

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS

AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE METAIS EM TESTUDINES

ALEXANDRA FROSSARD

VILA VELHA

JULHO/2020

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSSISTEMAS

AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE METAIS EM TESTUDINES

Tese apresentada a Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ecossistemas, para a obtenção do título de Doutora em Ecologia.

ALEXANDRA FROSSARD

VILA VELHA

JULHO/2020

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

F938a Frossard, Alexandra
Avaliação toxicológica de metais em Testudines / Alexandra
Frossard – 2020.
144 f.; il.

Orientadora: Adriana Regina Chippari Gomes.

Tese (Doutorado em Ecologia de Ecossistemas),
Universidade Vila Velha, 2020.
Inclui bibliografias.

1. Genética animal. 2. Tartarugas. 3. Enzimas. 4.
Indicadores biológicos. I. Gomes, Adriana Regina Chippari. II.
Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 597.92

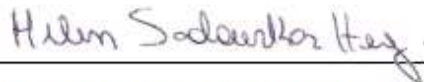
ALEXANDRA FROSSARD

AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE METAIS EM TESTUDINES

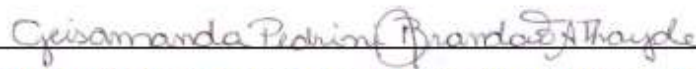
Tese apresentada a Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ecossistemas, para a obtenção do título de Doutora em Ecologia.

Aprovada em 08 de julho de 2020.

Banca Examinadora:



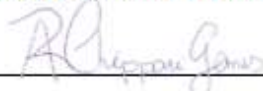
Profa. Dra. Helen Sadauskas Henrique (Unisanta)



Profa. Dra. Geisamanda Pedrini Brandão Athayde (UFES)



Prof. Dr. Marcelo Renan de Deus Santo (UVV)



Profa. Dra. Adriana Regina Chippari Gomes (UVV)
Orientadora

AGRADECIMENTOS

Fui sondada por forças que me ergueram a cada dia durante esses anos de doutorado, pois somente elas me permitiram chegar até aqui. Cada meta estabelecida com muita luta, essa força conduzia-me à vitória, mesmo no final eu mesma não acreditava que ela ainda existia dentro de mim. E por isso, nesta conquista agradeço a Deus por cada passo que fui capaz de traçar.

Agradeço muito aos meus pais Alberto Alexandre e Dalila, e a minha irmã, Bruna, que sempre sonharam os meus sonhos e me apoiaram em minhas escolhas e conquistas.

Agradeço imensamente ao Rodrigo que firmemente se manteve com amor e dedicação nas minhas incansáveis conversas, dúvidas, me motivando a seguir em qualquer das minhas escolhas.

À professora Adriana, pela orientação e a conjunta busca por respostas ainda que diferente de tudo dentro do laboratório, me permitindo continuar com os estudos na herpetologia. O que nos proporcionou momentos de muito aprendizado. Sem minha orientadora jamais chegaria até o final, pois seu carisma, sua força, seu carinho e amor pela profissão me conduziram, como mãe cientista, até aqui.

Ao Professor Levy Gomes, pela luz e apoio constante em muitas dúvidas que foram surgindo antes, durante e depois de todos os campos, análises laboratoriais, textos e foi também meu braço em momentos tão difíceis que foram surgindo.

A todas as parcerias firmadas com ICMBio e IBAMA que desde o início acreditaram e acompanharam o campo e desenvolveram estrutura improvisada mesmo sem verba para o campo da APA Meandros do Araguaia, e todo o apoio logístico no campo do Rio Crixás.

Ao Projeto TAMAR, por acreditar e confiar na pesquisa, nos apoiando nas incansáveis buscas em campo. Foram três anos, três temporadas reprodutivas inteiras coletando junto, respeitando pontos ideais de coletas, auxiliando em tudo no que precisamos nas coletas dentro da REBIO de Comboios.

À Marinha do Brasil, por três temporadas consecutivas auxiliando e apoiando a pesquisa na Ilha da Trindade. O trabalho incansável de proteger os ninhos e evitar perdas. Apreendi muito com esse trabalho conjunto.

Aos colegas do LabPeixe por todos os momentos divididos juntos.

À professora Maria Tereza Carneiro e seus alunos do LabPetro - Núcleo de Competência Química de Petróleo da UFES pela dedicação e disponibilidade nas análises das amostras.

Ao Tommazi e à Lactec pela parceria firmada neste trabalho, sem os quais não seria possível a conclusão da tese.

À todos os amigos e familiares que sempre me apoiaram nessa jornada, entendendo minha ausência em muitos momentos de reuniões e alegrias. Parte das forças que tive vieram de vocês.

À Universidade Vila Velha pela formação de excelência. E à CAPES pelo financiamento do Doutorado.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	13
OBJETIVO E HIPÓTESE GERAL.....	28
REFERÊNCIAS	29

CAPÍTULO 1

Accumulation of trace metals in eggs and hatchlings of *Chelonia mydas*

ABSTRACT	45
INTRODUÇÃO.....	46
MATERIAL E MÉTODOS	48
Área de estudo	48
Aquisição das tartarugas	48
Biometria	49
Coleta de sangue e tecidos.....	49
Quantificação dos metais.....	49
Análises genotóxicas- teste de micronúcleo	50
Análises estatísticas	50
RESULTADOS	51
Biometria	51
Quantificação dos metais.....	52
Análises genotóxicas- teste de micronúcleo	58
DISCUSSÃO	59
CONCLUSÃO	62
AGRADECIMENTOS.....	62
REFERÊNCIAS	63
APENDICES	60

CAPÍTULO 2

Metal bioaccumulation and its genotoxic effects on eggs and hatchlings of South American River Turtles (*Podocnemis expansa*)

RESUMO	72
1. INTRODUÇÃO.....	73
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	75
2.1 Área amostral	75
2.2. Aquisição das amostras	76

2.2.1 Amostragem de sangue e tecidos.....	76
2.2.2 Biometria.....	76
2.3 Análises genotóxicas- teste de micronúcleo.....	76
2.4 Quantificação dos metais.....	77
2.5 Análises estatísticas	77
3. RESULTADOS	78
3.1 Biometria	78
3.2 Quantificação dos metais no sedimento.....	78
3.3 Quantificação de metais em cascas de ovos, conteúdo do ovo, e sma dos tecidos de <i>Podocnemis expansa</i>	78
3.4 Quantificação de metais nos tecidos dos filhotes de <i>Podocnemis expansa</i>	79
3.5 Análises genotóxicas- teste de micronúcleo.....	80
4. DISCUSSÃO.....	80
5. CONCLUSÃO	84
6. AGRADECIMENTOS.....	84
7. CONFORMIDADE COM OS PADRÕES ÉTICOS.....	84
8. REFERÊNCIAS	85
TABELAS	94
FIGURAS.....	99

CAPÍTULO 3

Biomonitoramento com ovos e filhotes de *Caretta caretta* na Reserva Biológica de Comboios, Linhares– ES, Brasil após rompimento da barragem de Mariana/MG

RESUMO.....	106
INTRODUÇÃO.....	107
MATERIAL E MÉTODOS	109
Aquisição dos exemplares	110
Biometria	111
Coleta de sangue e tecidos.....	111
Análises genotóxicas- teste de micronúcleo	112
Análises bioquímicas	112
Quantificação dos metais.....	113
Análises estatísticas	115
RESULTADOS	116
3.1 Biometria	116
3.2 Quantificação dos metais.....	117

3.2.1 Quantificação dos metais no sedimento.....	117
3.2.2 Quantificação dos metais nos ovos tirados diretamente da cloaca das fêmeas no momento da postura comparados com os filhotes (soma dos tecidos) e tecidos biológicos (Casco, Rim, Fígado)	120
3.2.3 Quantificação dos metais nos tecidos dos filhotes recém eclodidos (rim, fígado, casco).....	124
3.3 Análises genotóxicas e Análises Bioquímicas.....	127
DISCUSSÃO	128
CONCLUSÃO	134
Declaração de interesse	135
AGRADECIMENTOS.....	135
REFERÊNCIAS	136
CONSIDERAÇÕES FINAIS	143

RESUMO

FROSSARD, Alexandra, D.Sc, Universidade Vila Velha – ES, julho de 2020.
Avaliação toxicológica de metais em Testudines. Orientadora: Dr^a. Adriana Regina Chippari Gomes.

A presente tese foi realizada com o objetivo de avaliar três diferentes ambientes naturais, utilizando ovos e filhotes recém eclodidos das espécies de testudines, *Podocnemis expansa*, *Chelonia mydas* e *Caretta caretta*, como bioindicadores da presença de metais em ecossistemas marinho e de água doce. Para tal foram realizadas quantificações de metais em ovos coletados no momento da postura (sem contato com o sedimento) e em filhotes recém eclodidos após cerca de 60 dias de incubação, assim como em amostras do sedimento dos ninhos. Dessa forma foi possível averiguar a transferência de metais de origem materna e transferência a partir do sedimento após incubação. Baseada nessas análises a tese foi estruturada em três diferentes capítulos. O primeiro capítulo relata a quantificação de metais (Fe, Mn, Ni, Pb e Cd) em ovos e filhotes recém eclodidos da tartaruga *C. mydas* nas praias da Ilha de Trindade, onde foi identificada a transferência materna de metais, assim como foi observado um aumento na quantidade desses metais provenientes do sedimento. Embora tenha havido aumento na quantidade de metais nas amostras após incubação, os valores ainda se apresentam baixos, sem haver evidências de causarem danos genotóxicos aos filhotes, visto que a frequência de micronúcleo (MN) eritrocitária foi baixa (1,25 ‰). Esses resultados indicam um ambiente insular ainda conservado. No segundo capítulo, foi realizada a avaliação toxicológica comparativa da bioacumulação de metais (Al, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb e Zn) em ovos e filhotes recém eclodidos de tartarugas de água doce, *P. expansa*, incubadas nas areias das praias de dois rios: Araguaia (ambiente protegido da Área de Proteção Ambiental Meandros do Araguaia) e Crixás-Açu, que é menor e que deságua no rio Araguaia. Nesse capítulo, pode-se observar que há transferência materna de metais e que os dois ambientes estão afetados por metais, visto que houve um acúmulo significativo de metais nos ovos e filhotes de *P. expansa*. Contudo, a região do rio Crixás-Açu encontra-se mais afetada, uma vez que as amostras coletadas nesse local apresentam concentrações maiores de metais, e consequentemente uma frequência de MN maior (15 ‰), em contraposição aos valores de 10 ‰ de MN nos filhotes incubados nas areias do rio Araguaia. No terceiro capítulo, foi feito o biomonitoramento de três anos consecutivos da área da foz do Rio Doce após ter sido atingida pela lama de rejeitos proveniente do rompimento da barragem da mineradora Samarco em 2015. Nesse capítulo foram utilizados ovos e filhotes recém eclodidos da espécie de tartaruga marinha *C. caretta*. Foram realizadas coletas na temporada reprodutiva da espécie de 2015/2016; 2016/2017 e 2017/2018, houve ainda uma coleta adicional de sedimento em novembro de 2015 antes da lama atingir a foz do rio. Os resultados indicam que os metais mensurados (Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Sb, Sn, Zn) já se encontravam presentes no sedimento da região antes mesmo do desastre acontecer, sendo acumulados nos ovos e filhotes; assim como houve transferência materna de metais. Contudo esses metais causaram danos genotóxicos maiores nos filhotes coletados na temporada de 2015/2016 (4,52 ‰ de MN); assim como um maior acúmulo de alguns metais nessa primeira coleta. No decorrer dos anos de biomonitoramento,

o ambiente de incubação das praias se mostrou menos tóxico para a incubação desses filhotes do ponto de vista dos danos genotóxicos, em virtude de uma diminuição significativa na frequência de micronúcleos eritrocitários (2,84 ‰ em 2016/2017 e 1,47 ‰ em 2017/2018). Em nenhum dos anos 3 anos de biomonitoramento foram observadas no tecido hepático dos filhotes alterações na atividade enzimática da glutathione S-transferase e da Catalase. Como conclusão geral, este estudo identificou a presença de metais em cascas de ovos e filhotes das três espécies de tartarugas sejam de água doce ou marinha, bem como nos sedimentos das três áreas de biomonitoramento. Os metais encontrados nas cascas de ovos e nas gemas de ovos resultaram da transferência materna, enquanto o aumento dos metais que ocorrem nas cascas de ovos após a incubação e os tecidos dos filhotes foram transferidos dos sedimentos para os ninhos. Contudo obtivemos um ambiente insular que podemos considerá-lo controle para as outras áreas que são impactadas por ações antrópicas.

Palavras – chave: Metais, biomarcadores, acumulação, genotoxicidade, enzimas.

ABSTRACT

FROSSARD, Alexandra, D.Sc., University Vila Velha – UVV - ES, July 2020.
Ecotoxicological Evaluation of Metals in Testudines. Advisor: Dr^a. Adriana Regina Chippari Gomes.

The present thesis was carried out with the objective of evaluating three different natural environments, using eggs and newly hatched chicks of the species of testudines, *Podocnemis expansa*, *Chelonia mydas* and *Caretta caretta*, as bioindicators of the presence of metals in marine and freshwater ecosystems. For this purpose, quantifications of metals were performed in eggs collected at the time of laying (without contact with the sediment) and in newly hatched chicks after about 60 days of incubation, as well as in samples of the nest sediment. In this way it was possible to verify the transfer of metals of maternal origin and transfer from the sediment after incubation. Based on these analyzes, the thesis was structured in three different chapters. The first chapter reports the quantification of metals (Fe, Mn, Ni, Pb and Cd) in eggs and young hatchlings of the turtle *C. mydas* on the beaches of Trindade Island, where maternal metal transfer was identified, as was observed an increase in the amount of these metals from the sediment. Although there was an increase in the amount of metals in the samples after incubation, the values are still low, with no evidence of causing genotoxic damage to the young, since the frequency of erythrocyte micronucleus (MN) was low (1.25 ‰). These results indicate an island environment still conserved. In the second chapter, a comparative toxicological evaluation of the bioaccumulation of metals (Al, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb and Zn) was carried out on eggs and hatchlings of freshwater turtles, *P. expansa*, incubated on the sands of the beaches of two rivers: Araguaia (protected environment of the Meandros do Araguaia Environmental Protection Area) and Crixás-Açu, which is smaller and flows into the Araguaia River. In this chapter, it can be observed that there is a maternal transfer of metals and that both environments are affected by metals, since there was a significant accumulation of metals in the eggs and chicks of *P. expansa*. However, the region of the Crixás-Açu river is more affected, since the samples collected in this place have higher concentrations of metals, and consequently a higher frequency of MN (15 ‰), in contrast to the values of 10 ‰ of MN in the hatchlings incubated in the sands of the Araguaia river. In the third chapter, biomonitoring was carried out for three consecutive years in the area of the mouth of the Rio Doce after being hit by the tailings mud from the rupture of the Samarco mining dam in 2015. In this chapter, newly hatched eggs and hatchlings of the species of sea turtle *C. caretta*. Collections were carried out in the 2015/2016 species breeding season; 2016/2017 and 2017/2018, there was an additional sediment collection in November 2015 before the mud reached the mouth of the river. The results indicate that the metals measured (Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Sb, Sn, Zn) were already present in the region's sediment even before the disaster happened, being accumulated in eggs and chicks; just as there was a maternal transfer of metals. However, these metals caused greater genotoxic damage in the pups collected in the 2015/2016 season (4.52 ‰ of MN); as well as a greater accumulation of some metals in this first collection. During the years of biomonitoring, the beach incubation environment proved to be less toxic for the incubation of these young from the point of view of genotoxic damage, due to a

significant decrease in the frequency of erythrocyte micronuclei (2.84 ‰ in 2016/2017 and 1.47 ‰ in 2017/2018). In none of the 3 years of biomonitoring were changes in the liver tissue of the puppies observed in the enzymatic activity of glutathione S-transferase and Catalase. As a general conclusion, this study identified the presence of metals in egg shells and hatchlings of the three species of turtles, whether freshwater or marine, as well as in the sediments of the three biomonitoring areas. The metals found in egg shells and egg yolks resulted from maternal transfer, while the increase in metals that occur in egg shells after incubation and the tissues of the chicks were transferred from the sediment to the nests. However, we obtained an island environment that we can consider as control for the other areas that are impacted by anthropic actions.

Keywords: Metals, biomarkers, accumulation, genotoxicity, enzymes.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Os elementos químicos, em sua maioria, encontram-se em ciclos bioquímicos e geoquímicos fechados e em concentrações que não causam efeitos nocivos aos organismos. Contudo, ações antrópicas aceleradas promovem alterações ambientais, como o aumento no aporte de contaminantes, a exemplo do carbono orgânico, nitrogênio e o fósforo (considerados nutrientes), metais e sedimentos resultantes de atividades industriais, de mineração, agrícolas com uso de agroquímicos e da circulação de veículos automotores (Pascalichio, 2002; Goonetilleke et al., 2005; Martins, 2008).

Os problemas ambientais causados por contaminantes químicos são de natureza orgânica ou inorgânica. Os poluentes inorgânicos são aqueles de origem mineral como os metais e os orgânicos são aqueles provenientes da decomposição de animais e vegetais, e podem ser sintetizados pelo homem, como por exemplo, os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) (Alcântara, 1985).

Sobre os poluentes inorgânicos, os metais são os mais frequentes nos solos urbanos e agrícolas, sendo que os mais comumente encontrados são cobre, chumbo, ferro, zinco, cádmio e níquel (Pedron et al., 2004). Por serem demasiadamente estáveis na natureza os metais podem ser acumulados no solo, nos sedimentos ou nos sistemas biológicos (Allen et al., 1993). Em consequência dessa estabilidade na natureza os metais são considerados indicadores de poluição (Peláez-Rodríguez, 2001).

De acordo com Förstner e Wittmann (1983) e Carapeto (2012), levando em consideração a potencial poluição ambiental, os metais podem ser classificados como 1- não críticos, 2- tóxicos, mas muito insolúveis ou muito raros, 3- muito tóxicos e relativamente acessíveis. Todos são considerados unidades químicas que possuem capacidade de bioacumulação e biomagnificação nos organismos vivos e persistência no ambiente (Tavares e Carvalho, 1992).

A bioacumulação é caracterizada quando o organismo absorve o composto químico do meio abiótico ou biótico (Leblanc, 1995). Já a biomagnificação ocorre quando a concentração desse composto químico se eleva ao longo da cadeia

alimentar (Reinfelder, 1999). Ambas se encarregam de transformar concentrações consideradas normais em concentrações tóxicas para diferentes espécies. Devido à grande capacidade de persistência dos metais, o efeito ao organismo vivo é garantido, em longo prazo, mesmo após a interrupção das emissões (Tavares e Carvalho, 1992).

Alguns metais, como por exemplo, o zinco, o ferro, o manganês e o cobre são elementos onipresentes, pelo menos em concentrações traço, e são essenciais para o metabolismo, na forma de micronutrientes. Outros, como o Chumbo e o Cádmio, não são necessários à vida das plantas e dos animais, embora existam na natureza, ou formando compostos complexos ou em sua forma elementar (Carapeto, 2012).

Os metais, quando encontrados em concentrações anormais, se inserem em um grupo de substâncias denominadas desreguladoras endócrinas, uma categoria recente de poluentes ambientais que se caracterizam por interferir na funcionalidade do sistema endócrino. A esses poluentes são atribuídas suspeitas de efeitos adversos à saúde animal, como perda de peso, distúrbios comportamentais, danos a diversos órgãos e, em alguns casos, inclusive, esses efeitos podem levar ao declínio populacional (Bila e Dezotti, 2007; Hueza et al., 2008).

A avaliação da qualidade do ambiente em tempo real permite geralmente a obtenção de resultados pontuais, que representam apenas a situação do momento da tomada das amostras. Para que se obtenham dados representativos da variação temporal da qualidade dos ambientes como rios, mares, lagos, e sedimento são necessárias amostragens tomadas em intervalos regulares. Pois, muitos efeitos indiretos e subletais podem ocorrer a médio ou longo prazo, em diferentes intensidades, podendo causar a redução das populações das espécies atingidas (Cabrera et al., 1998; Jensen e Bro-Ramussen 1992), como exemplo dos testudines, utilizados como bioindicadores de biomonitoramento. Dentro da hierarquia da organização biológica dos animais, a exemplo dos testudines, seu comportamento seja enzimático, genotóxico, de bioacumulação, ou até mesmo no desempenho locomotor poderão servir de respostas toxicológicas que refletirão os efeitos causados por

substâncias tóxicas nos organismos em estudo e representar a interação de processos fisiológicos com estímulos ambientais (Grue et al., 2002).

Para a avaliação do grau de exposição à poluição em que os organismos de uma região são expostos utilizam-se espécies denominadas bioindicadoras (Loppi et al., 1998). Por isso, existe uma procura por espécies que podem servir como indicadores de poluentes ambientais e de técnicas de amostragem não destrutivas, bem como os dados comparativos sobre contaminantes em locais diferentes utilizando a mesma espécie. Bioindicadores são fundamentais tanto para avaliar a situação e as tendências de contaminação em uma ampla escala geográfica e temporal (Piotrowski, 1985; Peakall, 1992; Burger e Gochfeld, 2001; Carignan e Villard, 2001), quanto para avaliar a exposição e os efeitos críticos (Burger, 2006). Para ser biologicamente relevante, um indicador deve apresentar mudanças em resposta a um estressor, mas não ser tão sensível às mudanças que ocorram quando não há motivo para preocupação, ou indiquem variações triviais ou sem importância biológica (O'Connor e Dewling, 1986). Desta forma, as mudanças devem ser atribuídas a um estressor particular, e passivo de comprometimento de outras espécies e populações dentro do mesmo ecossistema (Linthurst et al., 1995).

