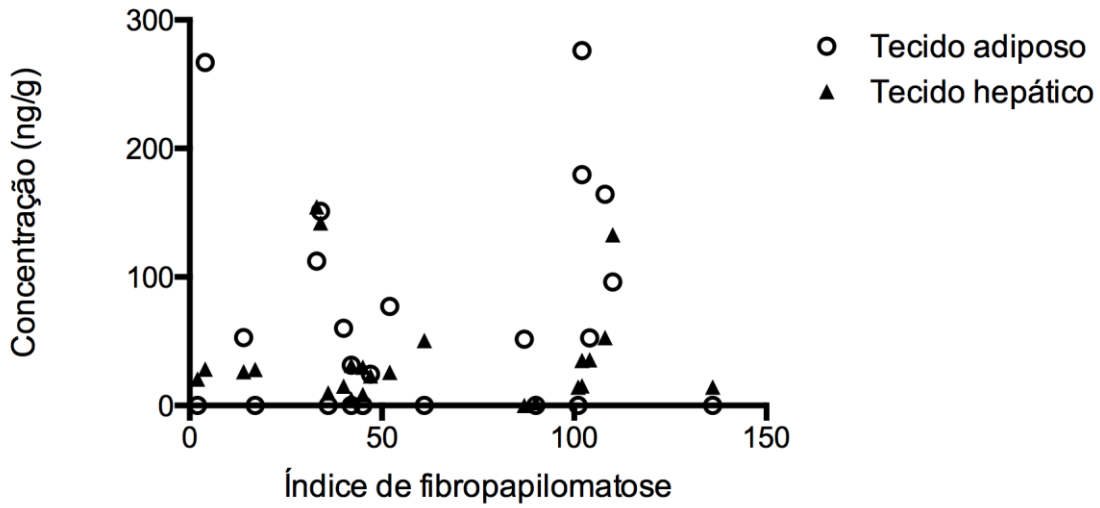
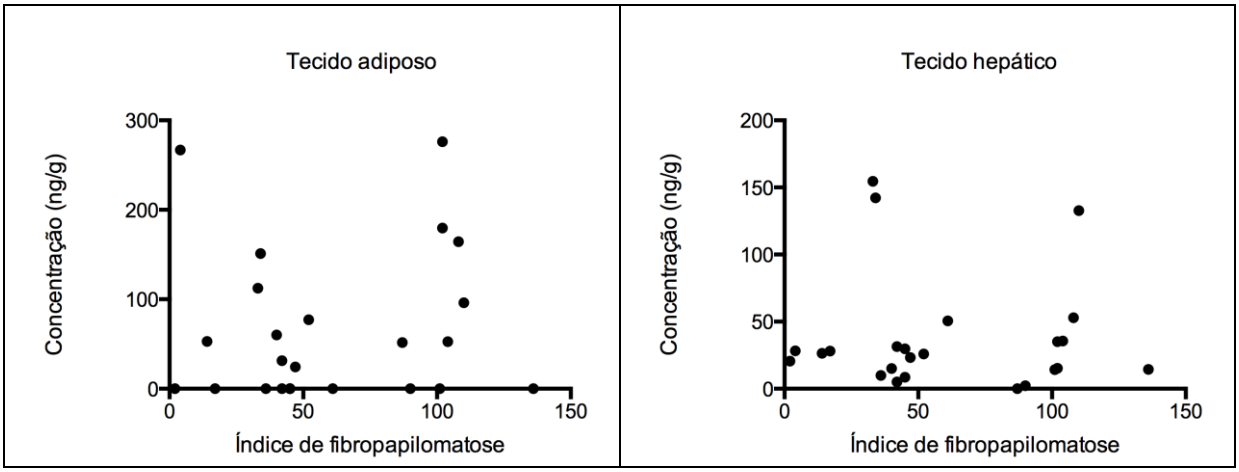
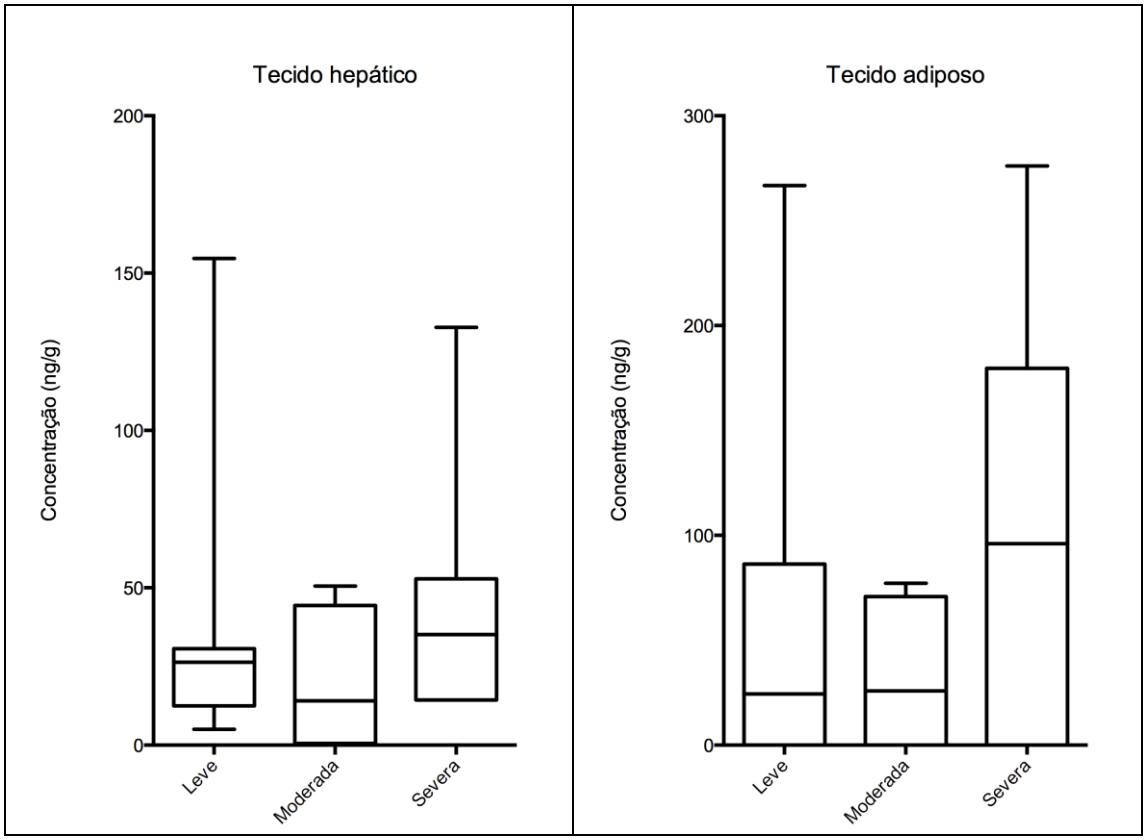


Figura 25 - Correlações entre o IFP e ΣOCS nos tecidos adiposo e hepático



Não foi encontrada diferença significativa na concentração total de contaminantes (ΣOCS) entre os diferentes escores de severidade da Fibropapilomatose (leve, moderada, severa) no tecido hepático (Kruskall-Wallis; P=0,4219) e no tecido adiposo (P=0,3172) (Figura 26).

Figura 26 - Correlação entre ΣOCS e FPS



Correlações entre alguns poluentes ambientais e FP também não foram encontradas em estudo realizado no Havaí, onde os resultados ficaram abaixo do LD (AGUIRRE, A. A. et al., 1994a). No estudo realizado por Silva (2010) com tartarugas-verdes oriundas das regiões sul e sudeste do Brasil, não foram detectados os pesticidas organoclorados monitorados. Miao e colaboradores (2001) detectaram um tipo específico de POPs, denominado Bifenilas Policloradas (PCBs), nos tecidos hepático e adiposo de três (3) indivíduos da espécie *Chelonia mydas*, mas não foi possível fazer comparações estatísticas devido ao "n" reduzido (n=1) nas categorias (sem tumores, moderada, severa). Em contraste, o trabalho desenvolvido na espécie do lobo-marinho *Zalophus californianus*, que demonstrou associação entre OCs e neoplasia, modelos de regressão logística exploraram a possibilidade dos OCs contribuírem para a mortalidade dos lobos-marinhos com carcinoma, pois estes tinham maiores concentrações de DDTs (30% a mais) que os indivíduos sem carcinoma (YLITALO et al., 2005).

Mesmo que as tartarugas marinhas acumulem menores concentrações de OCs, se comparadas a outras espécies, esses compostos afetam a saúde delas e refletem em uma ampla variedade de funções biológicas, como imunidade e homeostase de proteínas e íons. É pouco

provável encontrar indícios do efeito agudo dessas concentrações, mas os efeitos crônicos sobre a imunidade não podem ser descartados (RYBITSKI; HALE; MUSICK, 1995), pois é possível que efeitos adversos nos indivíduos estejam ocorrendo mesmo quando os indicadores de saúde caem nos intervalos de referência da população. As tartarugas marinhas poderiam adaptar-se para manter a homeostase, mas pequenas alterações poderiam resultar em impactos acumulativos sobre a saúde animal (KELLER et al., 2004a). Pesquisas epidemiológicas têm associado à presença de resíduos teciduais a maior prevalência de infecções e disfunções fisiológicas em várias espécies de animais marinhos (JEPSON et al., 1999; JENSSEN et al., 2003). Estas e outras alterações biológicas, ou estresses gerados pelos poluentes no organismo, podem ter um papel importante na dinâmica de doenças, como no caso da FP.

Os efeitos biológicos dos OCs têm demonstrado ser espécie-dependente e o desenvolvimento de pesquisas sobre estes nos sistemas biológicos das tartarugas marinhas poderiam prover mais informações a respeito da ameaça que representam à recuperação dessas espécies (RYBITSKI; HALE; MUSICK, 1995). Os níveis tóxicos dos contaminantes químicos e seus efeitos adversos em tartarugas marinhas, em curto e em longo prazo (dinâmica de populações), são pouco conhecidos (LABRADA-MARTAGÓN et al., 2011). De igual maneira, as inter-relações de misturas complexas dificultam o discernimento do composto que pode ser o responsável pelos efeitos adversos. Deste modo, como as concentrações seguras não foram estabelecidas e os estudos toxicológicos relativos a esses poluentes em répteis são escassos, é difícil avaliar o impacto dos OCs nos níveis observados neste trabalho. Portanto, torna-se indispensável definir verdadeiros intervalos de referência que possam ser utilizados como indicadores de saúde em populações de tartarugas marinhas.

Os herpesvírus estão associados ao aparecimento de neoplasias em muitas espécies animais como, por exemplo, nos anfíbios (MCKINNELL; CARLSON, 1997). Porém, outros fatores como predisposição genética, diversas infecções e exposição a compostos químicos são necessários para seu desenvolvimento, como é o caso da Fibropapilomatose em *C. mydas* (LACKOVICH et al., 1999). Assim, a hipótese de que os OCs tenham alguma relação com a doença não pode ser descartada pelos seguintes motivos: (A) diversos estudos têm demonstrado que exposições crônicas a OCs, inclusive em concentrações muito baixas, têm inúmeras repercussões na saúde de um indivíduo, alterando sistemas biológicos, como o sistema imune; (B) existem muitos exemplos de vírus oncogênicos que precisam de cofatores de tipo ambiental para serem ativados.

Sendo assim, um possível cenário seria o seguinte: tartarugas marinhas são expostas a vários tipos de poluentes e estes poderiam aumentar sua suscetibilidade a doenças e, entre

estas, estariam as causadas por vírus oncogênicos. No caso de vírus da família herpesviridae (p. ex., o *GTFPH*), o animal poderia estar infectado, mas manifestaria a doença apenas quando estivesse suficientemente estressado ou imunossuprimido perante diversas situações.

Os resultados demonstram que as tartarugas marinhas da espécie *C. mydas*, oriundas da costa sudeste do Brasil, estão expostas a níveis relativamente significantes de OCs e estes possivelmente têm um papel na etiologia multifatorial da FP e afetam a taxa de prevalência da doença nas distintas regiões avaliadas, agindo como agentes imunossupressores ou através da genotoxicidade e promoção tumoral. Estudos futuros têm de ser desenvolvidos para caracterizar melhor a ação dessas substâncias e seus efeitos nas espécies de quelônios marinhos.

6 CONCLUSÕES

- Os resultados deste trabalho apresentam um registro temporal do perfil de contaminação nas tartarugas-verdes de vida livre da costa sudeste, confirmando a biodisponibilidade de OCs nas diferentes regiões avaliadas. Todos os agrotóxicos clorados monitorados – α-BHC, β-BHC, Heptacloro, Dicofol, α-endosulfan, β-endosulfan, Sulfato endosulfan, pp'-DDD, op'-DDD, pp'-DDE, op'-DDE e Mirex – foram encontrados em pelo menos uma (1) amostra e em concentrações variáveis e relativamente significativas.
- Não foi possível identificar correlações significativas das concentrações dos poluentes em relação à presença ou ausência da FP nem entre o índice de fibropapilomatose (FPI) e o escore de fibropapilomatose (FPS) e a ΣOCS nem para os tecidos adiposo e hepático. Tampouco foi possível identificar correlações significativas entre o índice de condição corporal (ICC) ou comprimento curvilíneo da carapaça (CCC) e a ΣOCS.
- Houve correlação significativa entre a porcentagem lipídica das amostras de tecidos adiposo e hepático, assim como entre as concentrações dos tecidos adiposo e hepático para ΣOCS. Embora fossem vistas algumas diferenças na presença ou ausência de algum contaminante, estas foram dispersas e não determinantes, ou seja, não permitiram estabelecer um padrão em relação aos diferentes fatores do histórico individual. Não foram encontradas diferenças significativas entre a concentração total de organoclorados (ΣOCS) para ambos os tecidos, em relação ao sexo do animal ou localidade, que permitissem inferir alguma relação entre o grau de contaminação e a variação regional da prevalência da FP.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os resultados obtidos no presente estudo provêm informações úteis a respeito das tendências dos POPs nesta espécie ameaçada e ressaltam a importância de dar continuidade ao uso da tartaruga marinha como espécie sentinela ou monitora da saúde dos oceanos. No entanto, estes resultados devem ser interpretados com cuidado, pois não podem ser atribuídos a um só fator, mas a diversos fatores bióticos e abióticos, espaciais e temporais ou metodológicos inerentes aos indivíduos, e também a fatores físico-químicos inerentes aos compostos que influenciam na dinâmica dos mesmos. Os poluentes estariam presentes na cadeia trófica com possíveis repercussões a curto, médio e longo prazo na saúde da biota e do ambiente local, saúde pública e medicina da conservação. Estudos futuros deverão examinar mais de perto a influência dos diferentes fatores na dinâmica dos resultados.
- Embora os resultados obtidos no presente estudo não permitam estabelecer correlação direta entre as concentrações de OCs e a presença ou ausência da FP, ou conforme o grau de severidade da mesma avança (FPS, FPI), este estudo demonstra que as tartarugas-verdes oriundas da costa sudeste de Brasil estão expostas a níveis significativos de POCs, que poderiam ter algum papel na etiologia multifatorial da FP e afetar a prevalência da doença nas diferentes regiões avaliadas.
- Apesar da existência de ampla literatura relatando os níveis de poluentes em alguns répteis em diversas localidades, a interpretação dessas informações é complicada pela carência de informações relativas à contaminação correlativa no meio ambiente e seus efeitos. Por isso, inferir em quais níveis esses poluentes representariam um risco e algum grau de ameaça para estas espécies não é possível. Os níveis a partir dos quais os poluentes químicos produzem efeitos adversos a curto prazo (fisiologia) e a longo prazo (dinâmica de população) são pouco conhecidos para as tartarugas marinhas. Além disso, são requeridas análises das variações temporais destes e de outros tipos de poluentes, abordando diferentes fases do ciclo de vida destas espécies, e a padronização das metodologias analíticas para esclarecer como outros fatores podem influenciar estes resultados.
- Ademais, estudos futuros deverão ser direcionados com o objetivo de ampliar essas informações e desenvolver melhor compreensão do metabolismo (toxicocinética e toxicodinâmica) em tartarugas marinhas, entre eles a atuação dos sistemas antioxidantes e respostas enzimáticas aos poluentes através da seleção de biomarcadores que elucidem as

respostas à exposição a diversas concentrações de poluentes e sua dinâmica perante a presença de diversos patógenos e outros mecanismos ainda não totalmente elucidados, que intervêm, por exemplo, na manifestação da Fibropapilomatose.

REFERÊNCIAS

ADNYANA, W.; LADDS, P. W.; BLAIR, D. Observations of fibropapillomatosis in green turtles (*Chelonia mydas*) in Indonesia. **Australian Veterinary Journal**, v. 75, n. 10, p. 737-742, 1997.

AGUIRRE, A. A.; BALAZS, G. H.; ZIMMERMAN, B.; GALEY, F. D. Organic contaminants and trace metals in the tissues of green turtles (*Chelonia mydas*) afflicted with fibropapillomas in the Hawaiian islands. **Marine Pollution Bulletin**, v. 28, n. 2, p. 109-114, 1994a.

AGUIRRE, A. A.; BALAZS, G. H.; ZIMMERMAN, B.; SPRAKER, T. R. Evaluation of Hawaiian green turtles (*Chelonia mydas*) for potential pathogens associated with fibropapillomas. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 30, n. 1, p. 8-15, 1994b.

AGUIRRE, A. A. Fibropapilomas en Tortugas Marinas. **Noticiero de Tortugas Marinas**, n. 82, p. 10-12, 1998. Trabalho apresentado XVIII Simposio Anual sobre la Biología y la Conservación de las Tortugas Marinas.

AGUIRRE, A. A.; SPRAKER, T. R.; BALAZS, G. H.; ZIMMERMAN, B. S. Spirorchids and fibropapillomas in green turtles from the Hawaiian Islands. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 34, n. 1, p. 91-98, 1998.

AGUIRRE, A. A.; LUTZ, P. L. Marine Turtles as Sentinels of Ecosystem Health: Is Fibropapillomatosis an Indicator? **EcoHealth**, v. 1, n. 3, p. 275-283, 2004.

ALAVA, J. J.; KELLER, J. M.; KUCKLICK, J. R.; WYNEKEN, J.; CROWDER, L.; SCOTT, G. I. Loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) egg yolk concentrations of persistent organic pollutants and lipid increase during the last stage of embryonic development. **Science of the Total Environment**, v. 367, n. 1, p. 170-181, 2006.

ALBAREDA, D. A.; PROSDOCIMI, L.; GIANGIOBBE, A.; RODRÍGUEZ HEREDIA, S.; MASSOLA, V. **Bases para la creación del Programa Regional de Investigación y Conservación de Tortugas Marinas en la Argentina (PRICTMA). Informe diagnóstico.** Buenos Aires, Argentina: [s.n], 2003.

ALMEIDA, A. D. P.; SANTOS, A. J. B.; THOMÉ, J. C. A.; BELINI, C.; BAPTISTOTTE, C.; MARCOVALDI, M. A.; DOS SANTOS, A. S.; LOPEZ CASTRO, M. **Avaliação do estado de conservação da tartaruga marinha *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) no Brasil.**: **BioBrasil Biodiversidade Brasileira**, n. 1, p. 12-19, 2011.