Répteis podem servir como bioindicadores úteis porque muitas espécies são generalistas, tem vida relativamente longa, ocorrem em uma variedade de habitats e ocupam diferentes níveis tróficos (Bauerle et al., 1975; Heinz et al., 1980; Hopkins et al., 1999, Campbell e Campbell, 2001). No entanto, os répteis são raramente incluídos nos estudos de contaminação ambiental e avaliação de riscos ecológicos, embora existam dados sobre os níveis de contaminantes nesta classe de vertebrados (Burger, 1992; Clark et al., 2000; Burger et al., 2002; Campbell e Campbell, 2002; Frossard et al., 2013). O uso de testudines selvagens como bioindicadores ambientais oferece informações importantes sobre os efeitos de poluentes sobre estes animais e até sobre as populações humanas (Bauerle et al., 1975; Stafford et al., 1976; Burger, 1992; Hopkins et al., 1999; Burger et al., 2007).

Assim, o projeto dessa tese tem o objetivo de avaliar a exposição às substâncias químicas que os testudines de três ambientes, do Rio Araguaia com tartarugas da amazônia (*Podocnemis expansa*); da foz do rio Doce onde

ocorreu o desastre do derramamento de lama de rejeitos de mineração na foz do rio Doce com as tartarugas marinhas cabeçuda (*Caretta caretta*); e de um ambiente insular mais distante da costa brasileira, a Ilha de Trindade, com as tartarugas marinhas verde (*Chelonia mydas*). Todas em averiguação para estimar o risco das populações expostas aos possíveis metais existentes no ambiente de nidificação e consequentemente como bioindicadores da saúde ambiental.

Biomonitoramento em ovos e filhotes recém eclodidos de testudines

A avaliação da Saúde Ambiental tem como um de seus principais objetivos, prevenir danos à saúde causados por contaminantes químicos presentes no meio ambiente, fazendo com que os níveis desta exposição sejam mantidos em valores que não constituam um risco inaceitável (Amorim, 2003). Para isso, tornam-se necessárias a identificação e quantificação deste risco através da avaliação biológica da exposição no meio ambiente. A identificação e quantificação dos agentes tóxicos são feitos através do Monitoramento Biológico ou Biomonitoramento, baseado na medida de uma alteração biológica do organismo, causada pelo agente químico. Para conhecer o processo da toxicodinâmica, é preciso conhecer o mecanismo de ação da substância química para identificar quais são os efeitos decorrentes deles (Amorim, 2003). Alguns parâmetros biológicos podem gerar alterações e consequência da interação entre o agente químico e o organismo. Entretanto, a determinação quantitativa destes parâmetros, como Indicadores Biológicos ou Biomarcadores, só é possível se existir correlação com a intensidade da exposição e/ou o efeito biológico da substância (Amorim, 2003). Diante disso, escolhemos as tartarugas para as averiguações ambientais.

A averiguação da Saúde Ambiental das três áreas de estudo desta tese vem direto da origem da contaminação dos filhotes de tartaruga recém-eclodidos que é o sedimento dos ninhos onde os ovos foram incubados. Porém, era esperado graus diferentes de contaminação: i) pelo fato da Área de Proteção Ambiental Meandros do Araguaia se encontrar em um rio que passa por diversas

idades e fazendas, conseqüentemente recebe o aporte de agroquímicos, esgoto doméstico, industrial e da mineração; ii) pelo fato da Ilha de Trindade ter origem vulcânica (Marques et al., 1999); iii) pelo fato da Reserva Biológica de Comboios estar na área de deposição de sedimentos do Rio Doce, o qual sofreu com os impactos do rompimento da barragem de sedimentos de uma mineração (Bianchini, 2016). Para afirmar essa hipótese, foram coletados junto a todo material biológico de dentro dos ninhos, uma amostra de sedimento, para comparação com as cascas e filhotes.

Sabendo que as cascas dos ovos das tartarugas funcionam como uma barreira entre o embrião e o ambiente externo, ela também protege o embrião de possíveis lesões, servindo também como reservatório para grande parte dos elementos essenciais, úteis no desenvolvimento embrionário (Al-Bahry et al., 2009). Decorrido o período de incubação, os filhotes eclodem dos ovos e escavam até a superfície em contato com o sedimento, seguindo em direção ao mar (Carr e Stanczyk, 1975; Carr, 1980). A porosidade das cascas ao qual permite as trocas gasosas entre o embrião e o meio, conseqüentemente permite a entrada de metais para o interior do ovo (Vazquez et al., 1997; Godley et al., 1999). Contudo, amostras de sedimento analisadas por Guirlet et al. (2008) não continham os contaminantes avaliados, sugerindo que a presença dos metais ocorreu, provavelmente, por transferência parental, por isso, nos resultados das pesquisas da tese, foi feita uma comparação do valor de cada metal encontrado nos ovos recém coletados direto da cloaca da mãe, no momento da postura, para estabelecer então o valor final de bioacumulação nos filhotes que passaram pelo biomonitoramento. Deste modo, para entendermos melhor de onde vem a contaminação parental, partimos do pressuposto que tanto as tartarugas marinhas quanto as de água doce, junto a outros grandes vertebrados, são conhecidas como grupos-chave de animais que atuam como sentinelas de distúrbios ambientais, por refletirem ameaças naturais e antropogênicas em uma porção mais ampla do ecossistema (McAloose e Newton, 2009; Fossi et al., 2012; Nicolau et al., 2017). De acordo com o Grupo de Especialistas em Tartarugas Marinhas da International Union for Conservation of Nature - IUCN, as ameaças mais significativas às tartarugas marinhas incluem o desenvolvimento costeiro, o aquecimento global, os impactos das pescarias, os

agentes patogênicos e a poluição (Mast et al., 2005) pelo fato delas gastarem a maior parte de suas vidas forrageando junto às ervas marinhas e macroalgas (Bjorndal, 1985, 1997; Mortimer, 1982; Merwe, 2010) em áreas costeiras rasas e recifes (Balazs, 1985;; Mendonca e Ehrhart, 1982). Os habitats costeiros estão freqüentemente próximos das fontes de poluentes como os metais, que se dirigem para o meio marinho a partir de fontes industriais, domésticas e agrícolas (Newman e Unger, 2003). Estes produtos químicos acumulam-se em animais marinhos quase exclusivamente através da sua dieta (Langston e Spence, 1995) e as concentrações em tartarugas marinhas têm se correlacionado com indicadores de saúde (Day et al., 2007; Keller e McClellan-Green, 2004; Keller et al., 2004, 2006). O monitoramento de metais em *Chelonia mydas* e em *Caretta caretta*, portanto, fornece informações vitais sobre a saúde de indivíduos e populações marinhas.

As tartarugas marinhas são consideradas boas espécies sentinelas por causa de sua longa vida, hábitos alimentares, sua natureza migratória e seus longos períodos de residência em áreas de forrageamento (Keller, 2013; Novilo et al., 2017). Por serem espécies de longa vida, são susceptíveis de bioacumular metais e outros contaminantes em seus tecidos no decorrer dos anos (Caurant et al., 1999, Finlayson et al., 2016). Os estágios recém-nascidos e juvenis são mais sensíveis ao efeito de disruptores ambientais que podem afetar seu desenvolvimento e saúde desses indivíduos no decorrer de suas vidas. Isto é importante nas tartarugas marinhas com estágio juvenil longo, quando aumenta a probabilidade de efeitos deletérios (Brasfield et al., 2004). O comportamento das tartarugas marinhas, particularmente das cabeçudas (*Caretta caretta*), as expõe aos contaminantes de áreas diferentes do planeta (Ragland et al., 2011). Nos primeiros estágios de seu ciclo de vida, as tartarugas cabeçudas são de distribuição oceânica-pelágica. Elas geralmente se movem para habitats neríticos costeiros durante estágios juvenis e adultos, embora alguns estudos mostrarem que parte delas preferem permanecer em áreas pelágicas, mesmo que a diversidade de presas sejam mais pobre nessas águas (Hawkes et al., 2006; Mansfield et al., 2014; Eder et al., 2012). Os filhotes atravessam um estado pelágico no qual seus movimentos são condicionados por correntes e ventos marinhos (Mansfield et al., 2014, Abalo-Morla et al., 2016). Após este estágio, as

tartarugas *C. caretta* abordam as áreas neríticas forrageiras (Bolten e Witherington, 2003), como o Mediterrâneo ocidental, onde se misturam com indivíduos de origem atlântica (Carreras et al., 2006, Clusa et al., 2016) . Após o forrageamento, as tartarugas cabeçudas assim como as das outras espécies marinhas, retornam às suas áreas de nidificação de origem (Bolten e Witherington, 2003).

De acordo com Villa et al. (2016) as áreas de marés e entre-marés onde estão as gramíneas e os tufos de algas, são importantes campos de forrageamento das tartarugas verdes juvenis e adultas (*Chelonia mydas*) (Limpus, 2008). Alguns desses habitats incluem as margens costeiras rasas, que estão sujeitas a impactos antrópicos diversos (e.g. Inundações, escoamento agrícola e industrial, urbanização, dragagem costeira) e podem elevar as concentrações de uma gama de poluentes, incluindo metais. Em áreas poluídas, os oligoelementos, ou seja elemento metálico existente em reduzidas quantidades no organismo, mas que é indispensável para o bom funcionamento orgânico (alumínio, bromo, cobalto, cobre, ferro, flúor, manganésio, iodo e zinco) são tipicamente enriquecidos em água e sedimentos circundantes, bem como nas gramíneas e algas (Talavera-Saenz et al., 2007) que compõem a maior parte da dieta de tartarugas verdes. Tendo alta fidelidade a áreas de forrageamento relativamente pequenas (poucos km²) (Hazel et al., 2013; Shimada et al., 2016) ao longo de várias décadas (Chaloupka et al., 2008), as tartarugas marinhas costeiras residentes podem experimentar exposição a longo prazo em áreas com diversos tipos de contaminantes. Tanto as exposições crônicas como as agudas podem representar riscos significativos para sua saúde e sobrevivência (Camacho et al., 2013; da Silva et al., 2016; Day et al., 2010; Faust et al., 2014; Flint et al., 2014 Labrada-Martagon et al., 2011). Seus traços de história de vida são particularmente relevantes, dado observações frequentes de que doenças crônicas são mais prevalentes em tartarugas verdes de águas costeiras, rasas e poluídas (Foley et al., 2005; Van Houtan et al., 2010). Também há evidências que sugerem que a exposição ao metal está envolvida na etiologia e desenvolvimento de fibropapilomatose, funções imunológicas prejudicadas (da Silva et al., 2016; Grillitsch e Schiesari, 2010) e como fator contribuinte nas encadenações em massa (Flint et al., 2014).

Yipel et al. (2017) descrevem que a principal razão para as diferenças nas concentrações de metal entre *Caretta caretta* e *Chelonia mydas* é a dieta, que difere nas espécies de tartarugas marinhas e também é a principal exposição (Andreani et al., 2008; Gardner et al., 2006). Em particular, a *C. caretta* é carnívora e se alimenta de invertebrados marinhos, enquanto *C. mydas* é herbívora e alimenta algas marinhas e gramíneas (Andreani et al., 2008; D'Ilio et al., 2011). Além disso, alguns pesquisadores têm relatado níveis de metais pesados em peixes, crustáceos e moluscos (Çoğun et al., 2005; Türkmen et al., 2013; Yüzereroğlu et al., 2010), o que leva à biomagnificação (Firat et al., 2008; Duysak e Dural, 2015; Manasirli et al., 2015; Kaymacı e Altun, 2016), enquanto as algas foram relatadas como níveis mais baixos (Topcuoğlu et al., 2010). A acumulação de metal também varia de indivíduo entre as tartarugas, de acordo com a idade e o local de alimentação (Andreani et al., 2008; Gardner et al., 2006; Mattei et al., 2015). A observação de que as concentrações de metal são muitas vezes maiores em *C. caretta* do que em *C. mydas*, com exceção de Cu no sangue e no rim, que é semelhante à relatada por outro estudo que comparou os níveis de metal entre *C. caretta* e *C. mydas* (Sakai et al., 2000), que é um resultado esperado de hábitos alimentares e níveis tróficos (Andreani et al., 2008; Gardner et al., 2006; Mattei et al., 2015). As concentrações mais altas de Cu e Pb em *C. mydas* do que *C. caretta* podem ocorrer pela ingestão de algas, que é a dieta principal de *C. mydas*. As algas também acumulam metais da água em níveis elevados (Gardner et al., 2006). Isso é semelhante ao relato dos estudos que compararam os níveis de metal entre *C. caretta* e *C. mydas* (Sakai et al., 2000). Para contrastar com o estudo de Yipel et al. (2017), Sakai et al. (2000) observaram que os níveis de Pb no sangue e no fígado foram maiores em *C. mydas* do que em *C. caretta*.

Avaliar os efeitos de fatores antropogênicos é uma prioridade de pesquisa global para a conservação de tartarugas marinhas, incluindo os impactos da poluição nas tartarugas (Hamann et al., 2010; Nicolau et al., 2017). De fato, a poluição já foi associada ao declínio de algumas populações de tartarugas (Gordon et al., 1998; Godley et al., 1999; Sakai et al., 2000). Os efeitos subliminares causados por vários poluentes, incluindo oligoelementos, incluem o sucesso reprodutivo prejudicado (Perrault et al., 2011) e também a

deterioração do sistema imunológico e outras funções fisiológicas (Aguirre et al., 1994; Day et al., 2007; Komoroske et al., 2011; Camacho et al., 2013).

O mesmo pode ser observado para as tartarugas de água doce. Diferenças intersticiais nas concentrações de metais podem ser observadas, principalmente devido às diferenças nos comportamentos alimentares das diferentes espécies. Na Amazônia, as espécies de tartarugas da família Podocnemididae são onívoras oportunistas, assim como a tartaruga-da-amazônia *P. expansa* (Vogt, 2008; Schineider et al., 2010). O espectro de itens que essa espécie se alimenta é amplo e inclui frutos, flores, sementes, talos, raízes e folhas arbóreas e herbáceas, além de insetos, crustáceos, moluscos e peixes (Ernst e Barbour, 1989; Pritchard e Trebbau, 1984; Luz, 2005).

Schineider et al. (2010) observaram a falta de relação entre a concentração de mercúrio (Hg) e o tamanho do corpo das seis espécies de testudines de água doce (*Podocnemis unifilis*, *Podocnemis expansa*, *Podocnemis erythrocephala*, *Podocnemis sextuberculata*, *Peltocephalus dumerilianus*, e *Chelus fimbriatus*). Helwig e Hora (1983); Golet e Haines (2001); Schineider et al. (2010), todos sugeriram que não existe correlação entre o tamanho do corpo e a bioacumulação de Hg, pelo fato das tartarugas juvenis estudadas por eles estarem com níveis de Hg semelhantes aos de fêmeas e machos adultos. No entanto, Vogt e Benitez (1993) e Vogt (2008) observaram que *P. sextuberculata* menores apresentaram valores mais elevados de Hg, o que pode ser o resultado de uma mudança na dieta. Além disso, os testudines poderiam também ter obtido Hg da mãe, diretamente dos ovos durante o desenvolvimento embrionário, como foi mostrado para *Chelydra serpentina* por Ashpole et al., 2004, e na *Trachemys scripta* por Burger e Gibbons, 1998. Já Tryfonas et al. (2006) encontraram vestígios em *T. scripta elegans* devido à concentração de metais em sedimentos, água e plantas em contato com os ovos. Em resumo, as diferenças nos níveis de Hg encontrados entre as espécies parecem estar relacionadas à dieta e ao comportamento de forrageamento. Enquanto que Guirlet et al. (2008) fornece os primeiros dados sobre os níveis de cobre, zinco, selênio, cádmio, chumbo e mercúrio (Cu, Zn, Se, Pb e Hg) no sangue e os ovos de tartarugas de couro de vida livre. Geralmente, os metais

não essenciais são bem conhecidos por se acumularem em tecidos, como rim, fígado e pâncreas de tartarugas marinhas (Caurant et al., 1999; Anan et al., 2001), mas outros tecidos como sangue e ovos poderiam ser usados para investigar a exposição recente (Blanvillain et al., 2007).

No que diz respeito aos ovos, eles começam a ser formados na vitelogênese, no processo pelo qual os folículos são provisionados com lipídios que se completam antes da chegada das fêmeas na praia de nidificação (Rostal et al., 1996, 2001). Então, no início da época de reprodução, ao redor do local de nidificação, durante o acasalamento com machos, os folículos maduros serão ovulados e fertilizados (Miller, 1997; Miller et al., 2003). Os ovos fertilizados continuam no oviduto da fêmea onde a albumina é secretada em torno da gema e, finalmente, a casca do ovo é segregada e a partir de daí completamente terminada, uma semana após a ovulação (Miller, 1985), quando termina o processo de produção de ovos em tartarugas marinhas. Nos répteis, a ovulação e o fornecimento de albumina e produção da casca dos ovos, ocorrem progressivamente ao longo da estação de nidificação (Palmer et al., 1993).

Porém, sabendo que o alimento e a água são as principais fontes de exposição dos metais para as tartarugas de água doce ou marinha (Caurant et al., 1999), fatores ecológicos, como a variação nos locais de alimentação, podem levar a variações nos níveis de contaminantes entre as espécies de tartaruga, seja marinha ou de água doce. À medida que as fêmeas adquirem metais através da cadeia alimentar, elas podem armazená-los ou eliminá-los (Burger e Gochfeld, 2000). Uma possível maneira de excretar oligoelementos nas tartarugas é através da reprodução por deposição em seus ovos (Sakai et al., 1995). Cu, Zn e Se são essenciais para o crescimento normal, metabolismo para células vivas e estrutura e função de muitas proteínas vitais para a função celular (Eisler, 1998; Pappas et al., 2006). Assim, uma transferência materna para ovos é necessária para o desenvolvimento bem sucedido dos embriões (Keen et al., 1997). Guirlet et al. (2008) observaram em seus estudos, que concentrações de oligoelementos (metais essenciais) são mais elevadas em ovos e sangue das mães em comparação com elementos não essenciais, refletindo a menor exposição das tartarugas a esses metais tóxicos. Já o Cd, em um estudo sobre

bioacumulação em tartarugas de água doce (*Trachemys scripta* e *Chrysemis picta*), apresentaram níveis mais altos, Burger e Gibbons (1998) sugeriram que a transferência materna para ovos de elementos tóxicos poderia ser vantajosa, pelo fato das fêmeas poderiam se livrar regularmente de uma parte da carga metálica durante os eventos de nidificação. No entanto, surge a questão do impacto desses compostos nos embriões e em seus sistemas fisiológicos (Roe et al., 2004). Contudo, Nagle et al. (2001) descobriram que as tartarugas de água doce (*T. scripta*) que habitavam bacias contaminadas acumulavam múltiplos contaminantes nos indivíduos adultos, sem transferi-lo para os ovos. Por isso a necessidade de averiguar cada espécie bioindicadora existente, em cada local de ocorrência.

Após a averiguação da bioacumulação, os biomarcadores auxiliam a avaliar a exposição (quantidade absorvida ou dose interna), os efeitos das substâncias químicas e a suscetibilidade individual nos bioindicadores. Considerando-se ainda que muitos biomarcadores são indicadores rápidos de efeitos adversos crônicos, eles podem permitir a intervenção antes que efeitos prejudiciais irreversíveis tornem-se inevitáveis (Amorim, 2003). Eventos moleculares e bioquímicos decorrentes da exposição a agentes tóxicos tendem a ser mais sensíveis, menos variáveis e mais altamente conservados do que parâmetros determinados ao nível orgânico (Adams et al., 1990). O uso de biomarcadores bioquímicos em programas de monitoramento oferece algumas vantagens porque são normalmente os primeiros a serem detectados, são bastante sensíveis à presença de determinados poluentes, apresentam alta especificidade, possuem baixo custo de análise e fornecem informações a respeito do efeito metabólico causado pelo xenobiótico (Stegeman et al., 1992).

A exemplo da mutagênese, que induzida por poluentes também pode ocorrer em virtude de modificações no DNA pela formação de aductos com o xenobiótico, seus metabólitos ou, ainda, com os produtos de peroxidação lipídica. Essas mutações geradas por espécies reativas de oxigênio podem induzir a carcinogênese, muito embora a relação entre estresse oxidativo e carcinogênese ainda não esteja bem documentada para tartarugas (Lackner, 1998). Danos na desoxirribose, que usualmente resultam em quebras nas fitas,

também podem ocorrer em consequência da oxidação do DNA. Segundo Zapata et al. (2016) os organismos ectotérmicos exibem períodos de diminuição da atividade metabólica, com eficiência reduzida nos metabolitos ou desintoxicantes de poluentes. Em consequência, os répteis, como as tartarugas, podem ser mais sensíveis aos efeitos de poluentes, tornando-os mais suscetíveis do que endotermas à presença de xenobióticos no meio ambiente (Hall, 1980). No entanto, os répteis foram sub-representados em estudos genotoxicológicos.

Alguns estudos em répteis estabeleceram valores basais de dano do DNA usando o teste de micronúcleo (MN), com foco principalmente em Squamatas e Crocodylia, com valores variando de 0 a 5 MN / 1000 células e 0 a 3 MN / 1000 células, respectivamente (Poletta et al., 2008; Schaumburg et al., 2012; Strunjak-Perovic et al., 2010; Zúñiga-González et al., 2001). Os resultados dos estudos de teste MN que examinaram duas espécies de tartarugas de água doce, um espécime *Macrochelys temminckii* e dois espécimes de *Kinosternon subrubrum* sugeriram que as tartarugas podem não ser bons indicadores de exposição genotóxica usando o teste MN (Zúñiga-González et al., 2000, 2001). No entanto, os resultados de Zapata et al (2016) mostraram um aumento significativo nas frequências de MN em ambientes contaminados, com valores tão altos quanto 45 MN / 1000 células em comparação com o grupo controle, onde as frequências MN estavam próximas de 0. Matson et al. (2005) também encontrou um aumento nas frequências de MN em indivíduos de *Emys orbicularis* que habitam ambientes contaminados em comparação com um local de referência, com valores médios de 9,7 e 6 MN por 1000 glóbulos vermelhos, respectivamente. Frossard et al. (2013) em estudos laboratoriais observaram que *Podocmenis unifilis*, quando expostas ao Cd, a frequência de MN é significativamente maior do que o grupo controle não exposto ao metal, porém a frequência de MN nos animais expostos não aumentou no decorrer do tempo do bioensaio.

As espécies diferem em seus ciclos hematopoiéticos e o tempo necessário para a maturação celular, a vida útil de seus eritrócitos e suas capacidades para eliminar as células danificadas, o que poderia influenciar a frequência de MN encontrada nos tecidos de diferentes espécies (Udroiu, 2006). Enquanto os eritrócitos micronucleados dos órgãos hemopoiéticos refletem

danos genotóxicos que ocorreram durante um tempo equivalente à duração do ciclo celular, os da circulação periférica refletem eventos que ocorreram em um tempo igual ao tempo de vida dos eritrócitos circulantes (Schlegel e MacGregor, 1982). Portanto, a aplicação do teste de micronúcleos em amostras de sangue é indicada para condições de exposição crônica e em estudos ecotoxicológicos realizados *in situ*. No entanto, as espécies que possuem sistemas eficientes para remover células senescentes ou danificadas do sangue também podem não ser sentinelas apropriadas porque tendem a exibir frequências basais de MN perto de zero, apesar de terem contato com xenobióticos (Corazza et al., 1990; Ramírez-Muñoz et al., 1999; Zapata et al., 2016).

Junto aos biomarcadores, Cortés-Gómez et al. (2018) estudaram os testes genotóxicos como o de micronúcleo e o estresse oxidativo, que é um aspecto inevitável da vida aeróbica. É o resultado de um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e as defesas antioxidantes nos organismos. Este estresse oxidativo é produzido pela acumulação celular de ROS, moléculas com fortes propriedades oxidativas (Halliwell e Gutteridge, 2015), o que pode ocorrer como resultado de muitos fatores. Entre eles, a exposição a uma variedade de estressores ambientais, como poluentes, produz aumento da produção de ROS e redução do potencial antioxidante levando ao estresse oxidativo (Hermes-Lima, 2004). Foi demonstrado, em trabalhos *in vivo* e *in vitro*, que a ROS tem potencial para danificar proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, causando danos nos tecidos, disfunção metabólica e morte celular de apoptose (Halliwell e Gutteridge, 2015, Hermes-Lima, 2004).

De acordo com Cortés-Gómez et al. (2018), as tartarugas devem lidar com uma quantidade significativa de ROS gerados como consequência da isquemia periférica associada ao mergulho, como outras espécies marinhas e de água doce, tolerantes à hipoxia (Valdivia et al., 2007;). Consequentemente, trabalhos anteriores relataram produção alta de O₂ (ROS principal) em algumas espécies de tartarugas marinhas e outros animais marinhos (Valdivia et al., 2007;). Além disso, a produção de ROS em ectotermicos marinhos pode ser elevada durante o estresse fisiológico (Abele e Puntarulo, 2004), o que poderia causar oxidação

de proteínas e lipídios, alterações na expressão gênica e alterações no estado redox celular (Sevcikova et al., 2011).

Devido à relação entre os indicadores moleculares do estresse oxidativo e os xenobióticos ambientais (E.g. metais), a catalase (CAT) e a glutathione S-transferase (GST) são considerados indicadores dos mecanismos de defesa celular contra ROS e, portanto, são importantes ferramentas como biomarcadores da exposição à poluição (Morcillo et al., 2016; Cortés-Gómez et al., 2018). Contudo, existem poucos estudos que relacionam atividade enzimática e metais para animais de vida selvagem, já que a maioria é desenvolvida em experimentos controlados em laboratório. No caso das tartarugas marinhas, qualquer literatura sobre o estresse oxidativo é recente e muito limitada (Finlayson et al., 2016). Com relação às atividades enzimáticas antioxidantes, Labrada-Martagon et al. (2011), trabalharam com GST e CAT no sangue de animais vivos (*Chelonia mydas*), e Valdivia et al. (2007) com tartarugas mortas acidentais. Eles realizaram trabalhos extensivos em três populações costeiras de tartarugas verdes (*Chelonia mydas*). Relacionaram o estado antioxidante analisados para produção de radióxido de superóxido (O₂ U-), peroxidação lipídica (medida como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, TBARS) e atividade enzimática antioxidante superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione S-transferase (GST), com poluentes orgânicos e inorgânicos nos tecidos sanguíneos, hepáticos e renais. Outros trabalhos também correlacionaram as atividades enzimáticas antioxidantes do sangue de tartarugas marinhas de pente (*Eretmochelys imbricata*), metais com *Lepidochelys olivacea* (Cortés-Gómez et al., 2018), organoclorados e brevetoxina com *Lepidochelys kempii* (Perrault et al. 2014; Tremblay et al., 2017). No que diz respeito à proteção celular e ao estresse oxidativo, encontramos apenas um trabalho em duas populações diferentes de tartarugas marinhas (*C. Caretta* e *C. mydas*) relacionando metalotioneínas (MT) e metais (Zn, Cu, Fe, Mn, Cd e Pb) (Andreani et al., 2008), porém nada foi relatado para tartarugas tanto marinhas quanto de água doce para filhotes recém eclodidos.

Diante de tudo que foi descrito, a principal razão para a utilização do biomonitoramento nas três diferentes áreas é o fato de obter informações sobre

os efeitos biológicos dos possíveis metais presentes na região, bem como pistas sobre os mecanismos de ação desses metais, que não correspondem apenas à quantificação desses poluentes nos diferentes ambientes, mas também às consequências na vida selvagem. Assim, os biomarcadores podem ser usados para identificar sinais iniciais de danos às tartarugas, sugerir as relações de causa-efeito entre a exposição aos metais e os efeitos observados e então documentar os efeitos integrados do estresse químico nos animais. Por isso o projeto de tese avaliou os ovos coletados diretamente da cloaca das fêmeas na hora da postura, antes mesmo deles encostarem no sedimento da praia, para averiguar o quanto de metais a mãe passa para o filhotes. Porque, em primeiro lugar, a longa vida das tartarugas, as torna propensas a acumular contaminantes ao longo dos anos. Em segundo lugar, elas absorvem poluentes dos animais e vegetais que elas consomem, o que também aumenta a probabilidade de biomagnificação e armazenamento de substâncias perigosas por longos períodos. E finalmente, enquanto os testudines no geral mergulham, seja no rio ou no mar, eles absorvem substâncias de diferentes territórios, o que poderia refletir diferenças zonais de contaminantes. Tudo isso, com possibilidades de passar para os ovos e para as futuras gerações. A partir desses valores, averiguou-se o quanto foi acrescentado aos filhotes durante o tempo de incubação enquanto os ovos estavam em contato com o sedimento das praias de cada um dos três ambientes, divididos por capítulos, e também foram averiguados biomarcadores de exposição e efeitos.

OBJETIVO E HIPÓTESE GERAL

Diante de todo o exposto, o presente trabalho buscou avaliar a possível contaminação por metais de ovos e filhotes recém-eclodidos de três espécies de testudines (*Podocnemis expansa*, *Chelonia mydas* e *Caretta caretta*) a partir de transferência materna e/ou a partir do sedimento dos ninhos onde foram incubados.

A hipótese geral do trabalho é de que há transferência de metais da fêmea para os ovos durante sua produção e de que há um acréscimo de metais do

sedimento de incubação para os filhotes recém eclodidos, seja em qualquer espécie ou no ambiente.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abele, D., Puntarulo, S., 2004. Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. *Comp. Biochem. Physiol., A* 138, 405–415.

Alcântara HR. 1985. Toxicologia clínica e forense. 2. ed. São Paulo: Organização Andrei LTDA, 427p.

Abalo-Morla S., Tomás J., Revuelta O., Esteban J.A., Eymar J., Crespo J.L., Belda E.J. 2016. Survival of reintroduced post-neonates loggerheads using satellite monitoring. 36th Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation. Lima, Peru.

Adams S.M., Shugart L.R., Southworth G.R., Hinton D.E. 1990. Application of bioindicators in assessing the health of fish populations experiencing contaminant stress. In: MCCARTHY, J.F. & SHUGART, L.R. (eds.) *Biomarkers of environmental contamination*, Boca Raton, Lewis Publishers, p. 333-353.

Aguirre A.A., Balaz G.H., Zimmerman B., Galey F.D. 1994. Organic contaminants and trace metals in the tissues of green turtles (*Chelonia mydas*) afflicted with fibropapillomas in the Hawaiian Islands. *Mar. Pollut. Bull.* 28, 109-114.

Allen HE, Fu G, Deng B. 1993. Analysis of Acid-Volatile Sulfide (AVS) and simultaneously extracted metals (SEM) for the Estimation of Potencial toxicity in Aquatic Sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12: 1441-1453.

Al-Bahry S., Mahmoud I., Elshafie A., Al-Harthi A., Al-Ghafri S., Al-Amri I., Alkindi A. 2009. Bacterial flora and antibiotic resistance from eggs of green turtles *Chelonia mydas*: An indication of polluted effluents. *Marine Pollution Bulletin*. V 58- 5: 720-725.

Amorim L.C.A. 2003. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. *Rev. Bras. Epidemiol.* 158 – 6, 2.

Anan Y., Kunito, T., Watanabe I., Sakai H., Tanabe S. 2001. Trace element accumulation in hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) and green turtles (*Chelonia mydas*) from Yaeyama Islands, Japan. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 2802–2814.

Andreani G., Santoro M., Cottignoli S., Fabbri M., Carpena E., Isani G. 2008. Metal distribution and metallothionein in loggerhead (*Caretta caretta*) and green (*Chelonia mydas*) sea turtles. *Sci. Total Environ.* 390, 287–294.

Ashpole S.L., Bishop C.A., Brooks R.J. 2004. Contaminant residues in snapping turtle (*Chelydra s. serpentina*) eggs from the Great Lakes–St. Lawrence River Basis (1999 to 2000). *Arch Environ Contam Toxicol* 47:240–252.

- Balazs G.H. 1985. Growth rates of immature green turtles in the Hawaiian Archipelago. In: Bjorndal, K.A. (Ed.), *Biology and Conservation of Sea Turtles*. Smithsonian Institution Press, Washington, DC, pp. 117–125.
- Bauerle B., Spencer D.L., Wheeler W. 1975. The use of snakes as a pollution indicator species. *Copeia* :366–8.
- Bianchini A. 2016. Relatório: Avaliação do impacto da lama/pluma Samarco sobre os ambientes costeiros e marinhos (ES e BA) com ênfase nas Unidades de Conservação 1a Expedição do Navio de Pesquisa Soloncy Moura do CEPISUL/ICMBio. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Bjorndal K.A. 1985. Nutritional ecology of sea turtles. *Copeia* 1985, 736–751.
- Bjorndal K.A. 1997. Foraging ecology and nutrition of sea turtles. In: Lutz, P.L., Musick, J.A. (Eds.), *The Biology of Sea Turtles*. CRC Press, Boca Raton, pp. 199–231.
- Blanvillain G., Schwenter J.A., Day R.D., Point D., Christopher S.J., Roumillat W.A., Owens D.W. 2007. Diamondback terrapins, *Malaclemys terrapin*, as a sentinel species for monitoring mercury pollution of estuarine systems in South Carolina and Georgia, USA. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 1441–1450.
- Bila D.M., Dezotti M. 2007. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. *Química Nova*, 30: 651-666.
- Bolten A.B., Witherington B.E. (Eds.). 2003. *Loggerhead Sea Turtles*. Washington, DC. 352 p.
- Brasfield S., Bradham K., Wells J., Talent L., Lanno R., Janz D. 2004. Development of a terrestrial vertebrate model for assessing bioavailability of cadmium in the fence lizard (*Sceloporus undulatus*) and in ovo effects on hatchling size and thyroid function. *Chemosphere* 54, 1643–1651.
- Burger J., Gibbons J.W. 1998. Trace elements in egg contents and egg shells of slider turtles (*Trachemys scripta*) from the savannah river site. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 34, 382–386.
- Burger J. 1976. Trace elements in egg contents and egg shells of slider turtles (*Trachemys scripta*) from the Savannah River Site. *Arch Environ Contam Toxicol* 34:382–386.
- Burger J. 1992. Trace element levels in pine snake hatchlings: tissue and temporal differences. *Arch Environ Contam Toxicol*; 22:209–13.
- Burger J., Campbell K.R., Murray S., Campbell T.S., Gaines K.F., Jeitner C., Shukla T., Burke S., Gochfeld M. 2007. Metal levels in blood, muscle and liver

of water snakes (*Nerodia* spp.) from New Jersey, Tennessee and South CarolinaV 373, 2–3, p 556–563.

Burger J. 2006. Neurotoxicology and behavioral effects in reptiles. In: Gardner SC, Oberdorster E, editors. Toxicology of reptiles. Boca Raton, FL: Taylor & Francis; p. 173–98.

Burger J., Gochfeld M. 2001. On developing bioindicators for human and ecological health. Environ Monit Assess;66:23–46.

Burger J., Gochfeld M., Rooney A.A., Orlando E.F., Woodward A.R., Guillette Jr. L.J. 2002. Metals and metalloids in tissues of American alligators in three Florida lakes. Arch Environ Contam Toxicol;38:501–8.

Cabrera C., Ortega E., Lorenzo M.L., Lopez M.D.C. 1998. Cadmium Contamination of vegetable crops, farmlands, and irrigation waters. Reviews of Environment Contamination and Toxicology, 154: 55-81.

Camacho M., Orós J., Boada L.D., Zaccaroni A., Silvi M., Formigaro C., López P., Zumbado M., Luzardo O.P. 2013. Potential adverse effects of inorganic pollutants on clinical parameters of loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*): Results from a nesting colony from Cape Verde, West Africa. Mar. Environ. Res. 92, 15-22.

Campbell K.R., Campbell T.S. 2001. The accumulation and effects of environmental contaminants on snakes: a review. Environment Monitoring. Assess;70:253–301.

Campbell K.R., Campbell T.S. 2002. A logical starting point for developing priorities for lizard and snake ecotoxicology: a review of available data. Environment Toxicology and Chemistry;21:894–8.

Carr, A. 1980. Some problems of Sea Turtle Ecology. Amer. Zool. v. 20: 489-498.

Carr, A.; Stancyk, S. 1975. Observation on the ecology and survival outlook of the hawksbill turtle. Biol. Conserv. v. 8: 161-172.

Carreras C., Pont S., Maffucci F., Pascual M., Barcelo A., Bentivegna F., Cardona L., Alegre F., SanFélix M., Fernandez G. 2006. Genetic structuring of immature loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) in the Mediterranean Sea reflects water circulation patterns. Mar. Biol. 149, 1269–1279.

Carapeto C. Metais pesados. Disponível em < <http://www.antonio-fonseca.com/Unidades%20Curriculares/2-Ano/Poluicao/1%20Licoes/13%20-%2014%20-%2015/METAIS.pdf> > Acesso em 15 dez 2012.

Carignan V., Villard M.A. 2001. Selecting indicator species to monitor ecological integrity: a review. *Environment Monitoring Assess*;78:45–61.

Caurant F., Bustamante P., Bordes M., Miramand P. 1999. Bioaccumulation of cadmium, copper and zinc in some tissues of three species of marine turtles stranded along the French Atlantic coasts. *Mar. Pollut. Bull.* 38, 1085–1091.

Chaloupka M., Bjorndal K.A., Balazs G.H., Bolten A.B., Ehrhart L.M., Limpus C.J. 2008. Encouraging outlook for recovery of a once severely exploited marine megaherbivore. *Glob. Ecol. Biogeogr.* 17 (2), 297e304. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1466-8238.2007.00367.x>.

Clark Jr.D.R., Bickham J.W., Baker D.L., Cowman D.F. 2000. Environmental contaminants in Texas, USA, wetland reptiles: evaluation using blood samples. *Environment Toxicology and Chemistry*;19:2259–65.

Clusa M., Carreras C., Pascual M., Gaughran S., Piovano S., Avolio D. 2016. Potential bycatch impact on distinct sea turtle populations is dependent on fishing ground rather than gear type in the Mediterranean Sea. *Mar. Biol.* 163, 122.

Corazza G., Ginaldi L., Zoli G., Frisoni M., Lalli G., Gasbarrini G., Quaglini D. 1990. Howell–Jolly body counting as a measure of splenic function, are-assessment. *Clin.Lab.Haematol.* 12(3) ,269–275. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2257.1990.tb00037.x>.

Cortés-Gómez A.A., Morcillo P., Guardiola F.A., Espinosa C., Esteban M.A., Cuesta A., Girondot Marc, Romero D. 2018. Molecular oxidative stress markers in olive ridley turtles (*Lepidochelys olivacea*) and their relation to metal concentrations in wild populations . *Environmental Pollution* 233, 156e167.

Çoğun H., Yüzereroğlu T.A., Kargin F., Firat Ö. 2005. Seasonal variation and tissue distribution of heavy metals in shrimp and fish species from the Yumurtalik coast of Iskenderun Gulf, Mediterranean. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 75, 707–715.

da Silva C.C., Klein R.D., Barcarolli I.F., Bianchini A. 2016. Metal contamination as a possible etiology of fibropapillomatosis in juvenile female green sea turtles *Chelonia mydas* from the southern Atlantic Ocean. *Aquat. Toxicol.* 170, 42e51. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.11.007>.

Day R.D., Keller J.M., Harms C.A., Segars A.L., Cluse W.M., Godfrey M.H. 2010. Comparison of mercury burdens in chronically debilitated and healthy loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *J. Wildl. Dis.* 46 (1), 111e117. <http://dx.doi.org/10.7589/0090-3558-46.1.111>.

- Day R.D., Segars L., Arendt M.D., Lee A.M., Peden-Adams M.M. 2007. Relationship of blood mercury levels to health parameters in the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*). *Environ. Health Perspect.* 115, 1421-1428.
- D'ilio S., Mattei D., Blasi M.F., Alimonti A., Bogialli S. 2011. The occurrence of chemical elements and POPs in loggerhead turtles (*Caretta caretta*): an overview. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 1606–1615.
- Duysak Ö., Dural M. 2015. Heavy metal concentrations in tissues of short-finned Squid *Illex coindetii* (Cephalopoda: Ommastrephidae) (Vérany, 1839) in Iskenderun Bay, North-Eastern Mediterranean. *Pak. J. Zool.* 47, 447–453.
- Eder E., Ceballos A., Martins S., Pérez-García H., Marín I., Marco A., Cardona L. 2012. Foraging dichotomy in loggerhead sea turtles *Caretta caretta* off northwestern Africa. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 470, 113–122.
- Eisler R. 1988. Lead hazards to fish, wildlife, and invertebrates: A synoptic review. US Fish and Wildlife Service. Biological Report 85- 1.14.
- Ernst C.H., Barbour R.W. 1989. Turtles of the world. Washington and London: Smithsonian Institution. 313 p.
- Faust D.R., Hooper M.J., Cobb G.P., Barnes M., Shaver D., Ertolacci S. 2014. Inorganic elements in green sea turtles (*Chelonia mydas*): relationships among external and internal tissues. *Environ. Toxicol. Chem.* 33 (9), 2020e2027. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.2650>.
- Finlayson K.A., Leusch F.D.I., van der Merwe J.P. 2016. The current state and future directions of marine turtle toxicology research. *Environ. Int.* 94, 113–123.
- Firat Ö., Gök G., Çoğun H.Y., Yüzereroğlu T.A., Kargin F. 2008. Concentrations of Cr, Cd, Cu, Zn and Fe in crab *Charybdis longicollis* and shrimp *Penaeus semisulcatus* from the Iskenderun Bay, Turkey. *Environ. Monit. Assess.* 147, 117–123.
- Flint M., Eden P.A., Limpus C.J., Owen H., Gaus C., Mills P.C. 2014. Clinical and pathological findings in green turtles (*Chelonia mydas*) from gladstone, Queensland: investigations of a stranding epidemic. *Ecohealth* 1e12. <http://dx.doi.org/10.1007/s10393-014-0972-5>.
- Foley A.M., Schroeder B.A., Redlow A.E., Fick-Child K.J., Teas W.G. 2005. Fibropapillomatosis in stranded green turtles (*Chelonia mydas*) from the eastern United States (1980-98): trends and associations with environmental factors. *J. Wildl. Dis.* 41 (1), 29e41. <http://dx.doi.org/10.7589/0090-3558-41.1.29>.
- Förstner U., Wittmann G.T.W. 1983. Metal pollution in the aquatic environment. 2.ed. New York: Springer-Verlag, 230p.