ALMEIDA, F. V.; CENTENO, A. J.; BISINOTI, M. C.; JARDIM, W. F. Substâncias Tóxicas Persistentes (STP) no Brasil. **Quimica Nova**, v. 30, n. 8, p. 1976-1985, 2007.

ANANTHASWAMY, H.; PIERCEALL, W. E. Molecular mechanisms of ultraviolet radiation carcinogenesis. **Photochemistry Photobiology**, v. 52, p. 1119-1136, 1990.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/ partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.

ARIEL, E. Viruses in reptiles. **Veterinary Research,** v. 42, n. 100, p. 1-12, 2011.

ARTHUR, K.; LIMPUS, C.; BALAZS, G.; CAPPER, A.; UDY, J.; SHAW, G.; KEUPER-BENNETT, U.; BENNETT, P. The exposure of green turtles (*Chelonia mydas*) to tumour promoting compounds produced by the cyanobacterium *Lyngbya majuscula* and their potential role in the aetiology of fibropapillomatosis. **Harmful Algae**, v. 7, n. 1, p. 114-125, 2008.

BAKER, J. **Mass spectrometry**. New York: John Wiley and Sons, 1999.

BALAZS, G. H. **Current status of fibropapillomas in the Hawaiian green turtle, *Chelonia mydas*.** Honololu, Havai: U. S. Department of Commerce, National Oceanographic and Atmospheric Administration, National Marine Fisheries Service, 1991, p. 47-57.

BALAZS, G. H. Growth rates of immature Green turtle in the Hawaiian Archipielago In: Bjorndal, K. A. (Ed.). **Biology and conservation of sea turtles.** Washington D.C.: Smithsonian Institution Press, 1995, p. 489-511.

BALAZS, G. H.; MURAKAWA, S. K. K.; ELLIS, D. M.; AGUIRRE, A. A. Manifestation of fibropapillomatosis and rates of growth of green turtles at kaneohe bay in the hawaiian islands. In: ANNUAL SYMOSIUM ON SEA TURTLE BIOLOGY AND CONSERVATION, 18., 1998, Mazatlan, Mexico. **Proceedings…** 1998. p. 112-113.

BALDASSIN, P. J.; TANIGUCHI, S.; MONTONE, R. C. Determinação de compostos organoclorados em ovos de tartarugas marinhas (*Caretta caretta*) em Guriri. In: CONGRESSO, 6.; ENCONTRO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS DE ANIMAIS SELVAGENS, 11., 2002, Vitória, ES: Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens, 2002.

BAPTISTOTTE, C.; SCALFONE, J. T.; GALLO, B. M. G.; SANTOS, A. S.; CASTILHOS, J. C.; LIMA, E. H. S. M.; BELLINI, C.; BARATA, P. C. R. Prevalence of sea turtle fibropapillomatosis in Brazil. . In: ANNUAL SYMPOSIUM ON SEA TURTLE BIOLOGY AND CONSERVATION, 21., 2001, Philadelphia: [s.n.], 2001.

BAPTISTOTTE, C. **Caracterização espacial e temporal da fibropapilomatose em tartarugas marinhas da costa brasileira**. 2007. 64 p. Tese (Doutorado em Ecologia Aplicada) - Escola Superior de Agricultura ¨Luiz de Queiroz¨- Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

BJORNDAL, K. A. Foraging ecology and nutrition of sea turtles. In: Lutz, P. L. e Musick, J. A. (Ed.). **The biology of sea turtles.** Boca Raton, Florida: CRC Press, 1997, p. 199-231.

BJORNDAL, K. A.; BOLTEN, A. B.; CHALOUPKA, M. Y. Green turtle somatic growth model: Evidence fordensity dependence. **Ecological Applications**, v. 10, n. 1, p. 269-282, 2000.

BONDIOLI, A. C. V.; NAGAOKA, S. M.; MONTEIRO-FILHO, E. L. D. A. Ocorrência, distribuição e status de conservação das tartarugas marinhas presentes na região de cananéia, SP. In: JORNADA DE CONSERVAÇÃO E PESQUISA DE TARTARUGAS MARINHAS NO ATLÂNTICO SUL OCIDENTAL, 2., 2005, Praia do Cassino, RS. 2005. p. 53-55.

CASTILLO, M.; GONZÁLEZ, C.; MIRALLES, A. An evaluation method for determination of non-polar pesticide residues in animal fat samples by using dispersive solid-phase extraction clean up and GC-MS. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v.400, n. 5, p. 1315-1328, 2011.

CATRY, P.; BARBOSA, C.; INDJAI, B. **Tartarugas Marinhas da Guiné-Bissau: estatuto, biologia e conservação**. Guiné-Bissau: Instituto da Biodiversidade e das Áreas Protegidas - República da Guiné-Bissau, 2010. 127 p.

CERÓN, J. A. J. **Determinación de contaminantes organoclorados en tres especies de tortugas marinas de Baja California Sur**. 2004. 84 p. Tesis (Maestría en Ciencias) -Uso, manejo y preservación de los recursos naturales (Orientación en Biologia Marina) - Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., La Paz Baja California Sur, 2004.

CETESB. **Relatório de qualidade das águas litorâneas no estado de São Paulo**. São Paulo: CETESB, 2004.

CORSOLINI, S.; AURIGI, S.; FOCARDI, S. Presence of Polychlorobiphenyls (PCBs) and Coplanar Congeners in the Tissues of the Mediterranean Loggerhead Turtle *Caretta caretta*. **Ine Pollution Bulletin**, v. 40, n. 11, p. 952-960, 2000.

CRAM, S. P.; POLITE, L. N. **How to develop validate, and troubleshoot G.C. and HLPC Methods.** California: American Chemical Society Short Course, Agilent Technologies, 2002.

CUBAS, P. H.; BAPTISTOTTE, C. Chelonia (Tartaruga, Cágado, Jabuti). In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CUBAS, Z. S. (Ed.). **Tratado de Animais Selvagens:** medicina veterinária. São Paulo: Roca, 2007. p. 86-119.

CURRY, S. S.; BROWN, D. R.; GASKIN, J. M.; JACOBSON, E. R.; EHRHART, L. M.; BLAHAK, S.; HERBST, L. H.; KLEIN, P. A. Persistent Infectivity of a Disease-Associated Herpesvirus in Green Turtles after Exposure to Seawater. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 36, n. 4, p. 792-797, 2000.

CHALOUPKA, M.; BALAZS, G. H. ; WORK, T., M. Rise and fall over 26 years of a marine epizootic in Hawaiian green sea turtles. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 45, n. 4, p. 1138-1142, 2009.

CHRISTIAN, K. A.; BAUDINETTE, R. V.; PAMULA, Y. Energetic costs of activity by lizards in the field. **Functional Ecology**, v. 11, p. 392-397, 1997.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia: um breve ensaio. **Química Nova Na Escola**, v. 7, p. 21-25, 1998.

DEUS SANTOS, M. R. D. Valores hematológicos de tartarugas marinhas *Chelonia mydas* (Linaeus, 1758) juvenis selvagens do Arquipélago de Fernando de Noronha, Pernambuco, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, v. 46, n. 6, p. 491-499, 2009.

DIEGUES, A. C. **Povos e águas: inventário de áreas úmidas brasileiras.** São Paulo: NUPAUB-USP, 2002.

DOMINGO, A.; BUGONI, L.; PROSDOCIMI, L.; MILLER, P.; LAPORTA, M.; MONTEIRO, D. S.; ESTRADES, A.; ALBAREDA, D. **El impacto generado por las pesquerías en la tortugas marinas en el Océano Atlantico sud occidental.** San José, Costa Rica: WWF Programa Marino para Latinoamérica y el Caribe, 2006. p.72.

DUARTE, A.; FAÍSCA, P.; LOUREIRO, N. S.; ROSADO, R.; GIL, S.; PEREIRA, N.; TAVARES, L. First histological and virological report of fibropapilloma associated with

herpesvirus in Chelonia mydas at Príncipe Island, West Africa. **Archives of Virology**, v. 157, n. 6, p. 1155-1159, 2012.

ECKERT, K. L.; BJORNDAL, K. A.; ABREU-GROBOIS, F. A.; DONNELLY, M. E. **Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas (Traducción al español).** Blanchard, Pennsylvania USA: Consolidated Grafic Communications, 2000. 265 p.

EHRHART, L. M. Fibropapillomas in green turtles of the indian river lagoon, Florida: distribution over time and area. In: BALAZS, G. H.; POOLEY, S. G. (Ed.). **Research plan for marine turtle fibropapilloma**. USA: Department of Commerce, 1991. p. 59-61. (NOAA Tech. Memorandum NMFS).

ENE, A.; SU, M.; LEMAIRE, S.; ROSE, C.; SCHAFF, S.; MORETTI, R.; LENZ, J.; HERBST, L. H. Distribution of Chelonid fibropapillomatosis associated herpesvirus variants in florida: molecular evidence for infection of turtles following recruitment to neritic developmental habitats. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 41, n. 3, p. 489-497, 2005.

EUROPEAN COMMISSION. **Guidance document on pesticide residue analytical methods, SANCO/12495/2011.** 2012. Disponível em: < http://www.crl-pesticides.eu/library/docs/fv/SANCO12495-2011.pdf>. Acesso em: 12 abr. 2012.

FERNANDES, A.; MARANHO, A.; FARAH, R. F.; ZILLIO, M. M.; GENTIL, I. C.; BONDIOLI, A. C. V. Registro de encalhes de tartarugas marinhas na baixada Santista-SP. In: JORNADA SOBRE TARTARUGAS MARINHAS DO ATLÂNTICO SUL OCIDENTAL, 5., 2011, Florianópolis, Brasil. 2011. p. 141-144.

FERNANDEZ-ALBA, A. R. **Chromatographic-mass spectrometric food analysis for trace determination of pesticide residues, comprehensive analytical chemistry.** Amsterdam: Elsevier, 2004. 43 p.