Fossi M.C., Panti C., Guerranti C., Coppola D., Giannetti M., Marsili L., Minutoli R. 2012. Are baleen whales exposed to the threat of microplastics? A case study of the Mediterranean fin whale (*Balaenoptera physalus*). Mar. Pollut. Bull. 64, 2374–2379.

Frossard A., Ferreira P.D., Carneiro M.T.W.D., Heringer D.C., Endringer O.A., Gomes L.C. 2013. Effect of dietary cadmium on fitness, growth, genotoxicity and accumulation in the Yellow-spotted River Turtle, *Podocnemis unifilis*. Aquatic Toxicology 140– 141, 239– 241.

Gardner S.C., Fitzgerald S.L., Vargas B.A., Rodríguez L.M. 2006. Heavy metal accumulation in four species of sea turtles from the Baja California peninsula, Mexico. Biometals 19, 91–99.

Goonetilleke A., Thomas E., Ginn S., Gilbert D. 2005. Understanding the role of land use in urban storm water quality management. Journal of Environmental Management, 74: 31-42.

Godley B.J., Thompson D.R., Furness R.W. 1999. Do heavy metal concentrations pose a threat to marine turtles from the Mediterranean Sea? Mar. Pollut. Bull. 38, 497-502.

Golet W.J., Haines T.A. 2001. Snapping turtles (*Chelydra serpentina*) as monitors for mercury contamination of aquatic environments. Environ Monit Assess 71:211–220.

Gordon A.N., Pople A.R., Ng J. 1998. Trace metal concentrations in livers and kidneys of sea turtles from south-eastern Queensland, Australia. Mar. Freshwater. Res. 49, 409–414.

Grillitsch B., Schiesari L. 2010. Chp. 12 the ecotoxicology of metals in reptiles. In: Sparling, D.W., Linder, G., Bishop, C.A., Krest, S.K. (Eds.), Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles, second ed. CRC Press, pp. 337e448. <http://dx.doi.org/10.1201/EBK1420064162-c12>.

Grue C.E., Gardner S.C., Gibert P.L. 2002. On the Significance of Pollutant-induced Alterations in the Behaviour of Fish and Wildlife. Pp 1-90. In: G. Dell'Omo (ed.), Behavioural Ecotoxicology. John Wiley & Sons, LTD.

Guirlet E., Das K., Girondot M. 2008. Maternal transfer of trace elements in leatherback turtles (*Dermochelys coriacea*) of French Guiana. Aquatic Toxicology. 88. 267–276.

Hall R.J. 1980. Effects of Environmental Contaminants on Reptiles: A Review. United States Department of the Interior, Fish and Wildlife Service, special scientific report-wildlife no. 228. Washington D.C., USA. 12pp.

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., Cheng, I.J., 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., 2010. Global research priorities for sea turtles: informing management and conservation in the 21st century. *Endanger. Species Res.* 11, 245–269.

Hawkes L.A., Broderick A.C., Coyne M.S., Godfrey M.H., Lopez-Jurado L.F., Lopez-Suarez P., Godley B.J. 2006. Phenotypically linked dichotomy in sea turtle foraging requires multiple conservation approaches. *Curr. Biol.* 16, 990–995.

Hazel J., Hamann M., Lawler I.R. 2013. Home range of immature green turtles tracked at an offshore tropical reef using automated passive acoustic technology. *Mar. Biol.* 160 (3), 617e627. <http://dx.doi.org/10.1007/s00227-012-2117-0>.

Heinz G., Haseltine S.D., Hall R.J., Krynitsky A.J. 1980. Organochlorine and mercury residues in snakes from Pilot and Spider Islands, Lake Michigan-1978. *Bull Environ Contaminant Toxicology*; 25:738–43.

Helwig D., Hora M. 1983. Polychlorinated biphenyl, mercury and cadmium concentrations in Minnesota snapping turtles. *Bull Environ Contam Toxicol* 30:186–191.

Hopkins W.A., Rowe C.L., Congdon J.D. 1999. Elevated trace element concentrations and standard metabolic rate in banded water snake (*Nerodia fasciata*) exposed to coal combustion wastes. *Environmental Toxicology and Chemistry*;18:1258–63.

Hueza I.M., Sant'anna M.G., Palermo-Neto J. 2008. Toxicologia do chumbo, mercúrio, arsênio e outros metais. In: Spinosa, H.S.; Górniak, S.L.; Palermo-Neto, J (Ed.). *Toxicologia aplicada a Medicina Veterinária*. São Paulo. Manole, P. 641-662.

Jensen A., Bro-Ramussen F. 1992. Environmental cadmium in Europe. *Reviews of Environment Contamination and Toxicology*, 125:101-181.

Kaymacı S., Altun B.E. 2016. Seasonal variation in the accumulation of trace elements and contaminants in five shrimp species from Iskenderun Bay and their consumability as human food. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 97, 237–243.

- Keen C.L., Taubeneck M.W., Zidenberg-Cherr S., Daston G.P., Rogers J.M. 1997. Toxicant exposure and trace element metabolism in pregnancy. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 4, 301–308.
- Keller K.M. 2013. Exposure to and effects of persistent organic pollutants. In: Wyneken, J., et al. (Eds.), *The Biology of Sea Turtles*. vol. III. CRC Press, Boca Raton, USA, pp. 285–328.
- Keller J.M., McClellan-Green P.D. 2004. Effects of organochlorine compounds on cytochrome P450 aromatase activity in an immortal sea turtle cell line. *Mar. Environ. Res.* 58, 347–351.
- Keller J.M., Kucklick J.R., Stamper M.A., Harms C.A., McClellan-Green P.D. 2004. Associations between organochlorine contaminant concentrations and clinical health parameters in loggerhead sea turtles from North Carolina, USA. *Environ. Health Perspect.* 112, 1074–1079.
- Keller J.M., Peden-Adams M.M., Aguirre A.A. 2006. Immunotoxicology and implications for reptilian health. In: Gardner, S.C., Oberborster, E. (Eds.), *Toxicology of Reptiles*. CRC Press, Boca Raton, pp. 199–240.
- Komoroske L.M., Lewison R.L., Seminoff J.A., Deheyn D.D., Dutton P.H. 2011. Pollutants and the health of green sea turtles resident to an urbanized estuary in San Diego, CA. *Chemosphere* 84, 544–552.
- Labrada-Martagon V., Rodriguez P.A., Mendez-Rodriguez L.C., Zenteno-Savin T. 2011. Oxidative stress indicators and chemical contaminants in East Pacific green turtles (*Chelonia mydas*) inhabiting two foraging coastal lagoons in the Baja California peninsula. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 154 (2), 65e75. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.02.006>.
- Lackner, R. 1998. “Oxidative stress” in fish by environmental pollutants. In: Braunbeck, T., Hinton, D.E., Streit, B. (eds.) *Fish ecotoxicology*. Basel, Switzerland, Birkhäuser Verlag, p. 203-224.
- Langston, W.J., Spence, S.K., 1995. Biological factors involved in metal concentrations observed in aquatic organisms. In: Tessier, A., Turner, D.R. (Eds.), *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*. John Wiley and Sons, Chichester, pp. 407–478.
- Leblanc G.A. 1995. Trophic-level differences in the bioconcentration of chemicals: implications in assessing environmental biomagnification. *Environmental Science and Technology*, 29: 154-160.
- Limpus C.J. 2008. A Biological Review of Australian Marine Turtles. 2, Green Turtle *Chelonia mydas* (Linnaeus). Queensland Environmental Protection Agency, Queensland. Retrieved from http://www.austurtle.org.au/SeaTurtleBiology/green_Linnaeus.pdf.

Linhurst R.A., Bourdeau P., Tardiff R.G. 1995. Methods to assess the effects of chemicals on ecosystems. Chichester, UK: Wiley & Sons.

Luz V.L.F. 2005. Criação comercial de tartaruga e tracajá – Manual técnico. Cuiabá: SEBRAE. 72 p.

Manasirli M., Avsar D., Yeldan H., Mavruk S. 2015. Trace element (Fe, Cu and Zn) accumulation in the muscle tissues of *Saurida undosquamis*, *Pagellus erythrinus* and *Mullus barbatus* in the Iskenderun Bay, Turkey. *Fresenius Environ. Bull.* 24, 1601–1606.

Mansfield K.L., Wyneken J., Porter W.P., Luo J. 2014. First satellite tracks of neonate sea turtles redefine the ‘lost years’ oceanic niche. *Proc. R. Soc. B* 281, 20133039.

Martins A.I.P. 2008. Redução da qualidade do ambiente com reflexos na disponibilidade e qualidade do alimento, redução dos abrigos e da Biodiversidade. Dissertação de Mestrado em Sustentabilidade em Ecossistemas. Universidade Federal do Maranhão.

Marques L.S., Ulbrich M.N.C., Ruberti E., Tassinari C.G. 1999. Petrology, geochemistry and Sr–Nd isotopes of the Trindade and Martin Vaz volcanic rocks (Southern Atlantic Ocean). *Journal of Volcanology and Geothermal Research* 93, 191–216.

Mast R.B., Hutchinson B.J., Howgate E., Pilcher N.J. 2005. MTSG update: IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group host the 2nd Burning Issues Assessment Workshop. *Mar. Turt. Newsl.* 110, 13-15.

Matson C.W., Palatnikov G., Islamzadeh A., McDonald T.J., Autenrieth R.L., Donnelly K.C., Bickham J.W. 2005. Chromosomal damage in two species of aquatic turtles (*Emys orbicularis* and *Mauremy scaspica*) inhabiting contaminated sites in Azerbaijan. *Ecotoxicology* 14(5), 513–525. <http://dx.doi.org/10.1007/s10646-005-0001-0>.

Mattei D., Veschetti E., D’Illo S., Blasi M.F. 2015. Mapping elements distribution in carapace of *Caretta caretta*: a strategy for biomonitoring contamination in sea turtles? *Mar. Pollut. Bull.* 98, 341–348.

McAloose D., Newton A.L. 2009. Wildlife cancer: a conservation perspective. *Nat. Rev. Cancer* 9, 517–526.

Mendonça M.T., Ehrhart L.M. 1982. Activity, population size and structure of immature *Chelonia mydas* and *Caretta caretta* in Mosquito Lagoon, Florida. *Copeia*. 1013–1023.

- Merwe J.P.V., Henry M.H., Olszowy A., Whittier J.M., Lee S.Y. 2010. Using blood samples to estimate persistent organic pollutants and metals in green sea turtles (*Chelonia mydas*). *Marine Pollution Bulletin* 60 579–588.
- Miller J.D. 1985. Embryology of marine turtles. In: Gans, C., Billet, F., Maderson, P.F.A. (Eds.), *Biology of the Reptilia*. John Wiley and Sons, New York, pp. 269–328.
- Miller J.D. 1997. Reproduction in sea turtles. In: Lutz, P.L., Musick, J.A. (Eds.), *The Biology of Sea Turtles*. CRC Press, pp. 51–82.
- Miller J.D., Limpus C.J., Godfrey M.H. 2003. Nest Site selection, oviposition, eggs, development, hatching, and emergence of loggerhead turtles. In: Bolten, A.B., Witherington, B.E. (Eds.), *Loggerhead Sea Turtles*. Smithsonian Institution Press, pp. 125–143.
- Mortimer J.A. 1982. Feeding ecology of sea turtles. In: Bjorndal, K.A. (Ed.), *Biology and Conservation of Sea Turtles*. Smithsonian Institution Press, Washington, DC, pp. 103–109.
- Morcillo P., Esteban M.A., Cuesta A. 2016. Heavy metals produce toxicity, oxidative stress and apoptosis in the marine teleost fish SAF-1 cell line. *Chemosphere* 144, 225e233.
- Nagle R.D., Rowe C.L., Congdon J.D. 2001. Accumulation and selective maternal transfer of contaminants in the turtle *Trachemys scripta* associated with coal ash deposition. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 40, 531–536.
- Newman M.C., Unger M.A. 2003. *Fundamentals of Ecotoxicology*. Lewis Publishers, Boca Raton.
- Nicolau L., Monteiro S.S., Pereira A.T., Marçalo A., Ferreira M., Torres J., Vingada J., Eira C. 2017. Trace elements in loggerhead turtles (*Caretta caretta*) stranded in mainland Portugal: Bioaccumulation and tissue distribution. *Chemosphere*. 19026.
- Novillo O., Pertusa J.F., Tomás J. 2017. Exploring the presence of pollutants at sea: Monitoring heavy metals and pesticides in loggerhead turtles (*Caretta caretta*) from the western Mediterranean. *Science of the Total Environment* 598. 1130–1139.
- O'Connor J.S., Dewling R.T. 1986. Indices of marine degradation: their utility. *EnvironManage*;10:335–43.
- Palmer B.D., Demarco V.G., Guillette L.J. 1993. Oviductal morphology and eggshell formation in the lizard *sceloporus woodi*. *J. Morphol.* 217, 205–217.

Pappas A.C., Karadas F., Surai P.F., Wood N.A.R., Cassey P., Bortolotti G.R., Speake B.K. 2006. Interspecies variation in yolk selenium concentrations among eggs of free-living birds: the effect of phylogeny. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 20, 155–160.

Pascalichio A.E. 2002. Contaminação por metais pesados: Saúde Pública e Medicina Ortomolecular. São Paulo. Annablume Editora. Ed 1. 134p.

Peakall D. 1992. Animal biomarkers as pollution indicators. London: Chapman & Hall Ecotoxicology Series. 2-6. 21p.

Perrault J.R., Schmid J.R., Walsh C.J., Yordy J.E., Tucker A.D., 2014. Brevetoxin exposure, superoxide dismutase activity and plasma protein electrophoretic profiles in wild-caught Kemp's ridley sea turtles (*Lepidochelys kempii*) in southwest Florida. *Harmful Algae* 37, 194e202.

Perrault J., Wyneken J., Thompson L.J., Johnson C., Miller D.L. 2011. Why are hatching and emergence success low? Mercury and selenium concentrations in nesting leatherback sea turtles (*Dermochelys coriacea*) and their young in Florida. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 1671–1682. Pedron F.A., Dalmolin R.S.D., Azevedo A.C., Kaminski J. 2004. Solos urbanos. *Ciência Rural*, 34: 1647-1653.

Peláez-Rodríguez M. 2001. Avaliação da qualidade da água da Bacia do Alto Jacaré-Guaçu- SP (Ribeirão do Feijão e Ribeirão do Monjolinho) através de 11 variáveis Físicas, Químicas e Biológicas. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, SP, 175p.

Piotrowski JK. 1985. Individual exposure and biological monitoring. In: Vouk VB, Butler GC, Hoel DG, Peakall DB, editors. *Methods for estimating risk of chemical injury: human and non-human biota and ecosystems*. Chichester, UK: Wiley & Sons; p. 123–35.

Poletta G.L. Larriera A., Kleinsorge E., Mudry M.D. 2008. *Caiman latirostris* (broad-snouted caiman) as sentinel organism for genotoxic monitoring: Basal values determination of micronucleus and comet assay. *Mutat. Res./Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 650(2), 202–209. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.12.001>.

Pritchard P.C.H., Trebbau P. 1984. The turtles of Venezuela. *Society for the Study of Amphibians and Reptiles*. 403 p.

Ragland J.M., Arendt M.D., Kucklick J.R., Keller J.M. 2011. Persistent organic pollutants in blood plasma of satellite-tracked adult male loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 1549–1556.

Ramírez-Muñoz M.P., Zuñiga G., Torres-Bugarin O., Portilla E., Garcia-Martinez D., Ramos-Mora A., Cantu J.M., Sanchez-Corona J. 1999. Evaluation

of micro- nucleus test in peripheral blood erythrocytes by means of the splenectomized model. *Lab.Anim.Sci.*49(4),418–420.

Reinfelder J.R., Fisher N.S., Luoma S.N., Nichols J.W., Wang W.X.W. 1999. Trace element trophic transfer in aquatic organisms: a critique of the kinetic model approach. *Science of the Total Environment*, 219: 117-135.

Roe J.H., Hopkins W.A., Baionno J.A., Staub B.P., Rowe C.L., Jackson B.P. 2004. Maternal transfer of selenium in *Alligator mississippiensis* nesting downstream from a coal-burning power plant. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 1969–1972.

Rostal D.C., Paladino F.V., Patterson R.M., Spotila J.R. 1996. Reproductive physiology of nesting leatherback turtles (*Dermochelys coriacea*) at Las Baulas de Guanacaste National Park, Costa Rica. *Chelon. Conserv. Biol.* 2, 27–35.

Rostal D.C., Grumbles J.S., Palmer K.S., Lance V.A., Spotila J.R., Paladino F.V. 2001. Changes in gonadal and adrenal steroid levels in the leatherback sea turtle (*Dermochelys coriacea*) during the nesting cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.* 122, 139–147.

Sakai H., Ichihashi H., Suganuma H., Tatsukawa R. 1995. Heavy-metal monitoring in sea-turtles using eggs. *Mar. Pollut. Bull.* 30, 347–353.

Sakai H., Saeki K., Ichihashi H., Suganuma H., Tanabe S., Tatsukawa R. 2000. Species- specific distribution of heavy metals in tissues and organs of loggerhead turtle (*Caretta caretta*) and green turtle (*Chelonia mydas*) from Japanese coastal waters. *Mar. Pollut. Bull.* 40, 701-709.

Schaumburg L.G., Poletta G.L., Siroski P.A., Mudry M.D. 2012. Baseline values of Micronuclei and Comet Assay in the lizard *Tupinambis merianae* (Teiidae, Squamata). *Ecotoxicol.Environ.Saf.* 84, 99–103. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.06.023>.

Shimada T., Limpus C., Jones R., Hazel J., Groom R., Hamann M. 2016. Sea turtles return home after intentional displacement from coastal foraging areas. *Mar. Biol.* 163 (1), 1e14. <http://dx.doi.org/ARTN 810.1007/s00227-015-2771-0>.

Schlegel R., MacGregor J.T. 1982. The persistence of micronuclei in peripheral blood erythrocytes: detection of chronic chromosome break agein mice. *Mutat. Res.*104,367–369.

Schneider L., Belger L., Burger J., Vogt R.C. 2009. Mercury bioaccumulation in four tissues of *Podocnemis erythrocephala* (Podocnemididae: Testudines) as a function of water parameters. *Science ofthe Total Environment.* 407: 1048-1054.

Schneider L., Belger L., Burger J., Vogt R.C., Ferrara C.R. 2010. Mercury Levels in Muscle of Six Species of Turtles Eaten by People Along the Rio Negro of the Amazon Basin. Arch Environ Contam Toxicol. 58:444–450.

Stafford D.P., Plapp Jr.F.W., Fleet R.R. 1976. Snakes as indicators of environmental contamination: relation of detoxifying enzymes and pesticide residues to species of occurrence in three aquatic systems. Arch Environ Contam Toxicol;5:15–27.

Sevcikova, M., Modra, H., Slaninova, A., Svobodova, Z., 2011. Metalas as cause of oxidative stress in fish: a review. Veterinarni Med. 56, 537e546.

Stegeman J.J., Brouwer M., Di Giulio R.T., Förlin L., Fowler B.A., Sanders B.M., Van Veld P.A. 1992. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: Hugget, R.J.; Kimerle, R.A.; Mehrle JR, P.M.; Bergman, H.L. (eds.) Biomarkers. Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress. Boca Raton, Lewis Publishers, p. 235-335.

Strunjak-Perovic I., Lisicic D., Coz-Rakovac R., TopicPopovic N., Jadan M., Ben-kovic V., Tadic Z. 2010. Evaluation of micronucleus and erythrocytic nuclear abnormalities in Balkan whip snake Hierophis gemonensis. Ecotoxicology 19(8), 1460–1465. <http://dx.doi.org/10.1007/s10646-010-0531-y>.

Talavera-Saenz A., Gardner S.C., Riosmena Rodriguez R., Acosta Vargas B. 2007. Metal profiles used as environmental markers of green turtle (*Chelonia mydas*) foraging resources. Sci. Total Environ. 373, 1, 94-102. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.10.012>.

Tavares T.M., Carvalho F.M. 1992. Avaliação de exposição de populações humanas a metais pesados no Recôncavo Baiano. Química Nova. 15 (2) 147-154.

Topcuoğlu S., Kılıç Ö., Belivermiş M., Ergül H.A., Kalaycı G. 2010. Use of marine algae as biological indicator of heavy metal pollution in Turkish marine environment. J. Black Sea/Mediterranean Environment. 16, 43–52.

Tremblay N., Ortiz Arana A., Gonzalez Jauregui M., Rendon-von Osten J., 2017. Relationship between organochlorine pesticides and stress indicators in hawksbill sea turtle (*Eretmochelys imbricata*) nesting at Punta Xen (Campeche), Southern Gulf of Mexico. Ecotoxicology 2, 173e183.

Tryfonas A.E., Tucker J.K., Brunkow P.E., Hohnson K.A., Hussein H.S., Lin Z., 2006. Metal accumulation in eggs of the red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*) in the Lower Illinois River. Chemosphere. 63, 39–48.

Türkmen M., Tepe Y., Türkmen A., Sangün M.K., Ateş A., Genç E. 2013. Assessment of heavy metal contamination in various tissues of six ray species

from Iskenderun Bay, Northeastern Mediterranean Sea. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 90, 702–707.

Udroiu I. 2006. The micronucleus test in piscine erythrocytes. Aquat. Toxicol. 79 (2), 201–204. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.06.013>.

Valdivia, P.A., Zenteno-Savin, T., Gardner, S.C., Aguirre, A.A., 2007. Basic oxidative stress metabolites in eastern Pacific green turtles (*Chelonia mydas agassizii*). Comp. Biochem. Physiology, Part C 146, 111e117.

Van Houtan K.S., Hargrove S.K., Balazs G.H. 2010. Land use, macroalgae, and a tumor-forming disease in marine turtles. PLoS One 5 (9), e12900. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0012900>.

Villa C.A., Flint M., Bell I., Hof C., Limpus C.J., Gaus C. 2016. Trace element reference intervals in the blood of healthy green sea turtles to evaluate exposure of coastal populations. Environmental Pollution. 1e12.

Vazquez G.F., Reyes M.C., Fernandez G., Aguayo J.E.C., Sharma V.K. 1997. Contaminations in marine turtle (*Dermochelys coriaca*) egg shells of Playon de Mexiquillo, Michoacan, Mexico. Bull. Environ. Contam. Toxicol., v. 58: 326-333.

Vogt R.C., Benitez J.L.V. 1993. Species abundance and biomass distributions in freshwater turtles. In: Proceedings: conservation, restoration and management of tortoises and turtles: an international conference, Purchase, NY.

Vogt R.C. 2008. Amazon turtles. Gráfica Bíblos, Lima, Peru.

Yipel M., Tekeli I. O., Isler C.T., Altug M.E. 2017. Heavy metal distribution in blood, liver e kidneys of Loggerhead (*Caretta caretta*) and Gree (*Chelonia mydas*) sea turtles from the Northeast Mediterranean Sea. Marine Pollution Bulletin, <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.08.011>.

Yüzereroğlu T.A., Gök G., Coğun H.Y., Firat Ö., Aslanyavrusu S., Maruldalı O., Kargin F. 2010. Heavy metals in *Patella caerulea* (Mollusca, Gastropoda) in polluted and non-polluted areas from the Iskenderun Gulf (Mediterranean Turkey). Environ. Monit. Assess. 167, 257–264.

Zapata L.M., Bock B.C., Orozco L.Y., Palacio J.A. 2016. Application of the micronucleus test and comet assay in *Trachemys callirostris* erythrocytes as a model for in situ genotoxic monitoring. Ecotoxicology and Environmental Safety. 127, 108–116.

Zúñiga-González G., Torres-Bugarín O., Luna-Aguirre J., González-Rodríguez A., Zamora-Perez A., Gómez-Meda B.C., Ventura-Aguilar A.J., Ramos-Ibarra M.L., Ramos-Mora A., Ortíz G.G., Gallegos-Arreola M.P. 2000. Spontaneous micro-nuclei in peripheral blood erythrocytes from 54 animal species (mammals,

reptiles and birds): Part two. *Mutat. Res./Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 467 (1), 99–103. [http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5718\(00\)00021-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5718(00)00021-8).

Zúñiga-González G., Torres-Bugarín O., Zamora-Perez A., Gómez-Meda B.C., Ramos Ibarra M.L., Martínez-González S., González-Rodríguez A., Luna-Aguirre J., Ramos-Mora A., Ontiveros-Lira D., Gallegos-Arreola M.P. 2001. Differences in the number of micronucleated erythrocytes among young and adult animals including humans: Spontaneous micronuclei in 43 species. *Mutat. Res./Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 494(1–2), 161–167. [http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5718\(01\)00180-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5718(01)00180-2).

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS

Journal of Trace Elements in Medicine and Biology – **publicado**
(<https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2020.126654>)

CAPÍTULO 1:
ACCUMULATION OF TRACE METALS IN EGGS AND HATCHLINGS OF
Chelonia mydas

ALEXANDRA FROSSARD

VILA VELHA

JULHO/2020

Accumulation of trace metals in eggs and hatchlings of *Chelonia mydas*

Alexandra Frossard^a, Luiza Valli Vieira^b, Maria Tereza Weitzel Dias Carneiro^b, Levy Carvalho

Gomes^a, Adriana Regina Chippari-Gomes^a

^aVila Velha University – UVV, Laboratory of Applied Ichthyology (LAB PEIXE), Comissário José Dantas de Melo, 21, Boa Vista, ZIP Code 29102-770, Vila Velha, ES, Brazil.

^bFederal University of Espírito Santo - UFES, Department of Chemistry, Fernando Ferrari, 514, Goiabeiras, ZIP Code 29075-910, Vitória, ES, Brazil.

*corresponding author: e-mail xanfrossard@yahoo.com.br, phone number: +55 2799818-2970. Laboratory of Applied Ichthyology (LAB PEIXE), Comissário José Dantas de Melo, 21, Boa Vista, ZIP Code 29102-770, Vila Velha, ES, Brazil.

Abstract

BACKGROUND. The objective of this study was to verify the accumulation of trace metals in eggs and hatchlings of *Chelonia mydas*, evaluating if metal accumulation is originated from maternal transfer and/or from the incubation environment. Other evaluations were also performed, as metal distribution in different tissues (blood, kidney, liver, muscle and turtle shells) of newly hatched puppies, and genotoxic analysis to verify possible damages caused by the presence of metals.

METHODS. These assessments were carried out by quantifying Cd, Ni, Pb, Mn and Fe in egg sample collected during laying time (eggshells (ELT) and egg content (EC)), eggshells from newly hatched turtles (ENH), hatchlings tissues (H - blood, kidney, liver, muscle, and shell)) (n=18 for each biological sample - 3 of each nest) and nest' sediments (n=6, one of each nest). Comparative analysis were made between ELT and ENH, as well as between egg content (EC) and the sum of tissue samples from hatchlings, using Mann-Whitney hypothesis test ($p<0,05$). The amount of metals in different hatchling was quantified and followed by the Dunn post-test. A principal component analysis (PCA) was also employed.

RESULTS. Metals studied were found in all analyzed samples. The concentration of almost all investigated metals was significantly higher ($P<0.001$) in eggshells from ENH than in ELT. An increase of Cd (2.16-fold), Pb (3.47-fold), Fe (6.83-fold) and Mn (195.57-fold) was noticed in ENH. We also observed an increase of Fe (1.59-fold), Mn (1.74-fold) and Ni (1.59-fold) in hatchling when compared

with EC, due to transfer from nest' sediments. In relation to the hatchling's tissues, blood was shown to accumulate higher concentrations of Ni and Pb, while shells accumulated more Cd and Fe, and Mn is more associated with liver and kidney. Fe was the highest accumulated metal in both tissues, and muscles presented discrete concentrations of Ni, Mn, and Pb. A mean concentration of 1.25 ‰ MN was obtained in *C. mydas* hatchlings, indicating that the accumulation of metals in hatchlings didn't cause toxicology effects.

CONCLUSION. Hatchlings accumulate metals through the maternal and sediment transfer, although the levels of metal accumulation were not enough to cause genotoxic damage.

Keywords: green turtle; bioaccumulation; genotoxicity; maternal transfer; incubation area.

Declarations of interest: None.

Introduction

Green turtles (*Chelonia mydas*) dwell in Trindade Island (20°30'S and 29°20'W, in the Southwest Atlantic Ocean) and are the only species of turtle using the beach as a nesting site. According to Mendes et al. [1], *Chelonia mydas* is distributed in tropical and subtropical waters and is found close to coastal regions and islands in Atlantic, Pacific and Indian oceans. Nevertheless, this species is rarely seen in open ocean [2]. *Chelonia mydas* is subcosmopolitan, and its principal areas for feeding and nesting are within the tropics. In Brazil, oceanic islands represent their main nesting area, wherein Trindade island stands out as the best nesting hotspot, followed by Rocas Atoll and Fernando de Noronha archipelago, respectively [3,4,5,6]. The nesting peak of *C. mydas* occurs from January to March, when the island can receive about 1,800 nests within the 3 km of beaches every year [7].

Trace elements occur naturally in the Earth's crust, such as Fe, Mn, Cu and Zn, whereas anthropogenic activities can elevate concentrations of hazard elements (as Ni, Pb, and Cd) in seawater and bring adverse consequences to the environmental health [8]. Trindade is an intact and remote island, without direct anthropogenic contamination, but it is not free from contamination by organic and inorganic pollutants from the coastal region and by ships sailing through the region [9]. The Island can also suffer influences from ocean currents [10], and from submarine discharge of groundwater on volcanic islands due to the high permeability of their rocks [11]. Because of it, it is important to perform biomonitoring studies in such kinds of regions, with little impact of anthropic actions. In the case of Trindade Island, the eggs of green turtles incubated on the sands of its beaches can be used as

bioindicators, since this island is one of the most important nesting sites for *C. mydas* in the South Atlantic, which are endangered [7].

In general, turtles are known as a key sentinel group due to their long lifespan, feeding habits, migratory behavior and long residence periods in foraging areas [12,13,14]. These animals are susceptible to bioaccumulation of metals and other contaminants in their tissues over the years [15,19]. Therefore, turtles can be used to detect natural and anthropogenic threats in a wider portion of the ecosystem [16,17], standing out as a bioindicator for biomonitoring studies.

Considering that food and water are the main sources of metals exposure to freshwater and marine turtles [15,18], alterations in ecological factors, such as foraging sites, could lead to disparities in the levels of contaminants found among turtles' species. As females acquire metals through the food chain, they can either store or eliminate these compounds [19]. The latter could be feasible through metal deposition in their eggs during reproduction [20]. Burger and Gibbons [19] suggested that maternal transfer of toxic elements to eggs could be advantageous since females could regularly excrete part of the accumulated metal charge during nesting events. However, these accumulated metals may lead to detrimental impacts, such as genotoxic damage, on embryos and their physiological systems [21]. Nevertheless, Nagle et al. [22] observed that adult individuals of freshwater turtles (*Trachemys scripta*) dwelling in contaminated basins were accumulating multiple contaminants without transferring them to eggs. Hence, investigations on whether such metal transfer to nesting sites occurs in several turtle species are still crucial.

The objective of this study was to verify the accumulation of trace metals (Cd, Ni, Pb, Mn, and Fe) in eggs and hatchlings of *Chelonia mydas*. These metals were quantified in sediments of laying nest; egg (eggshells and egg contents) collected from a female cloaca before touching the sediment, and hatchlings' tissues. This assessment was performed to identify whether metal accumulation comes from maternal transfer and/or from the incubation environment. Others assessments were performed, as metal distribution in different tissues (blood, kidney, liver, muscle and turtle shells) of newly hatched puppies; and a genotoxic evaluation in an unprecedented way by the micronucleus test on hatchlings, in order to evaluate possible damages caused by the presence of metals. These two last analyses have been employed for first time in newly hatched puppies.

Material and methods

The present research was authorized by the Ministry of the Environment (*Ministério do Meio Ambiente* - MMA), Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation (*Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade* - ICMBio), Biodiversity Authorization and Information System (*Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade* - SISBIO Number: 53977-1) and the Ethics Committee on the Use of Animals of Vila Velha University (*Comitê de Ética e Uso Animal* - CEUA – UVV - #367-2016).

Study area

This study was conducted in Trindade Island that, with Martin Vaz Archipelago (20°28'S and 28°50'W), form the island group furthest from the Brazilian coast, with a distance of 1,170 km from the coast of the state of Espírito Santo, in the southwest Atlantic Ocean, which is part of the Vitória-Trindade Chain. Trindade Island have nine small beaches that are used by *C. mydas* turtle for nesting. Biological samples and sediments of this study were collected in the nest found in Andradas and Tartarugas beaches.

Samples collection

The samples were obtained from 2016/2017 *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) spawning season. Females of this species move towards the beaches to spawn 3 to 6 times per season, laying about 120 ± 30 eggs at a time [7]. Six females' individuals going up the beach to spawn were followed during one of the egg postures between 17-23 January 2017 (6-day interval to collect the six females). Intending to identify whether the metal accumulation is resulted from maternal transfer, three eggs from six females (totalling 18 eggs) were collected directly from the female cloaca while the individuals were laying their eggs, before touching the beach sediment. The same six nest were monitored until the first hatchlings come in March 2017 (55-60 incubation time). At this time, nests were opened and 18 eggshell samples (3 of each nest) and 18 hatchlings (3 of each nest) were collected after hatching period to verify whether the metal accumulation was triggered by the incubation environment. Sediment samples from the bottom of each nest (n=6) were also collected for metals quantification. Hatchlings were measured, weighed and euthanized on the island. Blood samples were taken and used for both genotoxic analysis (micronucleus

test) and bioaccumulation tests. Slides for these experiments were prepared in Trindade Island.

Hatchlings' biological tissues were extracted and frozen at -20°C for further bioaccumulation analysis. All frozen material was shipped to the Laboratory of Applied Ichthyology at the Vila Velha University (*LAB PEIXE / UVV-ES*), where biometry and genotoxicity analysis were performed on the erythrocytes.

Biometry

Tape measurements were carried out in all hatchlings for both over-the-curve length (OCL) and over-the-curve width (OCW). Later, animals were weighed with an analytical balance of with two decimal places as soon as the animals arrived at the island's laboratory.

Collection of blood and tissues

Hatchlings were physically restrained, and blood samples were collected by intrathecal puncture, using a pre-heparinized 1.0 mL syringe with a 25x7 needle. Blood samples were used for both micronucleus test and metals determination. Later, the turtles were euthanized with a 3 % lidocaine injection. Afterwards, the kidney, liver, muscle and turtle shells of each samples were dissected for metal level analysis, in order to compare the obtained results with sediment collected from the bottom of each monitored nest.

Quantification of metals

Eggshell, egg contents (yolk + albumin) and sediments were oven dried at 60°C until constant weight. Tissues samples were used as wet base due the small size of hatchlings tissues. Samples were digested using the closed microwave digestion system (Speed Wave 4, Berghof, Eningen Germany), weighed and added to the digestion tubes. Pure supra nitric acid was incorporated into both egg content and tissue samples. Nitric acid and hydrochloric acid were added to eggshells and sediment samples, respectively. The proportion of acids were inserted according to each sample characteristics (see Table A.1). Samples were then digested in microwave, respecting specific protocols for each sample type. After

digestion, the material was cooled down at room temperature and the extract was diluted with type I ultrapure water.

Five metals were determined: cadmium (Cd), nickel (Ni), lead (Pb), manganese (Mn) and iron (Fe) in the sediment, eggshells, egg yolk and in the tissues of each hatchling. Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) (Nexlon 300D, Perkin Elmer, USA) was used to determine Cd, Ni, Pb, and Mn (see table B.1). Iron concentration (Fe) was accessed through flame atomic absorption spectrometry (F AAS) (ZEE nit 700 Analytik Jena, Jena, Germany) (see Table B.2).

The quality control for metals determination was carried out using certified reference materials for sediment and fish (Table 1 and 3, correspondingly). The reference material for sediments was the BCR-6676 (Institute for Reference Material and Measurements[®]), and ERM – BB422 (European Reference Materials[®]) was used for fish muscle. Samples of these certified reference materials were treated and assessed under the same conditions to those adopted for samples in the present study, as previously described.

Genotoxic analysis – Micronucleus test

Blood samples were collected and dripped onto two slides to perform blood extensions. After drying at room temperature for 24 h, these slides were subjected to a 30 minutes methanol P.A. (100 %) bath for erythrocyte cell fixation. Slides were stained with 5 % Giemsa solution for 40 minutes, washed with distilled water and subsequently dried at room temperature for 24 h, as described by Grisolia [23]. This material was then observed under a light microscope at 400x magnification. Two thousand blood cells (erythrocytes) were counted (1000 from each slide) for micronucleus quantification according to Zapata [24] and Silva et al [25]. Micronucleus values (MNs) obtained in the present work corresponds to an average of two slides per turtle. The micronucleus (MNs) were identified in accordance with the criteria proposed by Fenech [26].

Statistical analysis

The obtained results were analysed for their normality by the Shapiro-Wilk test. Even after logarithmic transformations the data do not presented normal distribution and were analysed using non-

parametric tests. The Mann-Whitney hypothesis test was conducted for the comparative assays between eggshells collected during laying time (ELT) and eggshells from newly hatched turtles (ENH) at dry weight base. This test was also performed for the comparative analysis between egg contents (EC) and the sum of tissue samples from hatchlings (H - blood, kidney, liver, muscle, and shell). To perform this comparison, the data from hatchlings tissues were calculated at dry weight base using as reference *Chelonia mydas* hatchling water contents (72.5 %) according to Godley et al. [27].

In order to compare the quantity of metals (wet weight) in different hatchling tissues, Kruskal-Wallis analysis of variance was performed, followed by the Dunn post-test. Data was presented as medians. Statistical analysis was performed in the SigmaPlot software (12.0) to verify data significance for the bioaccumulation test in turtles' tissues and for the micronucleus test in the erythrocytes.

Moreover, a principal component analysis (PCA) was executed, ordering sample units of each evaluated tissue in relation to the descriptors used (concentration of analysed metals). This multivariate test was performed using R software version 3.3.2.. Before these analysis, all data were standardized using the "standardize" method of the "decostand" function, from "vegan" R package. Standardization tended to increase the influence of variables whose variance was small and reduce the influence of variables whose variance was large. Furthermore, the standardization procedure eliminated the influence of different measurement units on the final outcome, creating a dimensionless dataset.

For this study, the Biodiversity Authorization and Information System (SISBIO) authorized the use of only three biological samples from each nest., thus totaling a sample number = 18 for each biological sample.

Results

Biometry

Females from each experimental nest presented 1.12 ± 0.06 m in length and 1.05 ± 0.06 m in width. The hatchlings weighed 26.6 ± 2.5 g, with 5.5 ± 0.2 cm in width and 4.5 ± 0.2 cm in length. No significant discrepancies were found among the specimens from the Andradas and Tartaruga beaches.

Quantification of metals

Metals concentration of sediment samples collected in each of the six experimental nest is presented in Table 1. Iron is the most abundant metal ranging from 15,258 to 38,009 mg/Kg. Manganese also exhibited high concentrations, varying from 227.4 to 402.4 mg/Kg, followed by Ni, Pb, and Cd.

Table 1 Metals quantification (mg/Kg dry weight) in sediments of *Chelonia mydas* nest in Trindade Island.

	Fe	Mn	Ni	Pb	Cd
Sediment					
Median	27,597.9	348.8	120.6	0.229	0.0302
Min-Max	15,258-38,009	227.4-402.4	56.39-122.2	0.14-0.40	0.03-0.6
DL	0.004	0.008	0.022	0.118	0.002
Certified reference material for sediments (BCR-667) and limit of quantification of the method					
Certified values (mg/kg)	NI	920±40	128±9	31.9±1.1	0.67±0.11
This study values (mg/kg)	NI	813±19	124.2±0.4	31.7±0.3	0.63±0.03
LOQ (mg/kg)	0.39	0.0008	0.0022	0.012	0.0002

LOQ: limit of quantification; NI: not informed.

The concentration of metals was significantly higher ($P < 0.001$) in eggshells from newly hatched turtles (ENH), which were in contact the sediments for 60 days, than in eggshells collected directly from female cloaca at the laying time (ELT) (Figure 1). An increase of Cd (2.16-fold), Pb (3.47-fold), Fe (6.83-fold) and Mn (195.57-fold) was noticed in ENH. On the other hand, eggshells assembled from female cloaca (ELT) presented Ni values 2.61-fold higher than the eggshells of newly hatchlings (ENH).