FOLEY, A. M.; SCHROEDER, B. A.; REDLOW, A. E.; FICK-CHILD, K. J.; EAS, W. G. Fibropapillomatosis in stranded green turtles (*Chelonia mydas*) from the eastern united states (1980-98): trends and associations with environmental factors. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 41, n. 1, p. 29-41, 2005.

FUJIKI, H.; SUGANUMA, M. Tumor promotion by inhibitors of protein phosphatase 1 and 2A: the okadaic acid class of compounds. **Advanced Cancer Research**, v. 61, p. 143-194, 1993.

GALLO, B. M. G.; MACEDO, S.; GIFFONI, B. B.; BECKER, J. H.; BARATA, P. C. R. Sea Turtle conservation in Ubatuba, southeastern Brazil, a feeding area with incidental capture in coastal fisheries. **Chelonian Conservation and Biology**, v. 5, p. 93-101, 2006.

GARDNER, S. C.; PIER, M. D.; WESSELMAN, R.; JUÁREZ, J. A. Organochlorine contaminants in sea turtles from the Eastern Pacific. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, n. 9, p. 1082-1089, 2003.

GEYER, H. J.; SCHEUNERT, I.; BRUGGEMANN, R.; MATTHIES, M.; STEINBERG, C. E. W.; ZITKO, V.; KETTRUP, A.; GARRISON, W. The relevance of aquatic organisms' lipid content to the toxicity of lipophilic chemicals: Toxicity of lindane to different fish species. **Ibid**, v. 28, p. 53-70, 1994.

GROSSMAN, A. **Biologia Reprodutiva de *Chelonia mydas* (Reptilia), na Reserva biológica do Atol das Rocas**. Dissertação (Mestrado em Zoologia de Vertebrados). Pontifícia Universidad Católica do Rio Grande do Sul, UFRGS, Rio Grande do Sul, 2001. 43 p.

HAMANN, M.; GODFREY, M. H.; SEMINOFF, J. A.; ARTHUR, K.; BARATA, P. C. R.; BJORNDAL, K. A.; BOLTEN, A. B.; BRODERICK, A. C.; CAMPBELL, L. M.; CARRERAS, C.; CASALE, P.; CHALOUPKA, M.; CHAN, S. K. F.; COYNE, M. S.; CROWDER, L. B.; DIEZ, C. E.; DUTTON, P. H.; EPPERLY, S. P.; FITZSIMMONS, N. N.; FORMIA, A.; GIRONDOT, M.; HAYS, G. C.; IJIUNN, C.; KASKA, Y.; LEWISON, R.; MORTIMER, J. A.; NICHOLS, W. J.; REINA, R. D.; SHANKER, K.; SPOTILA, J. R.; TOMÁS, J.; WALLACE, B. P.; WORK, T. M.; ZBINDEN, J.; GODLEY, B. J. Global Research priorities for sea turtle turtles: informing management and conservation in the 21st century. **Endangered Species Research**, v. 11, n. 3, p. 245-269, 2010.

HENDRICKSON, J. R. The green sea turtle *Chelonia mydas* (Linn.) in Malaya and Sarawak. **Proceedings of the Zoological Society of London**, v. 130, p. 455-535, 1958.

HERBST, L. H. Fibropapillomatosis of marine turtles. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 4, p. 389-425, 1994.

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

HERBST, L. H.; GREINER, E. C.; EHRHART, L. M.; BAGLEY, D. A.; KLEIN, P. A. Serological association between spirorchidiasis, herpesvirus infection, and fibropapillomatosis in green turtles from Florida. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 34, n. 3, p. 496-507, 1998.

HERBST, L. H.; JACOBSON, E. R.; KLEIN, P. A.; BALAZS, G. H.; MORETTI, R.; BROWN, T.; SUNDBERG, J. P. Comparative pathology and pathogenesis of spontaneous and experimentally induced fibropapillomas of green turtles (*Chelonia mydas*). **Veterinary Pathology**, v. 36, n. 6, p. 551-564, 1999.

HIRAMA, S.; EHRHART, L. M. Green turtle fibropapillomatosis in three developmental habitats on the east coast of florida. **Florida Scientist**, v. 70, n. 4, p. 435-448, 2007.

HOFF, G. L.; HOFF, D. M. Herpesviruses of reptiles. In: HOFF, G. L.; FRYE, F. L.; JACOBSON, E. R. (Ed.). **Diseases of Amphibians and Reptiles**. New York, USA: Plenum Press 1984, p.159-167.

HUTCHINSON, J.; SIMMONDS, M. **A review of the effects of pollutions on marine turtles.** London, England: Greenpeace international.

IBAMA. INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. Portaria nº 10. Mar 1985. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, D. F, 14 mar. de 1985.

IKONOMOPOULOU, M. P.; HODGE, M.; WHITTIER, J. An investigation of Organochlorine and Polychlorobiphenil Concentrations in the Blood and Eggs of the Carnivorous Flatback Turtle, *Natator depressus*, from Queensland, Australia. **Chelonian Conservation and Biology**, v. 11, n. 2, p. 255-259, 2012.

INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos, DOQ-CGCRE-008; Brasil**. Disponível em: < http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_03.pdf>. Acesso em: 18 maio 2012.

INNIS, C.; TLUSTY, M.; PERKINS, C.; HOLLADAY, S.; MERIGO, C.; WEBER III, E. S. Trace metal and organochlorine pesticide concentrations in cold-stunned juvenile kemp's ridley turtles *(Lepidochelys Kempii)* from Cape Cod, Massachusetts. **Chelonian Conservation and Biology**, v. 7, n. 2, p. 230-239, 2008.

IUCN. **IUCN Red list of threatened species. Version 2010.4.** Disponível em:<www.iucnredlist.org>**.** Acesso em: 04 nov. 2011.

JACOBSON, E. R.; REICHMANN, M. E.; MANSELL, J. L.; SUNDBERGF, J. P.; HAJJAR, L.; EHRHARTLL, L. M.; MURRUG, F. Cutaneous Fibropapillomas of green turtles (*Chelonia mydas*). **Journal of Comparative Pathology**, v. 101, p. 39-52, 1989.

JACOBSON, E. R.; BUERGELT, C.; WILLIAMS, B.; HARRIS, R. K. Herpesvirus in cutaneous fibropapillomas of the green turtle *Chelonia mydas*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 12, n. 1, p. 1-6, 1991.

JENSSEN, B. M.; O., H.; SORMO, E. G.; SKAARE, J. U. Negative relationship between PCBs and plasma retinol in low - contaminated free - ranging gray seal pups *(Halichoerus grypus).* **Environmental Research**, v. 93, n.1, p. 79-87, 2003.

JEPSON, P. D.; BENNETT, P. M.; ALLCHIN, C. R.; LAW, R. J.; KUIKEN, T.; BAKER, J. R.; ROGAN, E.; KIRKWOOD, J. K. Investigating potential associations between chronic exposure to polychlorinated biphenyls and infectious disease mortality in harbour porpoises from England and Wales. **Science of the Total Environment**, v. 243/244, p. 339-348, 1999.

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

KELLER, J. M.; KUCKLICK, J. R.; HARMS, C. A.; MCCLELLAN-GREEN, P. D. Organochlorine contaminants in sea turtles: correlations between whole blood and fat. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, n. 3, p. 726-738, 2004b.

KLEMENS, J. A.; WIELAND, V. J.; FLANAGIN, J. A.; FRICK, R. G.; HARPER, A. A. Cross-taxa Survey of Organochlorine Pesticide Contamination in a Costa Rican wildland. **Environmental Pollution**, v. 122, p. 245-251, 2002.

KOMOROSKE, L. M.; LEWISON, R. L.; SEMINOFF, J. A.; DEHEYN, D. D.; DUTTON, P. H. Pollutants and the health of green sea turtles resident to an urbanized estuary in San Diego, CA. **Chemosphere**, v. 84, n. 5, p. 544-552, 2011.

KUMAR, P.; PAWAIYA, R. Advances in Cancer Diagnostics. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 3, n. 2, p. 141-152, 2010.

LABRADA-MARTAGÓN, V.; MÉNDEZ-RODRÍGUEZ, L. C.; GARDNER, S. C.; LOPEZ CASTRO, M.; ZENTENO-SAVÍN, T. Health indices of the Green turtle (*Chelonia mydas)* along the Pacific coast of Baja California Sur, Mexico. I Blood biochemistry values. **Chelonian Conservation and Biology**, v. 9, n. 2, p. 162-172, 2010a.

LABRADA-MARTAGÓN, V.; MÉNDEZ-RODRÍGUEZ, L. C.; GARDNER, S. C.; CRUZ-ESCALONA, V. H.; ZENTENO-SAVÍN, T. Health indices of the Green turtle (*Chelonia mydas*) along the Pacific coast of Baja California Sur, Mexico. II Body condition index. **Chelonian Conservation and Biology**, v. 9, n. 2, p. 173-183, 2010b.

LABRADA-MARTAGÓN, V.; TENORIO RODRÍGUEZ, P. A.; MÉNDEZ-RODRÍGUEZ, L. C.; ZENTENO-SAVÍN, T. 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 - C Toxicology and Pharmacology**, v. 154, n. 2, p. 65-75, 2011.

LACKOVICH, J. K.; BROWN, D. R.; HOMER, B. L.; GARBER, R. L.; MADER, D. R.; MORETTI, R. H.; PATTERSON, A. D.; HERBST, L. H.; OROS, J.; JACOBSON, E. R.; CURRY, S. S.; KLEIN, P. A. Association of herpesvirus with fibropapillomatosis of the green turtle *Chelonia mydas* and the loggerhead turtle *Caretta caretta* in Florida. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 37, n. 2, p. 89-97, 1999.