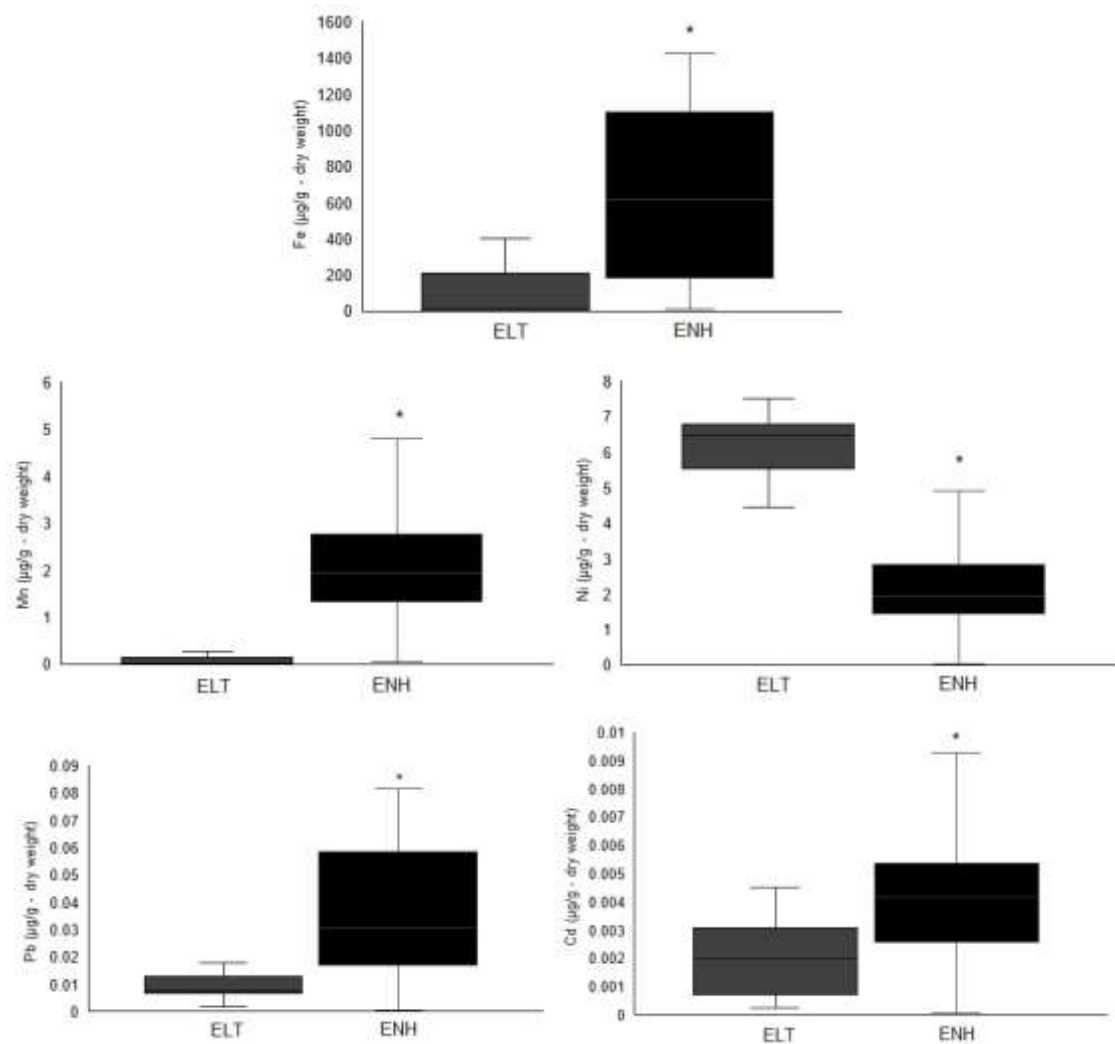


Fig 1 Quantification of metals (Fe, Mn, Ni, Pb, and Cd) in eggshell samples of *Chelonia mydas* daily collected from both female cloaca (ELT) and eggshells from newly hatched turtles (ENH), after about 60 incubation days within the nest. The box represents the interquartile amplitude containing 50 percent of the values. The external lines (vertical) correspond to the highest and lowest values and the internal lines (horizontal) correspond to the median. *Indicate significant differences ($p \leq 0.05$) between the treatments.

Metal concentration of Fe (1.59-fold), Mn (1.74-fold), and Ni (1.59-fold) increased in sum of the tissue samples (H - refers to an individual sum of each hatchling, including blood, kidney, liver, muscle, and shell) after the incubation period when compared to the egg contents (EC) (Figure 2), due to transfer from nest' sediments. Nevertheless, the amount of Pb and Cd did not increase in the sum of hatchling tissue samples (H).

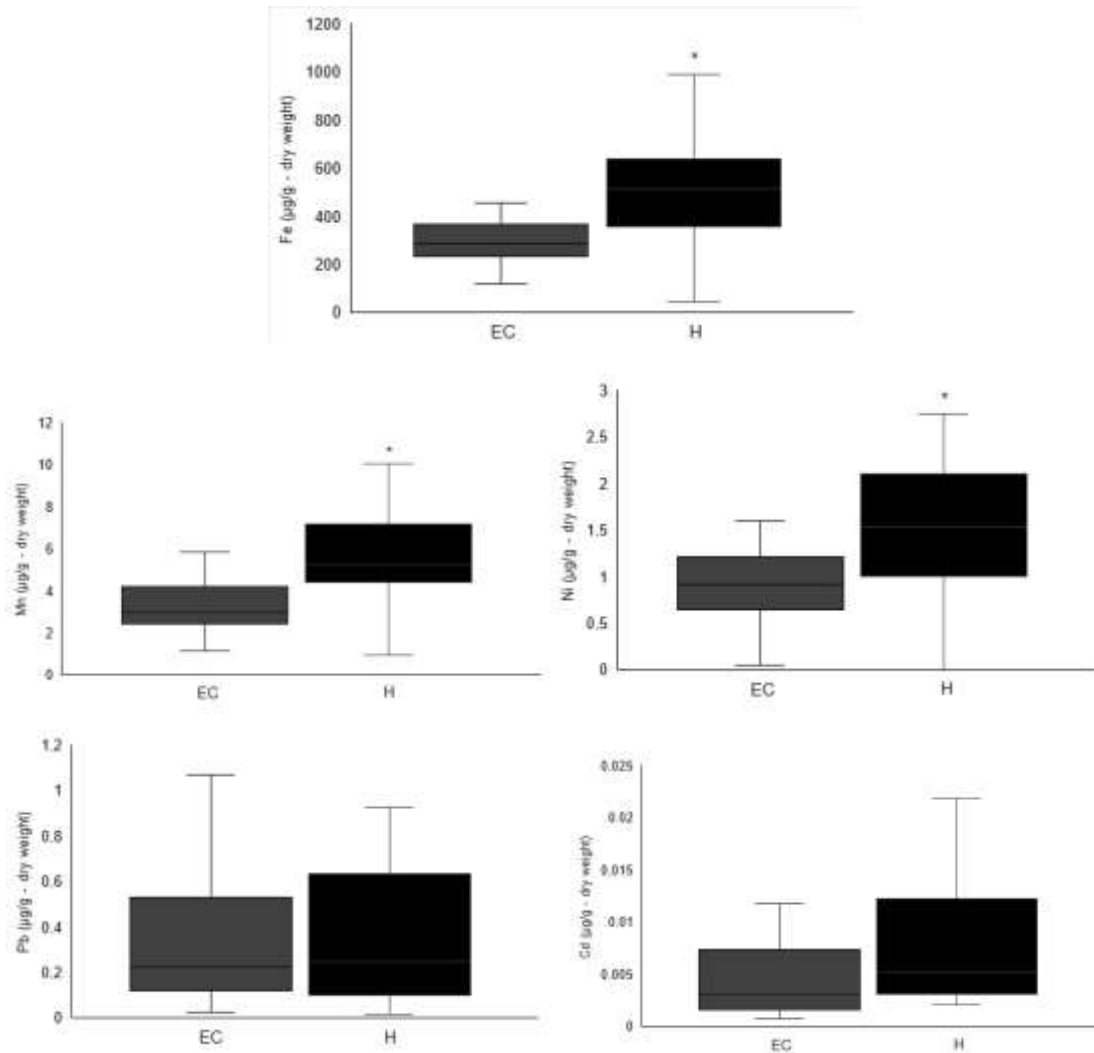


Fig 2 Quantification of metals (Fe, Mn, Ni, Pb and Cd) in egg contents (EC) samples of *Chelonia mydas* directly assembled from the female cloaca and in the sum the tissue samples (blood, kidney, liver, muscle and shell) extracted from hatchlings (H), after about 60 days incubated within the nest. The box represents the interquartile amplitude containing 50 percent of the values. The whiskers (vertical) correspond to the highest and lowest values and the internal lines (horizontal) stand for the median. *Indicates significant differences ($p \leq 0.05$) between the treatments.

Table 2 shows the increase in Ni, Pb, Mn, and Fe in eggs (ENH + H) after the incubation period in relation to eggs (ELH + EC) collected directly from the female's cloaca. In general, these results indicate that there was a transfer of metals from the sediment to the eggs deposited there.

Table 2 Quantification of metals in egg (eggshells (ELT) + egg contents (EC)) collected from a female cloaca before even touching the sediment, and in egg (eggshells (ENH) + hatchlings' tissues (H)) after about 60 days incubated within the nest.

	Cd	Ni	Pb	Mn	Fe
ELT+EC	1.077	57.315	7.490	49.904	5,034.106
ENH+H	0.837	97.433	10.547	208.240	27,939.025
(ENH+H)/(ELT+EC)	-0.78	1.70	1.41	4.17	5.55

H = sum the tissue samples (blood, kidney, liver, muscle and shell) extracted from hatchlings.

When evaluating the metals concentration in different biological samples, the following sequence was found: Fe > Mn > Ni > Pb > Cd, in eggs contents (EC), and in the sum of the tissue samples of hatchlings (H). Eggshells collected after hatching (ENH) exhibited a slight difference in which Ni appeared as the second most concentrated metal, but Mn was merely lower than Ni. In the case of ELT, the Mn and Ni replaced the position of each other in the above-mentioned sequence. The sequence Fe > Mn > Ni > Pb > Cd was similar to the one found in the sediments. Moreover, a gradual decrease in metals content occurred as they were transferred among the biological compartments: sediment > shell (ENH) > hatchling (H). The manganese and lead were exceptions, portraying values higher in hatchlings (H) (5.219 and 0.246 µg/g, respectively) than in eggshells (ENH) (1.929 and 0.033 µg/g, respectively).

Results from the PCA analysis are described in Table 3. Together, the first two components explain 79.43 % of the total variation of metal concentration in the evaluated tissues of *C. mydas*. The first and most explanatory component represents 51.09 % of the total data variance with positive scores attributed to Cd, Mn, and Fe, while Ni and Pb received negative scores.

Table 3 Eigenvalues and correlation coefficients of the principal component analysis (PCA) based on the quantity of metals (Cd, Ni, Pb, Mn, and Fe) for all the assessed tissues (kidney, liver, blood, muscle and turtle shell).

Correlation coefficient		
Variables	PCA 1	PCA 2
Cd	1.6161810	-1.0750943
Ni	-1.5465826	-1.0399428
Pb	-0.7973305	-1.6158537
Mn	1.4964504	0.3405558
Fe	1.6847870	-0.9905138
Eigenvalue	2.5547	1.4172
% variance	51.09	28.34

Figure 3 was generated to disclose the distribution relationship of metals (Fe, Ni, Pb, Mn, and Cd) in different tissues of hatchlings (shell, blood, kidney, liver, and muscle). This data demonstrated that the blood accumulates higher concentrations of both Ni and Pb, whilst it accumulates the lowest Mn concentrations. A significant connection was also observed between Cd and Fe concentration in turtle shells, wherein the more preeminent Fe content was found. A more discrete association was detected among Mn, liver, and kidney. Fe was the metal that displayed the greatest accumulation in both tissues and muscles, which portrayed discrete concentrations of Ni, Mn, and Pb.

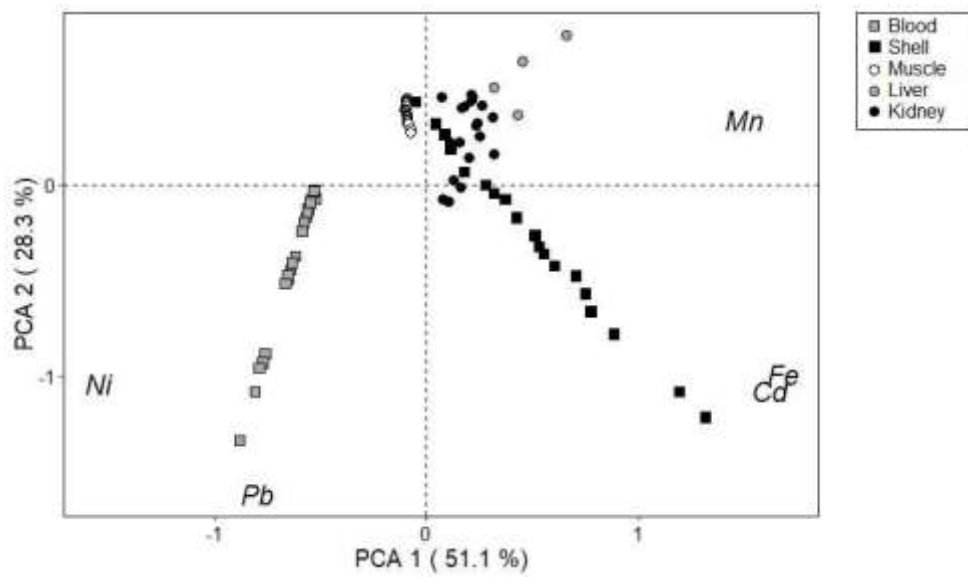


Fig 3 Principal component analysis of metals (Fe, Mn, Ni, Pb, and Cd) in tissue samples (kidney, liver, blood, muscle, and shell) of *Chelonia mydas* hatchlings collected in Trindade Island. Cadmium and Iron exhibited great influence on the shell samples grouping, whilst Ni and Pb impacted significantly on blood samples grouping.

Figure 3 and Table 4 highlight that shell and blood of hatchlings were the tissues that accumulated the higher amounts of nonessential metallic elements, Cd and Pb. The kidney was the third tissue that has most accrued those metals, followed by liver and muscle.

Table 4 Median concentrations of metals ($\mu\text{g/g}$ wet weight) and intervals (minimum and maximum) in tissues of *Chelonia mydas* offsprings that hatched on the beaches of Trindade Island. Different lower-case letters indicate significant differences ($p \leq 0.001$) between the tissues

	Fe	Mn	Ni	Pb	Cd
Kidney					
Median	25.000 ^{ad}	0.858 ^{bc}	0.029 ^a	0.0203 ^b	0.000005 ^{ac}
Min-Max	14.0-40.0	0.507-1.241	0.003-0.096	0.009-0.088	0.0002-0.038
Liver					
Median	43.295 ^{bcd}	1.510 ^b	0.063 ^a	0.019 ^b	0.000305 ^b
Min-Max	17.4-84.2	0.734-2.013	0.005-0.545	0.0003-0.038	0.00006-0.0002
Blood					
Median	162.898 ^b	0.058 ^a	0.081 ^a	0.022 ^b	0.00005 ^a
Min-Max	93.3-196.6	0.023-0.094	0.025-0.283	0.004-0.033	0.00004-0.0162
Muscle					
Median	14.290 ^a	0.215 ^d	0.251 ^b	0.004 ^a	0.00008 ^c
Min-Max	11.2-23.8	0.161-0.359	0.164-0.393	0.011-0.046	0.00003-0.0002
Shell					
Median	78.071 ^{bc}	0.740 ^c	0.320 ^b	0.040 ^b	0.00108 ^b
Min-Max	15.2-311.0	0.0788-1.6971	0.012-0.747	0.005-0.080	0.0001-0.089
Certified reference material for fishes' muscles (ERM-BB422) and limit of quantification of the method					
Certified values (mg/kg)	9.4 $\pm$ 1.4	0.368 $\pm$ 0.028	NI	NI	0.008 $\pm$ 0.002
This study values (mg/kg)	16.6	0.36 $\pm$ 0.05	-	-	0.023 $\pm$ 0.001
LOQ (mg/kg)	0.39	0.001	0.002	0.010	0.0002

LOQ: limit of quantification; NI: not informed.

Genotoxic analysis – Micronucleus Test

The frequency of micronucleus quantified from hatchlings' blood was very low (mean = 1.25 ± 0.91 ‰) in relation to other data described in the literature (Table 5).

Table 5 Frequency of micronucleus (‰) in *Chelonia mydas* offsprings that hatched in Trindade Island beaches and other turtle species.

Turtle species	MN (‰)	SD	Life cycle	Source
<i>Chelonia mydas</i>	1.25	0.91	Hatchlings	Present study
<i>Chelonia mydas</i>	0.62	0.18	Juveline	Silva et al [25]
<i>Lepidochelys olivacea</i>	0.60	0.6	Adults	Herrera & Baena [28]
<i>Trachimis callilostris</i>	0.78	0.58	Adults	Zapata et al. [24]
<i>Phrynops hilarii</i>	3.56	1.59	Juvenile-Adult	Latorre et al. [31]
<i>Podocnemis expansa</i>	10	3.6	Hatchlings	Frossard et al. [29]
<i>Caretta Caretta</i>	15.82	15.16	Juvenile-Adult	Casini et al. [30]

Discussion

Metals quantification (Cd, Ni, Pb, Mn, and Fe) in biological samples of *Chelonia mydas* suggest that adult females were already with contaminated with metals when they arrived on the island. This could be proved by the metal accumulation in the eggs (eggshells and egg contents) at the laying time, demonstrating that a transfer of accumulated metals has occurred from females to the eggs. Moreover, metal accumulation was also witnessed in eggshells and hatchlings sampled in the incubation environment, after a contact between eggs and nest' sediment. However, such quantity of metals in hatchlings probably did not trigger genotoxic damage.

Females turtles can acquire metals through the food chain [16]. Yipela et al [37] carried out an extensive study, confirming this process metal intake; they performed metals bioaccumulation (Al, As, Fe, Mn, As, Cd, Cu, Mn, Ni, Se, Zn Cd, Hg, Mn, Zn) in the blood, kidney and liver of *Caretta caretta* and *Chelonia mydas* turtle species worldwide in different locations, such as Turkey, Spain, Africa, Mexico, Italy and Japan. In view of this, turtles have found a strategy to eliminate some of these accumulated metals, by depositing metals in eggs during their reproductive period [22,36,37], justifying the presence of these elements in eggs (ELT and EC) collected directly from females' cloaca. These events were also

observed by Roe et al. [32] in embryos of *Dermochelys coriacea*, incubated in the laboratory, and by Nagle et al. [22] in eggs of freshwater turtles (*Tracheys scripta* and *Chrysemis picta*). At the same time, many trace elements, such as Fe and Mn, are essential nutrients for embryonic development, and, therefore, during the formation of eggs, they are transferred naturally from female to the eggs [42,43]. Probably, during this natural transfer process, non-essential metals are also transferred, such as Cd, Ni, and Pb. Blood-based reference intervals (RIs) are standard tools for interpreting health diagnoses in humans and animals. They generally include biomarkers of stress and metabolic diseases, as well as the biochemistry and hematology of free ion trace elements. The IR of green turtles from Queensland (Australia) has already been described with lower limit of Fe = 210,000 and upper limit of Fe = 410,000 ($\mu\text{g/L ww}$), and lower limit of Mn = 7.7 and upper limit of Mn = 35 [44,45]. The present study, on the other hand, quantified Fe = 162.9 with intervals between 93.3-196.6 ($\mu\text{g / g ww}$), and Mn = 0.058 with an interval of 0.023 to 0.094 of Mn for newly hatched hatchlings. These values indicate that there was no excessive maternal transfer of Fe and Mn to the eggs, however there was an increase of 5.55-fold of Fe and 4.17-fold of Mn in the eggs (ENH + H) after the incubation period, showing the occurrence of sediment transfer to the eggs.

In the present study, Fe, Mn, Ni, Pb, and Cd were found in the nest's sediments. In accordance with prior reports [33,34], elevated levels of iron assembled in the sediment and consequently in both eggshells and tissues of *C. mydas* could be justified by the high concentration of total Fe found in the entire beach. These authors pointed out that soils formed by tufts and basaltic lavas are richer in mafic minerals and more easily weathered materials, which facilitates the formation of more crystalline iron oxides. They also reported that the total Fe content was consistent with the levels described for both alkaline and basic rocks. The other metals found in sediment may be also related to a wreck in the surrounding waters. Cu, Zn, and Pb may be also originated from ships antifouling paints and can justify the raised concentrations of these elements in the soil, as reported by [33]. These elements were also found in eggshells and hatchlings, portraying higher concentration than in the eggs at the laying time (ELT and EC). This observation reiterates that metal transfer from nest' sediment to the eggs (ENH and H) occurs.

Although Nagle et al. [22] stated that trace elements are not incorporated into eggs in considerable amounts from the nest substrate, the present study demonstrated that direct contact of eggs with the incubation sediment was sufficient to transfer a certain amount of essential metals, e.g. Fe, Mn,

Pb and Cd to eggshells (ENH) and Fe, Mn, and Ni to hatchlings (H). This transfer to eggs concerns the health of hatchlings that are incubated on beaches sediments. Several sites where turtles spawn are already polluted, for instance, the beaches of Regência, at the mouth of the Doce river (Espírito Santo, Brazil) that were affected by tailings from the breaking of a mining dam [38, 39] and, Mexican beaches that were affected by a major oil spill in Northern Gulf in 2010 [41]. The beaches of Regência are the main spawning sites of *Caretta caretta* and *Dermochelys coriacea* turtles [40] and beaches of Mexico are the reproduction areas of Kemp's ridley turtle (*Lepidochelys kempii*) [41].

Although the eggshell accumulated metals, it had a protective function retaining metals and reducing the incidence of contamination in hatchlings. However, certain metals managed to cross the physical barrier during essential processes for the embryo formation and were accumulated in particular tissues (blood, kidney, liver, muscle, and shell) of turtle hatchlings. Nevertheless, it is assumed that other biological samples had also accumulated these metals, especially Pb, since higher concentrations were found in the yolk and were most likely redistributed to other tissues. Even though the blood denoted stronger connection with Ni and Pb, the turtle shell presented higher values of Fe, Cd, Ni, and Pb. These findings emphasize turtles' strategy of deviating nonessential metals, e.g. Cd and Pb, from metabolically active tissues, such as liver and kidney. These animals also used the blood to transport Ni, Pb, and Cd from susceptible areas to more resistant compartments, for instance, to the turtle shells.

Although metal concentrations in nest sediments have been recorded, a negligible or even non-existent occurrence of genotoxic damage was observed in hatchlings sampled in Trindade beaches. These outcomes indicated the DNA integrity of *C. mydas* after the exposure period. Similar results can be found in the literature, Frossard et al. [35] tested Cd in a bioassay with *Podocnemis unifilis* and noticed inferior MN concentrations in the treatment presenting briefer exposure time to the metal. Zapata et al. [24] assessed several environments with and without anthropogenic influence and quantified merely 0 to 2 MN in 20 blood samples of *Trachemys callirostris* (freshwater turtle) collected in clean areas (negative control), as well observed in *C. mydas* by Silva et al [25] and in *L. olivacea* by Herrera & Baena [28]. These values corroborate with these study findings in which a mean concentration of 1.25 ‰ in *C. mydas* hatchlings was obtained, restating the good quality of the sediments used for turtle nesting in Trindade Island. On the other hand, Frossard et al. [29] witnessed large numbers of erythrocyte micronuclei in the hatchlings of giant Amazon river turtle (*Podocnemis expansa*) from Crixás-Açu River (15.25 ‰) and Araguaia River (10 ‰), indicating that the beaches of both rivers are affected by anthropogenic activities, as well observed by

Casini et al [30] in adults of *C. caretta*. Therefore, the micronucleus test in newly hatched turtle presents itself as an excellent indicator of contamination.

Conclusion

In conclusion, this study identified the presence of metals in eggshells and hatchlings of *C. mydas*, as well as in the sediment of Trindade Island. The metals found in both eggshells and egg yolks resulted from maternal transfer, whilst the augmentation of metals that occurred in both eggshells after incubation and hatchlings' tissues were derived probably from the nest sediments. The low frequency of micronuclei observed in the present study infers that newly hatched turtle presented absence of genotoxic damage caused by metal accumulation, and that this test can be used as an efficient tool in biomonitoring studies for these animals. Therefore, these results serve to raise awareness that the health of turtle hatchlings will be impacted by the steep increase in pollution levels of both beach sediments and water bodies (marine and freshwater).

Acknowledgments

The authors acknowledge the Brazilian Navy and its PROTRINDADE program for enabling sampling expeditions, particularly the Commander Costa-Abrantes (SECIRM/MB). The authors would like to gratefully acknowledge the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil - CAPES) for providing post-graduate stipends for the student Alexandra Frossard and Luiza Valli Vieira. Moreover, the authors also thank TAMAR and its interns (Suellem Melo de Andrade Santiago, Roberto Carlos Cândido Lima Filho, Luca Tavares de Souza) for their assistance in monitoring females and nest on Trindade beaches. The authors acknowledge Marli de Oliveira Silva for her assistance during chemical and genotoxic analyses. This work was supported by Espírito Santo State Scientific Research Foundation (FAPES - grants # 76413730/16) and by Vila Velha University (UVV - # 2018PI001).

References

- [1] S.S Mendes, R.H. Carvalho, A.F. Faria, B.M. Souza, 2015. Marine debris ingestion by *Chelonia mydas* (Testudines: Cheloniidae) on the Brazilian coast. *Marine Pollution Bulletin*, 92, 8-10. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.01.010>
- [2] R.M. Márquez, 1990. Sea turtle of the world. An annotated and illustrated catalog of sea turtle species known to date. FAO Fisheries Synopsis. No. 125, Vol. 11. Rome, FAO. 81 p
- [3] L. Moreira, C. Baptistotte, J. Scalfone, J.C. Thomé, A.P. Almeida, 1995. The occurrence of *Chelonia mydas* on the Island of Trindade, Brazil. *Marine Turtle Newsletter*, 1, 12.
- [4] C. Bellini, T.M. Sanches, 1996. Reproduction and feeding of marine turtles in the Fernando de Noronha Archipelago, Brazil. *Marine Turtle Newsletter*, 74, 12–13.
- [5] C. Bellini, M.A. Marcovaldi, T.M. Sanches, A. Grossman, G. Saks, 1996. Atol das Rocas Biological Reserve: second largest *Chelonia* rookery in Brazil. *Marine Turtle Newsletter*, 72, 1–2.
- [6] M.A.Y. Marcovaldi, G.G.D Marcovaldi, 1999. Marine Turtles of Brazil: The History and Structure of Projeto TAMAR-IBAMA. *Biological Conservation*, 91, 35-41. [https://doi.org/10.1016/S0006-3207\(99\)00043-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3207(99)00043-9)
- [7] A.P. Almeida, A.J.B. Santos, J.C.A. Tomé, C. Belini, C. Baptistotte, M.A. Marcovaldi, A.S. Santos, M. Lopez, 2011. Avaliação do Estado de Conservação da Tartaruga Marinha *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) no Brasil. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. *Biodiversidade Brasileira*, 1, 12-19.
- [8] M.C. Santos-Silva, E.C. Machado, M. Wallner-Kersanach, M.G. Camargo, C. Andrade, F. Sá, F. Pellizzar, 2018. Background levels of trace elements in brown and red seaweeds from Trindade, a remote island in South Atlantic Ocean. *Marine Pollution Bulletin*, 135, 923–931. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.08.019>
- [9] C.Y.S. Theophilo, 2013. Análise de elementos potencialmente tóxicos em material biológico da Ilha da Trindade, Brasil. Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, p 125. [10] R. Andrades, R.G. Santos, J.C. Joyeuxa, D. Chelazzic, A. Cincinellic, 2018. Tommaso Giarrizzod Marine debris in Trindade Island, a remote island of the South Atlantic. *Marine Pollution Bulletin*, 137, 180–184. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.10.003>
- [11] J. Jeong, G. Kim, S. Han, 2012. Influence of trace element fluxes from submarine groundwater discharge (SGD) on their inventories in coastal waters off volcanic island, Jeju, Korea. *Applied Geochemistry*, 27, 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2011.08.014>
- [12] O. Novillo, J.F. Pertusa, J. Tomás, 2017. Exploring the presence of pollutants at sea: Monitoring heavy metals and pesticides in loggerhead turtles (*Caretta caretta*) from the western Mediterranean. *Science of the Total Environment* 598, 1130–1139. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.090>
- [13] K.A. Finlayson, F.D.I. Leusch, J.P. van der Merwe, 2016. The current state and future directions of marine turtle toxicology research. *Environment International*, 94, 113–123. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.05.013>

- [14] M.M. Lamont, A.R. Iverson, 2018. Shared habitat uses by juveniles of three sea turtle species. *Marine Ecology Progress Series Inter-Research*, <https://doi.org/10.3354/meps12748>.
- [15] F. Caurant, P. Bustamante, M. Bordes, P. Miramand, 1999. Bioaccumulation of cadmium, copper, and zinc in some tissues of three species of marine turtles stranded along the French Atlantic coasts. *Marine Pollution Bulletin*, 38, 1085–1091. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(99\)00109-5](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(99)00109-5)
- [16] E.M. Ducan, Z.L.R. Botterell, A.C. Broderick, T.S. Galloway, P.K. Lindeque, A. Nuno, B.J. Godley, 2017. A global review of marine turtle entanglement in anthropogenic debris: a baseline for further action. *ESR Inter Research*, <https://doi.org/10.3354/esr00865>.
- [17] L. Nicolau, S.S. Monteiro, A.T. Pereira, A. Marçalo, 2017. Trace elements in loggerhead turtles (*Caretta caretta*) stranded in mainland Portugal: Bioaccumulation and tissue distribution. *Chemosphere*, 179, 120-126. [10.1016/j.chemosphere.2017.03.108](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.03.108)
- [18] J.P.V. Merwe, M.H. Henry, A. Olszowy, J.M. Whittier, S.Y. Lee, 2010. Using blood samples to estimate persistent organic pollutants and metals in green sea turtles (*Chelonia mydas*). *Marine Pollution Bulletin*, 60, 579–588. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.11.006>
- [19] J. Burger, J.W. Gibbons, 1998. Trace elements in egg contents and eggshells of slider turtles (*Trachemys scripta*) from the savannah river site. *Archives of Environmental Contamination Toxicology* 34, 382–386. <https://doi.org/10.1007/s002449900334>
- [20] C.L. Keen, M.W. Taubeneck, S. Zidenberg-Cherr, G.P. Daston, J.M. Rogers, 1997. Toxicant exposure and trace element metabolism in pregnancy. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 4, 301–308. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(97\)10028-X](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(97)10028-X)
- [21] J.H. Roe, W.A. Hopkins, J.A. Baionno, B.P. Staub, C.L. Rowe, B.P. Jackson, 2004. Maternal transfer of selenium in *Alligator mississippiensis* nesting downstream from a coal-burning power plant. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23, 1969–1972. [10.1897/03-520](https://doi.org/10.1897/03-520)
- [22] R.D. Nagle, C.L. Rowe, J.D. Congdon, 2001. Accumulation and selective maternal transfer of contaminants in the turtle *Trachemys scripta* associated with coal ash deposition. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 40, 531–536. [10.1007/s002440010206](https://doi.org/10.1007/s002440010206)
- [23] C.K. Grisolia, C.L.G. Rivero, F.L.R.M. Starling, I.C.R. Silva, A.C. Barbosa, J.G. Dorea, 2009. Profile of micronucleus frequencies and DNA damage in different species of fish in a eutrophic tropical lake. *Genetics and Molecular Biology*, 32, 138–143. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572009005000009>
- [24] L.M. Zapata, B.C. Bock, L.Y. Orozco, J.A. Palacio, 2016. Application of the micronucleus test and comet assay in *Trachemys callirostris* erythrocytes as a model for in situ genotoxic monitoring. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 127, 108–116. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.01.016>
- [25] C.C. da Silva, R.D. Klein, I.F. Barcarolli, A. Bianchini, 2016. Metal contamination as a possible etiology of fibro papillomatosis in juvenile female green sea turtles *Chelonia mydas* from the southern Atlantic Ocean. *Aquatic Toxicology*, 170, 42–51. [10.1016/j.aquatox.2015.11.007](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.11.007)
- [26] M. Fenech, 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research* 455, 81-95. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00065-8](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00065-8)

- [27] B.J. Godley, D.R. Thompson, R.W. Furness, 1999. Do heavy metal concentrations pose a threat to marine turtles from the Mediterranean Sea? *Mar. Pollut. Bull.* 38(6): 497-502.
- [28] V.H. Quiroz Herrera, J. Palacio Baena, 2017. Genotoxic Biomarkers in Erythrocytes of *Lepidochelys olivacea* (Cheloniidae) from Colombia. *Acta Biológica Colombiana*. 22-3, 322-330. <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v22n3.58688>
- [29] A. Frossard, G.C. Coppo, A.T. Lourenço, O.A. Heringer, A.R. Chippari-Gomes, 2020. Avaliação toxicológica de metais em testudines. Tese. Universidade Vila Velha.
- [30] S. Casini, I. Caliani, M. Giannetti, L. Marsili, S. Maltese, D. Coppola, N. Bianchi, T. Campani, S. Ancora, C. Caruso, G. Furii, M. Parga, A. D'Agostino, M.C. Fossi, 2018. First ecotoxicological assessment of *Caretta caretta* (Linnaeus, 1758) in the Mediterranean Sea using an integrated nondestructive protocol. *Science of The Total Environment*, 631–632, 1221-1233. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.111
- [31] M.A. Latorre, E.C. López González, P.A. Siroski, G.L. Poletta, 2015. Basal frequency of micronuclei and hematological parameters in the Side-necked Turtle, *Phrynops hilarii* (Duméril & Bibron, 1835). *Acta Herpetologica*, 10-1, 31-37. [10.13128/Acta_Herpetol-14988](https://doi.org/10.13128/Acta_Herpetol-14988)
- [32] J.H. Roe, N.S. Sill, M.R. Columbia, F.V. Paladino, 2011. Trace metals in eggs and hatchlings of Pacific leatherback turtles (*Dermochelys coriacea*) nesting at Playa Grande, Costa Rica. *Chelonian Conservation and Biology*, 10:3–9. <http://dx.doi.org/10.2744/CCB-0837.1>
- [33] E.P. Clemente, C.E.G.R. Schaefer, F.S. Oliveira, M.R. Albuquerque Filho, R.V. Alves, M.M.F. Sá, V.F. Melo, G.R. Corrêa, 2009. Topossequência de solos na ilha da Trindade, Atlântico Sul. *Revista Brasileira de Ciências do Solo*, <https://doi.org/10.1590/S0100-06832009000500028>.
- [34] E.P. Clemente, C.E.R.G. Schaefer, F.S.D. Oliveira, L.D.C. Marciano, A.D. Clemente, 2012. Geoquímica dos solos da Ilha da Trindade, Atlântico Sul, Brasil. *Geociências*, São Paulo. 31:31–46. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832009000500028>
- [35] A. Frossard, P.D. Ferreira-Júnior, M.T.W.D. Carneiro, D.C. Heringer, O.A. Endringer, L.C. Gomes, 2013. Effect of dietary cadmium on fitness, growth, genotoxicity and accumulation in the Yellowspotted River Turtle, *Podocnemis unifilis*. *Aquatic Toxicology* 141:239–241. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.06.002>
- [36] N.L.N. Souza, M.T.W.D. Carneiro, E.F. Pimentel, A. Frossard, J.B. Freire, D.C. Endringer, P.D. Ferreira-Júnior, 2018. Trace elements influence the hatching success and emergence of *Caretta caretta* and *Chelonia mydas*. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 50, 117–122. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2018.06.007>
- [37] M. Yipel, I. O. Tekeli, C.T. Isler, M.E. Altug, 2017. Heavy metal distribution in blood, liver e kidneys of Loggerhead (*Caretta caretta*) and Gree (*Chelonia mydas*) sea turtles from the Northeast Mediterranean Sea. *Marine Pollution Bulletin*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.08.011>.
- [38] H.M. Queiroz, G.N. Nóbrega, T.O. Ferreira, L.S. Almeida, T.B. Romero, S.T. Santaella, A.F. Bernardino, X.L. Otero, 2018. The Samarco mine tailing disaster: A possible time-bomb for heavy metals contamination? *Science of Total Environment*, 637-638, 498-506. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.370>

- [39] R.A. Magris, M. Marta-Almeida, J.A.F. Monteiro, N.C. Ban, 2019. A modeling approach to assess the impact of land mining on marine biodiversity: Assessment in coastal catchments experiencing catastrophic events (SW Brazil). *Science of Total Environment*, 659, 828-840.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.238>
- [40] J.C.A. Thomé, C. Baptistotte, L.M.P. Moreira, J.T. Scalfoni, A.P. Almeida, D.B. Rieth, P.C.R. Barata, 2007. Nesting Biology and Conservation of the Leatherback Sea Turtle (*Dermochelys coriacea*) in the State of Espírito Santo, Brazil, 1988–1989 to 2003–2004. *Chelonian Conservation and Biology*, 6(1), 15–27. doi:10.2744/1071-8443(2007)6[15:nbacot]2.0.co;2.
- [41] A.R. Kocmoud, H.H. Wanga, W.E. Granta, B.J. Gallaway, 2019. Population dynamics of the endangered Kemp's ridley sea turtle following the 2010 oil spill in the Gulf of Mexico: Simulation of potential cause-effect relationships. *Ecological Modelling*, 392, 159-178.
<https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2018.11.014>
- [42] C.L. Keen, M.W. Taubeneck, S. Zidenberg-Cherr, G.P. Daston, J.M. Rogers, 1997 Toxicant exposure and trace element metabolism in pregnancy. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 4, 301–308. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(97\)10028-X](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(97)10028-X)
- [43] P. Zárate, A.K. Bjørndal, M. Parra, P.H. Dutton, J.A. Seminoff, A.B. Bolten, 2013, Hatching and emergence success in green turtle *Chelonia mydas* nests in the Galápagos Islands, *Aquatic Biology*, 19: 217–229. doi: 10.3354/ab00534.
- [44] M. Flint, P.A. Eden, C.J. Limpus, H. Owen, C. Gaus, P.C. Mills, 2014. Clinical and pathological findings in green turtles (*Chelonia mydas*) from gladstone, Queensland: investigations of a stranding epidemic. *Ecohealth* 1e12. [http:// dx.doi.org/10.1007/s10393-014-0972-5](http://dx.doi.org/10.1007/s10393-014-0972-5).
- [45] C.A. Villa, M. Flint, I. Bell, C. Hof, C.J. Limpus, C. Gaus, 2017. Trace element reference intervals in the blood of healthy green sea turtles to evaluate exposure of coastal populations. *Environmental Pollution*, 220, 1465–1476. doi:10.1016/j.envpol.2016.10.085.

1 Appendix A

2

3 Table A₁. Digestion conditions of samples collected in Trindade island for metals quantification.

Samples	Protocol	Sample preparation				Microwave programming			
		Average weight of samples(g)	Nitric acid (HNO ₃) (mL)	Hydrochloric acid (HCl) (mL)	Hydrogen peroxide (H ₂ O ₂)	Step 1 Temperature (°C)	Step 1 P (Bar)	Step 1 Time (min)	Power (%)
Sediment	EPA 3051	0.500 dry	9	2	0	180	35	25	80
Eggshells	BMDS - Digestion of Meat and Bone Meal	0.500 dry	8	3	0	200	35	40	80
Egg yolk	BMDS - Digestion of food	0.202 dry	8	0	1	190	--	30	90
Blood	BMDS - Digestion of blood	0.601 wet	2	0	0	190	--	10	90
Kidneys	BMDS- Digestion of tissue	0.110 wet	15	0	0	180	--	120	90
Lives	BMDS- Digestion of tissue	0.452 wet	15	0	0	180	--	120	90

Muscle	BMDS- Digestion of tissue	0.737 wet	15	0	0	180	--	120	90
Turtle shell	BMDS- Digestion of tissue	0.128 wet	15	0	0	180	--	120	90

1 The United States Environmental Protection Agency – (EPA) and the Berghof microwave digestion system – (BMDS).

Appendix B

Table B₁. Operational conditions of the inductively coupled plasma mass spectrometer (NEXION 300D, Perkin Elmer, USA).

Parameter	Operating condition
RF power / W	1550
Plasma gas flow rate / (L min ⁻¹)	16.0
Nebulizer gas flow rate / (L min ⁻¹)	0.98
Auxiliary gas flow rate / (L min ⁻¹)	1.20
Torch	quartz EasyGlide TM
Spray chamber	Borosilicate glass baffled cyclonic
Nebulizer	Concentric (Meinhard type)
Sample uptake and wash time (s)	40
Cones	Ni
Ion lens voltages	Optimized for 1 µg L ⁻¹ Be, Mg, In, U, Ce, Fe, Li, Pb
Dwell Time (ms)	50
Sweeps	45
Number of replicates	3
Isotopes	¹¹¹ Cd, ⁶⁰ Ni, ²⁰⁸ Pb, and ⁵⁵ Mn
Internal standard	¹⁰³ Rh

Table B₂. Operational conditions of the flame atomic absorption spectrometer.

Parameter	Operating condition
Wavelength / nm	248.3
Slit / nm	0.2
Lamp current / Ma	6.0
Flame	acetylene/air
Burner height / mm	6

Fuel flow / (L h ⁻¹)	75
Oxidant flow / (L h ⁻¹)	225
Nebulizer rate / (mL min ⁻¹)	5

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS

Ecotoxicology – submetido (major review)

CAPÍTULO 2:
METAL BIOACCUMULATION AND ITS GENOTOXIC EFFECTS ON EGGS
AND HATCHLINGS OF SOUTH AMERICAN RIVER TURTLES (*Podocnemis*
***expansa*)**

ALEXANDRA FROSSARD

VILA VELHA

JULHO/2020

**Metal bioaccumulation and its genotoxic effects on eggs and hatchlings of giant Amazon river turtle
(*Podocnemis expansa*)**

Alexandra Frossard^a, Gabriel Carvalho Coppo^a, Amanda Toledo Lourenço^b, Otávio Arruda Heringer^c,
Adriana Regina Chippari-Gomes^a

^aLaboratory of Applied Ichthyology, Vila Velha University. Av. Comissário José Dantas de Melo, 21,
Boa Vista, 29102-770, Vila Velha, ES, Brazil.

^bLaboratory of Health and Wildlife, Vila Velha University. Av. Comissário José Dantas de Melo, 21, Boa
Vista, 29102-770, Vila Velha, ES, Brazil.