LAKE, J. L.; HAEBLER, R.; MCKINNEY, R.; LAKE, C. A.; SADOVE, S. S. PCBs and other chlorinated organic contaminants in tissues of juvenile Kemp's ridley turtles *(Lepidochelys kempi).* **Marine Environmental Research**, v. 38, n. 4, p. 313-327, 1994.

LAMPARELLI, M. **Sistema estuarino de Santos e São Vicente.** São Paulo: CETESB, 2001. (Relatório Técnico CETESB).

LANÇAS, F. M. **Extração em fase sólida (SPE).** São Carlos, SP: RiMa, 2004.

LANDSBERG, J. H.; BALAZS, G. H.; STEIDINGER, K. A.; BADEN, D. G.; WORK, T. M.; RUSSELL, D. J. The Potential Role of Natural Tumor Promoters in Marine Turtle Fibropapillomatosis. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 11, n. 3, p. 199-210, 1999.

LAZAR, B.; MASLOV, L.; ROMANIC, S. H.; GRACAN, R.; KRAUTHACKER, B.; HOLCER, D.; TVRTKOVIC, N. Accumulation of organochlorine contaminants in loggerhead sea turtles, *Caretta caretta*, from the eastern Adriatic Sea. **Chemosphere**, v. 82, n. 1, p. 121-129, 2011.

LIMA, F. J. C.; TANAKA, S. M. C. N.; NUNES, G. S.; SANTOS, T. C. R. D.; CORDEIRO, P. J. M. Análise de Resíduos do Inseticida Metamidofós em Soja e Determinação Final por Cromatografia em Fase Gasosa. **Pesticidas: Revista Ecotoxicologia e Meio ambiente,** Curitiba, v. 13, p. 91-102, 2003.

LUCKES, B. Studies on tumors in cold-blooded vertebrates. **Annual Report of the Tortugas Laboratory of the Carnegie Institute of Washington**, v. 38, p.92-94.

LUTCAVAGE, M. E.; PLOTKIN, P.; WITHERINGTON, B.; LUTZ, P. L. Human impacts on sea turtle survival. In: LUTZ, P. L.; MUSICK, J. A. (Ed.). **The biology of sea turtles.** Boca Raton: CRC Press, 1997. p. 387- 409.

LUTZ, P. L.; MUSICK, J. A. **The Biology of sea turtles**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1997. 432 p.

MACKAY, D.; SHIU, W. Y.; MA, K. C.; LEE, S. C. **Physical-chemical properties and environmental fate handbook.** Boca Raton, Florida: Chapman & Hall, CRCnetBASE, 2000.

MALARVANNAN, G.; TAKAHASHI, S.; ISOBE, T.; KUNISUE, T.; SUDARYANTO, A.; MIYAGI, T.; NAKAMURA, M.; YASUMURA, S.; TANABE, S. Levels and distribution of polybrominated diphenyl ethers and organochlorine compounds in sea turtles from Japan. **Marine Pollution Bulletin**, v. 63, n. 5-12, p. 172-178, 2011.

MARANHO, A.; ATHAYDE, M. A. M.; MENDES, M. C.; CARRIL, N. S. H. K.; OBERG, F. I. Identificação e quantificação do encalhe de tartarugas marinhas na Baixada Santista, Estado de São Paulo no período 2007-2008. In: SIMPÓSIO DE BIOLOGIA MARINHA, 11., 2008, Santos. 2008. (Livro de Resumos).

MARQUES, O. A. V.; NOGUEIRA, C. C.; SAWAYA, R. J.; BÉRNILS, R. S.; MARTINS, M.; MOLINA, F. B.; FERRAREZZI, H.; FRANCO, F. L.; GERMANO, V. J. Fauna Ameaçada de Extinção no Estado de São Paulo: Vertebrados. In: BRESSAN, P. M.; KIERULFF, M. C. M.; SUGIEDA, A. M. (Ed.). **Répteis**. São Paulo: Fundação Parque Zoológico de São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente, 2009. v. 1, p. 645.

MARTINS, M.; MOLINA, F. B. Panorama Geral dos répteis ameaçados do Brasil. In: MACHADO, A. B. M.; DRUMMOND, G. M.; PAGLIA, A. P. (Ed.). **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção.** Brasília: Biodiversidade, 2008.

MASCARENHAS, R.; BATISTA, P.; MOURA, I. F.; CALDAS, A. R.; JOSÉ, M.; NETO, C.; VASCONCELOS, M. Q.; ROSA, S. S.; BARROS, T. V. S. D. Lixo marinho em área de reprodução de tartarugas marinhas no Estado da Paraíba (Nordeste do Brasil). **Revista de Gestão Costeira Integrada**, v. 8, n. 2, p. 221-231, 2008.

MATUSHIMA, E. R.; LONGATTO-FILHO, A.; DI LORETTO, C.; KANAMURA, C. T.; GALLO, B.; BAPTISTOTTE, C. Cutaneous papillomas of green turtles: a morphological and immunohistochemical study in brazilian specimens. In: ANNUAL SYMPOSIUM ON SEA TURTLE CONSERVATION AND BIOLOGY, 19., 1999. Texas: U. S. Dep. Commer. 1999. p. 237-239. (NOAA Tech. Memo. NMFS-SEFSC - 443).

MATUSHIMA, E. R.; LONGATTO-FILHO, A.; DI LORETTO, C.; KANAMURA, C. T.; RAMOS, M. C. C.; SINHORINI, I. L.; GALLO, B. Cutaneous papillomas of green turtles: a morphological, ultrastructural and immunohistochemical study in brazilian specimens. . **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 2, p. 51-54, 2001.

MATUSHIMA, E. R. **Fibropapilomas em tartarugas marinhas:** aspectos histológicos, imuno-histoquímicos e ultra-estruturais. 2003. 111 p. Tese (Livre-Docencia em Patologia) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MCKENZIE, C.; GODLEY, B. J.; FURNES, R. W.; WELLS, D. E. Concentrations and patterns of organochlorine contaminants in marine turtles from Mediterranean and Atlantic waters. **Marine Environmental Research**, v. 47, n. 2, p. 117-135, 1999.

MCKIM JR, J. M.; JOHNSON, K. L. Polychlorinated biphenils and p,p'-DDE in loggerhead and green postyearling Atlantic sea turtles. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 31, n. 1, p. 53-60, 1983.

MCKINNELL, R. G.; CARLSON, D. L. Lucke renal adenocarcinoma, an anuram neoplasm: studies at the interface of pathology, virology, and differentiation competence. **Journal of Cell Physiology**, v. 173, n. 2, p. 115-118, 1997.

MIAO, X.-S.; BALAZS, G. H.; MURAKAWAC, S. K. K.; LI, Q. X. Congener-specific profile and toxicity assessment of PCBs in green turtles *Chelonia mydas* from the Hawaiian Islands. **The Science of the Total Environment**, v. 281, n. 1-3, p. 247-253, 2001.

MÍDIO, A. F.; MARTINS, D. I. **Toxicologia de alimentos**. São Paulo: Varela, 2000. 295 p.

MILTON, S. L.; LUTZ, P. L. Physiological and genetic responses to environmental stress. In: LUTZ, P. L.; MUSICK, J. A.; WYNEKEN, J. (Ed.). **The Biology of Sea Turtles**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1997, p.163-197.

MIRANDA-FILHO, K. C.; CARMELA MONTONE, R.; FILLMANN, G. Compostos Organoclorados. In: BAPTISTA NETO, J. A.; WALLNER-KERSANACH, M.; PATCHINEELAM, S. M. (Ed.). **Poluição Marinha**. Rio de Janeiro, RJ: Editora Interciência Ltda., 2008. p. 440.

MONAGAS, P.; ORÓS, J.; ARAÑA, J.; GONZÁLEZ-DÍAZ, O. M. Organochlorine pesticide levels in loggerhead turtles *(Caretta caretta)* stranded in the Canary Islands, Spain. **Marine Pollution Bulletin**, v. 56, n. 11, p. 1949-1952, 2008.

MOREIRA, L. M. P. **Ecologia reprodutiva e estimativa de ninhos da tartaruga verde-aruanã - *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) (Testudines, Reptilia) na ilha da Trindade - Espírito Santo - Brasil**. 2003. 63 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo, 2003. 63 p.

MORTIMER, J. A. Feeding ecology of sea turtles. In: Bjorndal, K. A. (Ed.). **Biology and conservation of sea turtles**. Washington, D.C.: Smithsonian Institute Press, 1982, p. 103-109.

ORÓS, J.; RODRÍGUES, J. L.; DÉNIZ, S.; FERNANDEZ, L.; FERNANDEZ, A. Cutaneos poxvirus-like infection in a captive Hermann´s tortoise (*Testudo hermanni).* **Veterinary Record**, v. 143, n. 18, p. 508-509, 1998.

PAOLIELLO, M. M. B.; DA SILVA, E. S. Toxicodinâmica. In: DE AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. D. M. (Ed.). **As bases toxicológicas da ecotoxicologia.** São Carlos, SP: Rima Intertox, 2004. p. 93-114.

PASTOR CISCATO, C. H. **Resíduos de praguicidas em amostras de ovo comercializadas na cidade de São Paulo**. 2008. 105 p. Tese (Doutorado em Ciências). Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

PATRÍCIO, A. R.; HERBST, L. H.; DUARTE, A.; VÉLEZ-ZUAZO, X.; LOUREIRO, N. S.; PEREIRA, N.; TAVARES, L.; TORANZOS, G. A. Global phylogeography and evolution of chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus. **Journal of General Virology**, v. 93, n. 5, p. 1035-1045, 2012.

PERUGINI, M.; GIAMMARINO, A.; OLIVIERI, V.; GUCCIONE, S.; LAI, O. R.; AMORENA, M. Polychlorinated biphenils and organochlorine pesticida levels in tissues of *Caretta caretta* from the Adriatic Sea. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 71, n. 2, p. 155-161, 2006.

PRESLEY, S. M.; AUSTIN, G. P.; DABBERT, C. B. Influence of Pesticides and Environmental Contaminants on Emerging Diseases of Wildlife. In: KENDALL, R. J.; LACHER, T. E.; COBB, G. P.; COX, S. B. (Ed.). **Wildlife toxicology:** emerging contaminants and biodiversity issues. Boca Raton, Fl: CRC Press Taylor & Francis Group, 2010, p.73-109.

PRITCHARD, P. C. H. Evolution, phylogeny, and current status. In: LUTZ, P. L.; MUSICK, J. A. (Ed.). **The biology of sea turtles**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1997. p. 1-28.

PRITCHARD, P. C. H.; MORTIMER, J. A. Taxonomía, morfología externa e identificación de las especies. In: ECKERT, K. L.; BJORNDAL, K. A.; ABREU-GROBOIS, F. A.; DONNELLY, Y. M. (Ed.). **Técnicas de investigación y manejo para la conservación de las tortugas marinas**. Pennsylvania: UICN/CSE Grupo de Especialistas en Tortugas Marinas, 2000. p 23-41. (Publicación, n. 4).

PUGH, R. S.; BECKER, P. R. **Sea turtle contaminants:** a review with annotated bibliography. Charleston: National Institute of Standards and Technology, Chemical Science and Technology Laboratory, 2001. p. 144. (NISTIR 6700).

QUACKENBUSH, S. L.; WORK, T. M.; BALAZS, G. H.; CASEY, R. N.; ROVNAK, J.; CHAVES, A.; DUTOIT, L.; BAINES, J. D.; PARRISH, C. R.; BOWSER, P. R.; CASEY, J. W. Three closely related herpesviruses are associated with fibropapillomatosis in marine turtles. **Virology**, v. 246, n. 2, p. 392-399, 1998.

RAGLAND, J. M.; ARENDT, M. D.; KUCKLICK, J. R.; KELLER, J. M. Persistent organic pollutants in blood plasma of satellite-tracked adult male loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, n. 7, p. 1549-1556, 2011.

REIS, E. C.; PEREIRA, C. S.; RODRIGUES, D. D. P.; SECCO, H. K. C.; LIMA, L. M.; RENNÓ, B.; SICILIANO, S. Condição de Saúde das Tartarugas Marinhas do Litoral Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro, Brasil: Avaliação sobre a presença de agentes bacterianos, fibropapilomatose e interação com Resíduos antropogênicos. **Oecologia Australis**, v. 14, n. 03, p. 756-765, 2010.

ROCHA, A. A. **Monitoramento de Agrotóxicos em áreas irrigadas por pivô central na microbacia do Tijunqueiro, município de Morrinhos, Goiás.** 2011. 147 p. Tese (Doutorado em Quimica na Agricultura e no Ambiente) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

RODRIGUES, M. T. Conservação dos répteis brasileiros: os desafios para um país megadiverso. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 87-94, 2005.

ROSSI, S. **Estudo do impacto da Fibropapilomatose em *Chelonia mydas* (LINNAEUS, 1758) (Testudines, Cheloniidae)**. 2007. 104 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo São Paulo, 2007.

ROSSI, S.; SÁNCHEZ-SARMIENTO, A. M.; VANSTREELS, R. E. T.; GUIMARÃES DOS SANTOS, R.; BAPTISTOTTE, C.; LIMA, E. H. S. M.; BECKER, J. H.; MATUSHIMA, E. R. Establecimiento de escores para determinar el grado de severidad de la fibropapilomatosis en *Chelonia mydas* (Testudines, Cheloniidae) capturadas en la costa brasilera. In: CONGRESSO, 2.; CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE REABILITAÇÃO DE FAUNA MARINHA, 2012, Centro de Convívio dos Meninos do Mar - CCMar-FURG, Rio Grande, RS, 2012.

ROSSI, S.; SÁNCHEZ-SARMIENTO, A. M.; VANSTREELS, R. E. T.; GUIMARÃES DOS SANTOS, R.; MATUSHIMA, E. R. A proposal to objectively classify fibropapillomatosis severity in sea turtles considering number and size of tumors. In: ANNUAL SYMPOSIUM

ON SEA TURTLE BIOLOGY AND CONSERVATION, 33., 2013, Baltimore, Maryland, USA. **Proceedings…** 2013.

ROUTTI, H.; JENSSEN, B. M.; LYDERSEN, C.; BACKMAN, C.; ARUKWE, A.; NYMAN, M.; KOVACS, K. M.; GABRIELSEN, G. W. Hormone, vitamin and contaminant status during the moulting/fasting period in rinse seals (*Pusa [Phoca] hispida)* from Svalbard. **Comparative Biochemistry and Physiology - A**, v. 155, n. 1, p. 70-76, 2010.

RYBITSKI, M. J.; HALE, R. C.; MUSICK, J. A. Distribution of organochlorine pollutans in atlantic sea turtles. **Copeia**, n. 2, p. 379-390, 1995.

SAKAI, H.; SAEKI, K.; ICHIHASHI, H.; SUGANUMA, M.; TANABE, S.; TATSUKAWA, R. Species-specific distribution of heavy metals in tissues and organs of loggerhead turtle *(Caretta caretta)* and green turtle (*Chelonia mydas)* from Japanese coastal waters. **Marine Pollution Bulletin**, v. 40, n. 8, p. 701-709, 2000a.

SAKAI, H.; SAEKI, K.; ICHIHASHI, H.; KAMEZAKI, N.; TANABE, S.; TATSUKAWA, R. Growth-related changes in heavy metals accumulation in green turtle (*Chelonia mydas)* from Yaeyama Islands, Okinawa, Japan. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 39, n. 3, p. 378-385, 2000b.

SÁNCHEZ-SARMIENTO, A. M.; ROSSI, S.; VALE, L. A. S.; WERNECK, M. R.; BAPTISTOTTE, C.; GUIMARÃES DOS SANTOS, R.; MATUSHIMA, E. R. Presença de contaminantes ambientais em tecidos de tartaruga-verde (*Chelonia mydas*) provenientes da costa brasileira: estudo da prevalência em animais acometidos pela fibropapilomatose: projeto de pesquisa. In: SEMANA CIENTIFICA BENJAMIN EURICO MALUCELLI, 20., 2011, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2011.

SÁNCHEZ-SARMIENTO, A. M.; VILCA, F. Z.; ROSSI, S.; BECKER, J. H.; MARIGO, J.; TORNISIELO, V. L.; MATUSHIMA, E. R. Determination of organochlorine pesticides in sea turtle liver using a multiresidue method and GC-µECD. In: ANNUAL FLORIDA PESTICIDE RESIDUE WORKSHOP - NORTH AMERICAN CHEMICAL RESIDUE WORKSHOP, 49., 2012, Florida. 2012b.

SÁNCHEZ-SARMIENTO, A. M.; VILCA, F. Z.; ROSSI, S.; BECKER, J. H.; MARIGO, J.; TORNISIELO, V. L.; MATUSHIMA, E. R. Monitoring of organochlorine pesticides in green sea turtle fat using a multiresidue aproach method and GC-µECD. In: ANNUAL FLORIDA PESTICIDE RESIDUE WORKSHOP - NORTH AMERICAN CHEMICAL RESIDUE WORKSHOP, 49., 2012, Florida. 2012a.

SÁNCHEZ-SARMIENTO, A. M.; ROSSI, S.; VANSTREELS, R. E. T.; GUIMARÃES DOS SANTOS, R.; MARIGO, J.; PACHECO BERTOZZI, C.; MATUSHIMA, E. R. Será a

avaliação visual confiável para a classificação da condição corpórea em *Chelonia mydas* (Testudines, Cheloniidae)? In: SEMANA CIENTIFICA BENJAMIN EURICO MALUCELLI, 21., 2012, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2012c.

SÁNCHEZ-SARMIENTO, A. M.; ROSSI, S.; VANSTREELS, R. E. T.; SANTOS, R. G. D.; BAPTISTOTTE, C.; BECKER, J. H.; LIMA, E. H. S. M.; MATUSHIMA, E. R. Distribución anatómica de fibropapilomas en tortugas verdes, *Chelonia mydas* (Testudines, Cheloniidae), capturadas en la costa brasilera. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE REABILITAÇÃO DE FAUNA MARINHA, 2., 2012, Rio Grande, RS. **Resumos...** Rio Grande, RS: Centro de Convívio dos Meninos do Mar - CCMar-FURG, 2012d.

SÁNCHEZ-SARMIENTO, A. M.; ROSSI, S.; VANSTREELS, R. E. T.; GUIMARÃES DOS SANTOS, R.; MARIGO, J.; PACHECO BERTOZZI, C.; BAPTISTOTTE, C.; BECKER, J. H.; MATUSHIMA, E. R. Comparison between corporal subjetive classification and body condition index (BCI) for *Chelonia mydas* (Testudines, Cheloniidae) caught in brazilian coast. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE REABILITAÇÃO DE FAUNA MARINHA, 2., 2012, Rio Grande, RS. **Resumos...** Rio Grande, RS: Centro de Convívio dos Meninos do Mar - CCMar-FURG, 2012e.

SÁNCHEZ-SARMIENTO, A. M.; ROSSI, S.; VILCA, F. Z.; VANSTREELS, R. E. T.; SANTOS, R. G. D.; MARIGO, J.; BERTOZZI, C. P.; TORNISIELO, V. L.; MATUSHIMA, E. R. Monitoring of organochlorine pesticides in juvenile *Chelonia mydas* (Testudines, Cheloniidae) caught in brazilian southeastern coast. In: ANNUAL SYMPOSIUM ON SEA TURTLE BIOLOGY AND CONSERVATION, 33., 2013, Baltimore, Maryland, USA. **Proceedings…** 2013a.

SÁNCHEZ-SARMIENTO, A. M.; ROSSI, S.; VANSTREELS, R. E. T.; SANTOS, R. G. D.; MARIGO, J.; BERTOZZI, C. P.; MATUSHIMA, E. R. Body condition index of *chelonia mydas* (testudines, cheloniidae) with and without fibropapillomatosis along the coast of brazil. In: ANNUAL SYMPOSIUM ON SEA TURTLE BIOLOGY AND CONSERVATION, 33., 2013, Baltimore, Maryland, USA. **Proceedings…** 2013b.

SANTOS, A. L. G.; FURLAN, S. A. Manguezais da baixada santista, São Paulo – Brasil: uma bibliografia. In: SEMINÁRIO LATINO AMERICANO DE GEOGRAFIA FÍSICA, 6.; SEMINÁRIO IBERO AMERICANO DE GEOGRAFIA FÍSICA, 2., 2010, Coimbra, Portugal: Universidade de Coimbra, 2010.

SANTOS, A. S. D.; ALMEIDA, A. D. P.; SANTOS, A. J. B.; GALLO, B. M. G.; GIFFONI, B.; BAPTISTOTTE, C.; COELHO, C. A.; LIMA, E. H. S. M.; SALES, G.; LOPEZ, G. G.; STAHELIN, G.; BECKER, H.; CASTILHOS, J. C.; THOMÉ, J. C. A.; WANDERLINDE, J.; MARCOVALDI, M. Â. A. G. D.; MENDILAHARSU, M. D. L. M. L.; DAMASCENO, M. T.; BARATA, P. C. R.; SFORZA, R. **Plano de Ação Nacional para a Conservação das Tartarugas Marinhas.** Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, ICMBio, 2011.

SANTOS, R. G. D. **Avaliação da população de tartaruga-verde, *Chelonia mydas*, em uma área de alimentação e desenvolvimento degradada no litoral do Espírito Santo, sudeste brasileiro**. 2009. 78 p. Dissertação (Mestrado) - Centro de Ciências Humanas e Naturais., Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, 2009.

SEILS, A.; NOUJAIM, S. R. Target organ toxicity. In: KLAASSEN, C. D.; CASARETT L.; DOULL, J. (Ed.). **Casarett & Doull's toxicology.** 6. ed. New York: McGraw Hill, 2001.

SEMINOFF, J. A.; JONES, T. T.; RESENDIZ, A.; NICHOLS, W. J.; CHALOUPKA, M. Y. Monitoring green turtles (*Chelonia mydas*) at a coastal foraging area in Baja California, Mexico: multiple indices to describe population status. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 83, n. 6, p. 1355-1362, 2003.

SEMINOFF, J. A. ***Chelonia mydas.*** [S.l]: IUCN, 2004. Disponível em: < http://www.iucnredlist.org/details/4615/0>. Acesso em: 12 jan. 2012.

SILVA, J. D. **Ocorrência de pesticidas organoclorados e bifenilos policlorados em tartarugas marinhas *Chelonia mydas***. 2009. 69 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

SMITH, G. M.; COATES, C. W. Fibro-epithelial growths of the skin in large marine turtles *Chelonia mydas* **Zoologica**, v. 23, n. 4, p. 93-98, 1938.

SOLLA, S. R. D. Organic contaminants in reptiles. In: SPARLING, D. W.; LINDER, G.; BISHOP C.A.; KREST, S. (Ed.). **Ecotoxicology of amphibians and reptiles.** Boca Raton, Florida: CRC Press, 2010. p. 944.

STORELLI, M. M.; MARCOTRIGIANO, G. O. Chlorobiphenyls, HCB, and Organochlorine Pesticides in some tissues of *Caretta caretta* (Linnaeus) specimens beached along the Adriatic Sea, Italy. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 64, n. 4, p. 481-488, 2000.

STORELLI, M. M.; BARONE, G.; MARCOTRIGIANO, G. O. Polychlorinated biphenyls and other chlorinated organic contaminants in the tissues of Mediterranean loggerhead turtle *Caretta caretta*. **Science of the Total Environment**, v. 373, p. 456-463, 2007.

SWARTHOUT, R. F.; KELLER, J. M.; PEDEN-ADAMS, M.; LANDRY, A. M.; FAIR, P. A.; KUCKLICK, J. R. Organohalogen contaminants in blood of Kemp's ridley (*Lepidochelys kempii*) and green sea turtles (*Chelonia mydas*) from the Gulf of Mexico. **Chemosphere**, v. 78, n. 6, p. 731-741, 2010.

TAQUET, C.; TAQUET, M.; DEMPSTER, T.; SORIA, M.; CICCIONE, S.; ROOS, D.; DAGORN, L. Foraging of the green sea turtle *Chelonia mydas* on seagrass beds at Mayotte Island (Indian Ocean), determined by acoustic transmitters. **Marine Ecology Progress Series**, v. 306, p. 295-302, 2006.

THOMSON, J. A.; BURKHOLDER, D.; HEITHAUS, M. R.; DILL, L. M. Validation of a Rapid Visual-Assessment Technique for Categorizing the Body Condition of Green Turtles (*Chelonia mydas*) in the Field. **Copeia**, n. 2, p. 251-255, 2009.

TOREZANI, E.; BAPTISTOTTE, C.; MENDES, S. L.; BARATA, P. C. R. Juvenile green turtles (*Chelonia mydas*) in the effluent discharge channel of a steel plant, Espírito Santo, Brazil, 2000–2006. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 90, n. 2, p. 233-233, 2009.

GARDNER, S.; OBERDÖRSTER, E. (Ed.). **Toxicology of reptiles.** Boca Raton, FL: CRC PressTaylor & Francis Group, 2005. 314 p. (New perspectives: Toxicology and the environment).

VAN DE MERWE, J. P.; HODGE, M.; OLSZOWY, H. A.; WHITTIER, J. M.; LEE, S. Y. Using blood samples to estimate persistent organic pollutants and metals in green sea turtles (*Chelonia mydas*). **Marine Pollution Bulletin**, v. 60, n. 4, p. 579-588, 2010.

WALSH, M. Rehabilitation of Sea Turtles. In: ECKERT, K. L.; BJORNDAL, K. A.; ABREU-GROBOIS, F. A.; DONNELLY, M. (Ed.). **Research and management techniques for the conservation of sea turtles**. Pennsylvania: IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication, 1999. p. 202-207.

WEISBURGER, E. K. Chemical carcinogenesis in experimental animals and humans In: SIRICA, A. E. (Ed.). **The pathobiology of neoplasia**. N. Y.: Plenum Press, 1989. p. 39-56.

WORK, T. M.; BALAZS, G. H. Causes of green turtle (*Chelonia mydas*) morbidity and mortality in Hawaii. In: ANNUAL SYMPOSIUM IN THE SEA TURTLE BIOLOGY AND CONSERVATION, 17., 1997, Florida. 1997. p 308-309.

WORK, T. M.; BALAZS, G. H. Relating tumor score to hematology in green turtles with fibropapillomatosis in Hawaii. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 35, n. 4, p. 804-807, 1999.

YLITALO, G. M.; STEIN, J. E.; HOM, T.; JOHNSON, L. L.; TILBURY, K. L.; HALL, A. J.; ROWLES, T.; GREIG, D.; LOWENSTINE, L. J.; GULLAND, F. M. D. The role of organochlorines in cancer-associated mortality in California sea lions (*Zalophus californianus*). **Marine Pollution Bulletin**, v. 50, n. 1, p. 30-39, 2005.

YOGUI, G. T. **Ocorrência de compostos organoclorados (pesticidas e PCBs) em mamíferos marinhos da costa de São Paulo (Brasil) e da Ilha Rei George (Antártica)**. 2002. 139 p. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Química e Biologica) - Instituto Oceanografico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

APÊNDICES

Apêndice A - Relação das informações correspondentes aos espécimes (Localidade, sexo, Biometria, ICC, FPS, FPI e tecidos analisados)

#	ID	Sexo	Biometria (CCC*LCC*Massa)	ICC	FPS	FPI	Tecido analisado	
							Adiposo	Hepático
1	U2	F	40,5cm*37cm*7,5kg	1,381	Ausente		X	X
2	U3	F	43cm*41cm*10kg	1,644	Ausente		X	X
3	U4	M	37,5cm*33,5cm*3kg	0,762	Ausente		X	X
4	U5	F	38,2cm*35,2cm*4,5kg	1,078	Ausente		X	X
5	U6	F	35,5cm*32cm*4kg	1,211	Ausente			X
6	U7	F	37cm*34cm*6,5kg	1,723	Moderada	87	X	X
7	U8	F	57,5cm*52,5*12,6kg	0,831	Leve	42	X	X
8	U9	F	55cm*49cm*15,5kg	1,175	Ausente		X	X
9	U10	F	32cm*29,5*4kg	1,69	Ausente			X
10	U12	F	32,5cm*32cm*4kg	1,608	Leve	4	X	X
11	U13	F	32,2cm*30cm*4,5kg	1,863	Ausente		X	X
12	U14	F	39cm*36,5cm*7kg	1,569	Ausente		X	X
13	U15	F	37,5cm*34,5cm*7kg	1,778	Ausente		X	X
14	U16	M	38cm*37cm*5,5kg	1,339	Ausente			X
15	U17	F	32,5cm*32cm*5kg	2,01	Ausente		X	X
16	U18	F	44cm*39,8cm*11kg	1,682	Leve	40	X	X
17	U19	F	34,3cm*32,5cm*3kg	1,014	Ausente		X	X
18	U20	F	34,5cm*32cm*3,5kg	1,161	Ausente		X	X
19	U21	F	30cm*27,5cm*2,5kg	1,301	Ausente		X	X
20	U22	F	36cm*33cm*3,5kg	1,013	Ausente		X	X
21	U23	F	35,5cm*32cm*4kg	1,211	Ausente		X	X
22	U24	F	33,5cm*29,5cm*4kg	1,458	Ausente		X	X
23	U25	F	34cm*30,7cm*5kg	1,738	Ausente		X	X
24	U26	F	39,3cm*34,5cm*7kg	1,531	Leve	45		X
25	U27	I	37cm*32,6*5kg	1,326	Leve	42		X
26	U28	M	39,5cm*34,4cm*6,5kg	1,399	Moderada	90		X
27	SP1	F	31,6cm*29cm*3,7kg	1,628	Ausente		X	X
28	SP2	I	39cm*36,5cm*6,7kg	1,502	Ausente		X	X
29	SP3	F	38,8cm*35cm*7,4kg	1,686	Ausente		X	X
30	SP6	F	36cm*33cm*5,4kg	1,563	Ausente		X	X
31	SP7	M	35cm*32cm*5,4kg	1,71	Ausente		X	X
32	SP9	F	35,6cm*34,2cm*ND	ND	Ausente		X	X
33	SP10	F	44,8cm*40cm*10,6kg	1,531	Ausente		X	X
34	SP14	F	44cm*43,2cm*10,75kg	1,644	Ausente		X	X
35	SP15	F	48,9cm*43cm*12,95	1,419	Ausente		X	X
36	SP16	F	39,7cm*36,1cm*8,16kg	1,728	Ausente		X	X
37	SP17	F	31cm*30cm*4,1kg	1,919	Ausente		X	X
38	SP18	F	48,4cm*43cm*12,3kg	1,392	Ausente		X	X
39	SP20	F	37cm*34,5cm*6,65kg	1,763	Ausente		X	X
40	SP21	F	40,5cm*38cm*8,7kg	1,73	Ausente		X	X
41	SP22	I	39,7cm*36,8cm*7,9kg	1,673	Ausente		X	X
42	SP24	F	37,3cm*34,9cm*5,75kg	1,486	Ausente		X	X
43	V1	F	38,6cm*35,4cm*5,96kg	1,381	Moderada	52	X	X
44	V2	F	40,3cm*38,7cm*4,84kg	0,977	Leve	14	X	X
45	V3	M	35,1cm*31,7cm*3,56kg	1,117	Ausente		X	X
46	V4	F	37,3cm*34,7cm*6kg	1,55	Ausente		X	X
47	V5	F	32,1cm*29,6cm*3,26kg	1,364	Ausente		X	X
48	V6	M	31,9cm*29,4cm*3,14kg	1,34	Ausente		X	X
49	V7	F	33,5cm*31,7cm*3,42kg	1,247	Severa	102	X	X
50	V9	F	43cm*41cm*9,94kg	1,634	Ausente		X	X
51	V10	F	36,5cm*32,6cm*3,69kg	1,022	Severa	104	X	X
52	V13	F	44,6cm*39,4cm*10,9kg	1,597	Leve	34	X	X
53	V14	F	43,1cm*38,2cm*8,1kg	1,322	Severa	102	X	X
54	V16	M	40,9cm*36,8cm*5,42	1,044	Leve	2		X
55	V18	F	42,4cm*36,6cm*7,62kg	1,31	Severa	110	X	X
56	V19	F	38,3cm*33,4cm*6,78	1,61	Severa	108	X	X
57	V21	M	45cm*39,9cm*9,96kg	1,418	Leve	33	X	X
58	V22	F	43,7cm*40cm*66,5kg	1,016	Moderada	61		X
59	V23	M	37,5cm*34cm*3,9kg	0,991	Leve	47	X	X
60	V27	M	32,6cm*27,7cm*3,26kg	1,297	Severa	136		X
61	V28	F	37,7cm*34,3cm*3,4kg	0,849	Leve	17		X
62	V29	F	41,1cm*38,7cm*5,56kg	1,055	Severa	101		X
63	V31	F	45,2cm*42,8cm*9,96kg	1,399	Leve	45		X
64	V39	F	42,9cm*40,3cm*8,44kg	1,398	Leve	36		X

*ND: Não determinado, M: Macho, F: Fêmea, U: Ubatuba/SP, SP: Praia Grande/SP, V: Vitória/ES.

Apêndice B - Estatística descritiva para cada um dos compostos monitorados no tecido adiposo

	Lipídeos	α-BHC	β-BHC	op'-DDE	pp'-DDE	op'-DDD	pp'-DDD	α-Endosulfan	β-Endosulfan	Sulfato Endosulfan	Heptacloro	Dicofol	Mirex
N	30	43	43	6	26	12	1	13	6	15	42	16	6
Média	1,064%	6,667	13,105	10,145	7,007	13,876	4,233	14,921	9,504	9,520	21,263	251,154	13,068
D.P.	1,095%	6,881	8,053	13,451	4,873	15,483	-	36,847	14,411	16,426	15,301	541,139	5,970
Mínimo	0,000%	2,120	2,338	0,747	1,978	0,964	-	1,900	0,751	0,825	6,256	4,225	4,999
1o. Quartil	0,060%	3,322	6,877	1,046	4,233	2,539	-	2,398	2,619	1,662	10,038	41,357	8,951
Mediana	0,910%	6,181	11,502	4,235	5,524	6,373	-	3,251	5,137	3,737	13,726	86,103	13,264
3o. Quartil	2,210%	7,147	16,602	13,627	8,648	22,988	-	5,515	5,468	6,972	26,555	133,767	18,166
Máximo	2,810%	48,061	33,931	34,915	20,914	41,296	-	136,350	38,639	61,796	62,921	2141,058	19,569
Teste de normalidade (P)	0,0001	0,0001	>0,10	>0,10	0,0045	0,0051	-	0,0001	0,0005	0,0001	0,0001	0,0001	>0,10

Notas: Valores de P menores do que 0,05 indicam que os dados não tiveram distribuição normal, teste de Kolmogorov-Smirnov. Resultados expressos em: $ng.g^{-1}$ peso úmido.

Apêndice C - Estatística descritiva para cada um dos compostos monitorados no tecido hepático

	Lipídeos	α-BHC	β-BHC	op'-DDE	pp'-DDE	op'-DDD	pp'-DDD	α-Endosulfan	β-Endosulfan	Sulfato Endosulfan	Heptacloro	Dicofol	Mirex
N	36	49	31	9	15	6	2	18	8	8	36	15	13
Média	0,123%	5,073	6,016	10,744	6,435	10,297	8,456	17,248	8,049	14,819	18,022	31,596	88,922
D.P.	0,104%	2,041	5,424	8,195	3,768	4,626	3,253	28,083	8,363	30,285	12,433	32,140	175,810
Mínimo	0,020%	2,246	1,230	0,814	2,042	2,639	6,156	2,579	0,770	1,102	5,369	2,012	2,660
1o. Quartil	0,050%	3,337	2,402	7,718	3,666	7,909	7,306	4,572	4,761	1,331	9,557	7,410	5,079
Mediana	0,100%	5,158	4,531	8,623	4,656	12,544	8,456	5,130	5,631	4,620	13,615	16,349	14,299
3o. Quartil	0,153%	6,185	7,832	13,698	9,858	13,445	9,606	12,910	7,072	7,579	21,894	45,478	48,006
Máximo	0,450%	13,356	25,952	29,211	13,478	13,948	10,756	111,157	28,016	89,424	54,436	93,903	597,458
Teste de normalidade (P)	0,0175	>0,10	0,0064	>0,10	0,0607	>0,10	>0,10	0,0001	0,0040	0,0001	0,0091	0,0587	0,0001

Notas: Valores de P menores do que 0,05 indicam que os dados não tiveram distribuição normal, teste de Kolmogorov-Smirnov. Resultados expressos em: $ng.g^{-1}$ peso úmido.

Apêndice D - Concentrações dos grupos de pesticidas monitorados no tecido adiposo

	ΣHCH	ΣmetDDT	ΣEndosulfan	ΣOCS
N	51	51	51	64
Média	16,671	8,114	7,722	103,871
D.P.	13,468	13,723	26,051	290,447
Mínimo	0	0	0	0
1o. Quartil	8,666	0	0	10,348
Mediana	14,114	4,221	1,075	36,579
3o. Quartil	22,592	8,481	3,773	82,366
Máximo	77,403	69,253	174,989	2150,083
Teste de normalidade (P)	0,0027	0,0001	0,0001	0,0001

Notas: ΣHCH: α-BHC, β-BHC; ΣmetDDT: op'-DDE, pp'-DDE, op'-DDD, pp'-DDD; ΣEndosulfan: α-endosulfan, β-endosulfan, Sulfato endosulfan; ΣOCS: suma de todos os pesticidas monitorados. Resultados expressos em $ng.g^{-1}$ peso úmido; 0: valor numérico nulo.

Apêndice E - Concentrações dos grupos de pesticidas monitorados no tecido hepático

	ΣHCH	ΣmetDDT	ΣEndosulfan	ΣOCS
N	64	64	64	64
Média	6,798	4,249	7,709	54,361
D.P.	6,502	8,503	22,150	99,328
Mínimo	0	0	0	0
1o. Quartil	2,901	0	0	12,046
Mediana	5,308	0	0	26,119
3o. Quartil	8,967	3,905	4,676	45,244
Máximo	33,310	39,511	118,222	642,953
Teste de normalidade (P)	0,0014	0,0001	0,0001	0,0001

Notas: ΣHCH: α-BHC, β-BHC; ΣmetDDT: op'-DDE, pp'-DDE, op'-DDD, pp'-DDD; ΣEndosulfan: α-endosulfan, β-endosulfan, Sulfato endosulfan; ΣOCS: soma de todos os pesticidas monitorados. Resultados expressos em: $ng.g^{-1}$ peso úmido; 0: valor numérico nulo.