^cDepartment of Research and Development –Tommasi Ambiental. Av. Arara Azul, 187, Novo Horizonte,
Serra, ES, Brazil

*Corresponding author e-mail address: xandfrossard@yahoo.com.br

Abstract

The aim of this study was to assess whether possible metal contamination in the sediment of the nests of giant Amazon river turtle, *Podocnemis expansa*, could contaminate eggs and hatchlings, triggering genotoxic damage. Therefore, sediments of *P. expansa* nests from two sites in the Brazilian Amazon were evaluated, with the first being collected at Araguaia River and the second at Crixás-Açu River, the mostly impacted by anthropogenic actions. Newly hatched offspring, eggs and sediments were collected from the beaches of these two rivers and the quantification of metals (Al, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb, and Zn) was carried out by atomic absorption spectroscopy. All targeted metals were found in both sediment and *P. expansa* biological samples collected on the beaches presenting higher concentrations in the sediment of Crixás-Açu River. Metals found in the eggshells before nesting and in the egg contents were maternally transferred. Moreover, augmented concentration of metals led by metal transfer from the nests sediments were detected in the eggshells after nesting (ENH) and in the newly hatched offspring (H). Probably this metal relocation to the newly hatchlings augmented the frequency of micronuclei in their blood, presenting 15.25 % in hatchling found in Crixás-Açu River beaches and 10 % in newly hatched animals from Araguaia River beaches. These results indicate the occurrence of maternal transfer of (essential or

not) metals to the eggs in testudines as well as a transference from the sediments to the nesting eggs, triggering genotoxic effects on the hatchlings.

Key words: Bioaccumulation; genotoxicity; turtle; transfer; nesting area.

1. INTRODUCTION

A myriad of detrimental effects is caused to the environment due to accelerated urbanization without proper planning (Pusch 2007) and the continuous expansion of agriculture and degradation of natural resources. Such a chaotic expansion leads to a gradual and continuous loss of terrestrial environments, affecting water resources and associated ecological niches (Martins 2008), as well as decreasing environmental quality and availability/quality of food stocks (Schneider et al. 2009).

Metals are the active compounds of several agrochemical components (Tiller 1989), representing, thus, a common cause of organisms' contamination in anthropogenically impacted areas due to a constant application of agrochemicals to the soil (Ramalho et al. 2000). As a result, testudines can accumulate high levels of different metals, exhibiting pollutants in several tissues, such as muscles, kidney, liver and fat (Burger et al. 2007; Burger et al. 2010; Schneider et al. 2010; Frossard et al. 2013). Metal detection has been particularly well documented for aquatic food webs (Chovanec et al. 2003; Silva et al. 2015). However, more studies regarding trace elements quantification in these reptiles are still necessary, in both natural environments and captivity, despite their status of bioindicator species as noticed by Vazquez et al. (1997); Hopkins et al. (2001); Burger et al. (2007); Roe et al. (2011); Frossard et al. (2013); Frossard et al. (2017); Frossard et al. (2019), and Guzmán et al. (2020).

A testudine species that can be affected by the expansion of agricultural and extractivist activities is *Podocnemis expansa* (South American River Turtle) (Schweigger 1812; Testudines). This species is considered the biggest of its genus in South America, with females reaching lengths greater than 80 centimeters (Pritchard and Trebbau 1984) and weighting up to 90 kilograms (Pritchard 1979). The species has been observed in the basins of several South American rivers, such as Orinoco (Venezuela), Essequibo (Guyana) and Amazonas (Brazil). In Brazil, this species is widely distributed throughout the Amazon basin, its confluents and tributaries, reaching the central region of the country through the Araguaia River and its confluents, such as Crixás–Açu River (Rose 1964; Pritchard and Trebbau 1984; Iveron 1992). Thus, these testudines are widely consumed by riverside populations and the inhabitants of large urban centers (Pezzuti et al. 2010). These animals exhibit long-life spans, diurnal activity and omnivorous eating habits (Malvasio et al. 2003), feeding mainly from the substrate, algae and small fishes. Since they inhabit close to areas with intensive agricultural production and gold panning activities, individuals of this species may be contaminated with metals due to panning processes and agricultural pesticides that are present in the environment.

Some studies investigating the bioaccumulation potential of the testudine group and the effects of contaminants on different stages of their development, such as eggs/embryos, hatchlings in their first year of life, juveniles and adults have been previously reported (Nagle et al. 2001; Frossard et al. 2013; Haskins et al. 2017; Souza et al. 2018; Barraza et al. 2019; Esposito et al. 2020; Frossard et al. 2020).

Nagle et al (2001) identified that there is a maternal transfer of metals to hatchlings turtles of *Trachemys scripta*, as well as embryonic mortality and deformities in hatchlings that correlate with levels of maternal transfer. These authors report that the levels of metals transferred from females to hatchlings of *T. scripta* are comparable to the values maternally transferred by some species of water birds that inhabit irrigation ponds as recorded by Ohlendorf et al. (1986). Muñoz and Vermeiren (2020) suggest in their study with sea turtles that a selective maternal transfer of individual compounds (such as organochlorine pesticides (OCPs), polychlorinated biphenyls (PCBs), polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polybrominated diphenyl ethers (PBDEs)) takes place. According to these authors, this occurs due to biological factors, such as foraging and remigration behavior, and due to the selective mobilization of persistent organic pollutants (POPs) during vitellogenesis. These authors also described that there is an important gap to be investigated, which is related to the knowledge of selective toxicokinetics during embryonic development, since the research so far has focused mainly on the initial absorption of eggs. According to Hopkins et al. (2001) and Burger et al. (2007), the most frequently reported metal poisoning in turtles is associated with selenium (Se). Nevertheless, other metals found to be bioaccumulated in reptiles are arsenic (As), cadmium (Cd), chromium (Cr), copper (Cu), iron (Fe), lead (Pb), and mercury (Hg) (Tryfonas et al. 2006; Andreani et al. 2008). Many of these studies have evaluated the maternal transfer of metals to turtle eggs, but few have evaluated the accumulation of metals in different tissues of hatchlings turtles. Thus, further studies encompassing this group are needed.

Ecotoxicological studies in aquatic and semi-aquatic organisms, such as turtles, are important to evaluate the bioaccumulation toxic effects of specific chemical elements. The effects of metal bioaccumulation on organisms and the exposure to these substances itself, may be detected by the resulting genetic damage. Therefore, these animals can be used as excellent biomarkers and as an effective early warning tool for ecological risk assessments and biomonitoring (Park and Choi 2007). Loss of DNA integrity can cause genotoxic damages, such as DNA base modifications, strand breaks, DNA adducts and crosslinking (Shugart 2000, 1990; Shugart and Theodorakis 1998; Frenzilli et al. 2009). These damages have been associated with carcinogenesis and detrimental effects on fecundity, longevity and growth rates of the affected organisms, which may have significant demographic implications (Theodorakis et al. 2000). Micronuclei (MN) testing is a sensitive, rapid and extensively method applied as a genotoxic biomarker for wild species (Zapata et al. 2016). It enables the quantification of DNA damage induced by physical and chemical agents since it detects chromosomal and DNA damage at an early stage (Jha 2008).

According to Roe et al. (2004), the exposure to contaminants in the embryonic phase may be harmful to oviparous organisms, leading to low hatching success. Embryos' exposure to contaminants can occur by transfer from the female or/and from the environment in which the nest was placed (Roe et al. 2011; Frossard et al. 2020). According to Valdes et al. (2015), contaminants present in the incubation sediment alters the structure and fat of the egg shells, making it reasonable to infer that the reduction of total fat together with calcium affects the rates of water transport to the embryo, interfering with embryonic development. Reptiles with more flexible eggshells, such as *P. expansa*, are more sensitive to changes in water of the environment, and embryonic metabolism is directly affected by the availability of water (Packard et al. 1982). With the decrease in total fat, the transport of water through the eggshell can

be enhanced and this greater absorption can affect hatching rates (Packard et al. 1982). Valdes et al. (2015) observed significant reduction on hatching rates of *P. expansa* eggs during single exposure to high concentrations of agrochemicals in the incubation sediment. Sparling et al. (2006) also reported that eggs of *T. scripta elegans* showed reduced hatchability after exposure to high concentrations of herbicides in the sediment, as well as Souza et al. (2018) observed a decrease in hatchability rate in *Chelonia mydas* exposed to the incubation sediment containing metals. So, if the eggs exposition to contaminated sediment can affect the hatchability rate of turtles, what effects can happen with hatchlings that survive to the incubation period?

Therefore, the objective of this study was to evaluate eggs and hatchlings of *Podocnemis expansa* hatched in beaches impacted by anthropogenic actions (Crixás-Açu River) and in an Environmental Protection Area (Araguaia River - EPA), by quantifying metals (Al, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb, Sn, and Zn) in eggshells, eggs contents, hatchlings (some tissues) and nest sediment, as well as analyzing the genotoxic profile in the blood of the newly hatched turtles.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Sampling area

Podocnemis expansa (giant Amazon river turtle) biological samples were obtained from two areas: 1) In the Environmental Protection Area (EPA) assigned as Meanders of the Araguaia River and 2) In the advanced base of the “Projeto Quelônios da Amazônia” (Amazon Chelonian Project (ACP) of the Crixás-Açu River/ ‘Barra’ Farm, Goiás, Brazil.

The Meanders of the Araguaia River (EPA area) is one of the bases of the Amazon Chelonian Project (ACP), from the National Center for Reptile and Amphibian Management and Conservation (RAMC) of the Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation (ICMBio). This environmental protection area is located on the southern tip of Bananal Island, the largest river island in the world. All local beaches are located in preserved areas, far from private lands. The protected area has 22 beaches, 16 of which are river point bars beaches and six are mid-channel bars beaches. These sandbars emerge during the dry season, from June to October, and are used as nesting sites by the South American River Turtle (Brazil 1998).

The second area (Crixás-Açu River/ ‘Barra’ Farm, Goiás, Brazil) covers 5 beaches, spread over 25 km of the Crixás-Açu River. In this area, the protection of South American River Turtles has been annually performed by field agents of the Brazilian Institute of Environment and Renewable Natural Resources (IBAMA), in which the turtles can nest in a relatively well-preserved area of the Crixás-Açu river. The floodplain of the Crixás-Açu river is characterized by several marginal lakes. Although its vegetation cover is relatively well preserved on the right bank, the left bank is more fragile, and the deforestation extends up to the riverbanks, which presents merely a fragmented riparian forest. This channel exhibits high sinuosity and broad meanders, but it is short in length. From June to October, the Crixás-Açu River reaches its lowest level and exposes its beaches, which are used by turtles as nesting sites. In the Crixás-Açu river, the river level decrease is decelerated and gradual, however, its flood regime is rapid and irregular. Sandbars exposure within the channels foments water to reach depths of less than 30 cm in several locations (Ferreira Júnior and Castro 2006).

2.2 Samples acquisition

Samples of eggs and hatchlings of the giant Amazon river turtle, *Podocnemis expansa*, were used. Biological samples were collected from eight nests in Meanders of the Araguaia River (EPA) and three nests in Crixás-Açu River. Four eggs were collected from each nest at the egg-laying period from the female cloaca (divided in shell and egg contents), four eggshells of hatchlings, three newly hatched turtles and sediment samples. Samples were collected during the nesting season of 2016 at Meanders of Araguaia River-TO/GO EPA and the assembling took place during the 2017 season at the Crixás-Açu River.

Sampling methodology and all the procedures were conducted respecting the following authorizations for scientific activities: Ministry of the Environment - MMA; Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation - ICMBio; Biodiversity Authorization and Information System - SISBIO (Number: 50290-1); and Committee on Ethics in Animal Use at Vila Velha University - CEUA (# 357-2015), for the 2015/2018 breeding seasons.

As soon as turtles were spotted climbing the beach to lay their eggs in their nests, four eggs from each nest were collected at the egg-laying time directly from female cloaca, for shell (ELT) and egg contents (EC) samples. At the end of the incubation time (approximately 60 days), more samples were collected in the same nests: eggshells of newly hatchlings (ENH), hatchlings (H), and the nest sediment. Afterwards, all samples were subjected to metal analysis.

Hatchlings underwent biometric analysis, followed by blood collection and their euthanasia, for tissue removal. The removed tissues were stored at -20°C freezer until taken, on dry ice by air, to the Laboratory of Applied Ichthyology (LabPeixe), at the University Vila Velha (UVV-ES). At LabPeixe, all biological samples were prepared for bioaccumulation analysis and the sediment samples were prepared for the metal quantification analysis. The collected blood was used in genotoxicity test (Micronucleus Test). Subsequently, slides were also prepared at each sampling site for this test and the cell count was performed at LabPeixe/UVV.

2.2.1 Blood and tissue sampling

Hatchlings were physically restrained, and blood was collected by intrathecal puncture using a 1.0 mL syringe and 25x7 heparinized needle. After blood collection, the animals were euthanized with an intrathecal injection of lidocaine 3 %. Kidney, liver and shell samples were dissected for metal determination.

2.2.2 Biometry

Samples were assessed with a tape measure. The curvilinear shell length (CSL) and curvilinear shell width (CSW) were measured in all animals, which were then weighed on an analytical balance.

2.3 Genotoxic Analysis - Micronuclei Test

The blood of each animal was collected and dripped on two slides to perform blood extensions, immediately after the animals' euthanasia. After drying at room temperature for a period of 24 hours, the slides were subjected to a 30-minute bath in methanol P.A (100 %) for fixation of erythrocyte cells.

Samples were then stained with a 5 % Giemsa solution for 40 minutes; washed with distilled water and dried at room temperature for 24 hours, as described by Grisolia et al. (2005). After drying, the material was observed under light microscope at 400x magnification. One thousand blood cells (erythrocytes) were counted on each slide to quantify micronuclei. The values of micronuclei obtained in the present work correspond to an average count of the two slides per hatchling. The micronuclei (MNs) were identified following the criterion proposed by Fenech et al. (2000).

2.4 Metal Quantification

Extraction for trace metal determination followed the EPA 3051 methodology. The eggshell, egg contents and sediment were dried at 60 °C for 24 hours. The eggshells (ELT) and egg contents (EC) were grounded and homogenized separately. Only the tissues were digested without drying. All materials were digested in nitric acid (HNO₃) to a total volume of 2 mL. Digestion was carried out overnight at first, followed by hot plate at 40 °C for approximately two hours, until the solution was translucent. After digestion, the samples were filtered and transferred to a 15 mL falcon tube, and the volume adjusted with type 1 ultrapure water.

Nine distinct trace elements were determined in sediment and in biological samples: aluminum (Al), cadmium (Cd), chromium (Cr), copper (Cu), iron (Fe), lead (Pb), manganese (Mn), tin (Sn), and zinc (Zn). Trace elements analysis of previously digested samples was carried out using an Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP OES) iCAP 6000 Series (Thermo Fisher Scientific, England), equipped with an autosampler, Cetac Autosampler ASX-520 (Thermo Fisher Scientific, England). Sample introduction system used was composed of a cyclonic chamber and concentric nebulizer. The system was controlled using iTEVA™ Instrument Control software (Thermo Fisher Scientific, England).

The analysis quality control was performed using two certified reference materials for metal analysis. The reference material used for sediments was the BCR-667 (Institute for Reference Material and Measurements®), and the reference material of fish muscle was the ERM - BB422 (European Reference Materials®). Samples of these certified reference materials were treated and analyzed exactly as described above.

2.5 Statistical analysis

Results were analyzed for normality using Shapiro-Wilk test, followed by Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks, to perform the comparison between the eggshells at the laying time (ELT) and the eggshells of newly hatchling (ENH), between the two sites (Araguaia River and Crixás River). A Mann-Whitney's test was also performed for comparative analyzes between the metal concentrations in eggshells at laying time (ELT) and egg contents (EC), and between eggshells of newly hatchlings (ENH) and hatchlings (H), for each sampling site separated. To perform these comparisons, data from hatchlings tissues was calculated at a dry weight base using as reference *Chelonia mydas* hatchling water contents (72.5 %) according to Godley et al. (1999).

The Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks was also performed for each hatchling tissue sample to investigate differences in the quantities of bioaccumulated metals between

tissues, followed by the Dunn *a posteriori* test to evaluate the differences between the averages of each site. Data were presented as medians and the respective ranges and quartiles. In order to verify the significance of the data obtained in this study, the analysis were performed separately for the micronucleus and for the bioaccumulation tests on turtle tissues in the SigmaStat program (11.0).

Principal component analysis (PCA) was also carried out, ordering sampling units for each evaluated tissue by the descriptors used (concentration of the metals analyzed), with separated analysis for each site. This multivariate analysis was conducted with the software R 3.3.2. Before this analysis, all data were standardized using the “standardize” method of the “decostand” function, from “vegan” R package. Standardization tends to increase the influence of variables denoting small variance and to reduce the influence of variables with large variance. Furthermore, the standardization procedure eliminated the influence of different measurement units and generated a dimensionless data.

Also, Pearsons’ correlation test was conducted, separated for each site, to verify the existence of a correlation between the concentration of each metal in the hatchlings and their micronuclei frequency.

3. RESULTS

3.1 Biometry

Females sampled at the experimental nests in the APA Meanders of the Araguaia River presented a length of 0.62-0.76 m, width of 0.52-0.72 m and weight of 18-41 Kg. The collected hatchlings had a length of 5.3-6.1 cm, width of 5.4-6.0 cm and weight of 19.0-30.0 g.

Regarding the beaches of Crixás-Açu river, the females sampled at the experimental nests exhibited a length of 0.62-0.73 m, a width of 0.52-0.61 m; and weight of 19.6-31.5 Kg. The collected hatchlings were 5.3-6.2 cm long, 5.3-6.0 cm wide and had 19.0-29.8 g.

There were no significant differences in the size of egg laying females nor in hatchlings between the two locations.

3.2 Metal quantification in sediment

Sediment samples from both sites presented all measured metals, however, the sediment from Crixás-Açu River nests portrayed higher concentrations of Al, Cd, Cr, Cu, Fe and Mn (Table 1) in comparison to the nests’ sediment of the Araguaia river. It is important to highlight that Cu, Fe, Mn, and Zn were 4.35-fold, 4.56-fold, 11.70-fold, and 20.22-fold respectively, higher in the sediment from Crixás-Açu river than Araguaia river. In another hand, Pb and Sn were found in similar concentrations in both sites.

3.3 Metal quantification in the eggshells, in the egg contents, and in the aggregate of total tissues of *Podocnemis expansa* hatchlings

Figure 1 displays the accumulation of some metals in eggshell (ENH) after the incubation period in their nests (about 60 days) in comparison to the eggshells at laying time (ELT), for both sampling sites. Furthermore, maternal transfer of both essential (Cr, Cu, Fe, Mn, and Zn) and non-essential (Al, Cd, Pb, and Sn) metals to the eggshells at the egg laying time (ELT) was observed.

In Figure 1, it is still possible to observe that the hatchlings' eggshells (ENH) collected in the Crixás-Açu River presented a higher metal concentration than the ones collected at Araguaia River, after the incubation period, with significantly larger values for six metals (Al, Cd, Cr, Fe, Mn, and Pb), and considerably larger values for five metals (Al, Cd, Mn, Pb, and Sn) in the comparison with eggshells at laying time (ELT).

The comparison between egg contents sampled at the laying period (EC) and hatchlings (H - sum of the tissues samples analyzed (liver, kidney and shell)) shows a significant increase in the concentration of most metals in the latter group (H) for both sampling sites (Figure 2). *Podocnemis expansa* egg contents (EC) portrayed no difference between both sites.

Tin and cadmium were not detected in the egg content samples. Nevertheless, 0.0005 Sn and 0.0076 Cd were quantified in the Araguaia River hatchlings (H), while in the Crixás-Açu River samples were quantified 0.0064 of Sn and 0.0003 of Cd. This same figure 2 shows that the concentrations of Cu, Sn and Zn were significantly higher in hatchlings from Araguaia River ($P < 0.001$, $P = 0.037$, and $P = 0.001$, respectively) than hatchlings from Crixás-Açu River.

Eggshell at laying time (ELT) was compared with egg contents (EC) (table 2). Most of metals (Al, Cd, Cu, Mn, Pb, and Sn) had significantly higher concentrations in ELT in relation to EC, for both sites. Zinc was higher in egg contents for both sites as well. Cr and Fe were higher in EC of Araguaia River, and both metals have similar concentrations in ELT and EC of Crixás-Açu River.

Eggshell after the incubation period in nests (ENH) were compared with hatchlings (H) (table 2). Eggshell from hatchlings incubated on nests of Crixás-Açu River beaches presented significantly higher concentrations of metals compared with hatchlings, except for Zn (table 2). The opposite situation occurs on the beaches of the Araguaia River, since the concentration of metals in hatchlings was significantly higher than eggshell, with the exception of Mn. Tin didn't present differences in concentration (table 2).

3.4 Metal quantification in tissues of *Podocnemis expansa* hatchlings

The quantity of metals in the tissues (kidney, liver and shell) of the *P. expansa* hatchlings on the beaches of Meanders of Araguaia River (APA) were evaluated through the PCA presented in Figure 3A. This analysis indicates that the kidney had larger accumulation of Cr and Pb among all tissues analyzed; the liver accumulated more Cd, Cu, Fe, Mn, and Sn; and the shell exhibited higher Al concentrations.

PCA carried out with metal concentration data from tissues (kidney, liver and shell) of *P. expansa* hatchlings from the beaches of the Crixás-Açu River (Figure 3B) evidences that the kidney accumulated small quantities of every metal, but exhibited predominance of Al, Cr, and Pb. The liver accumulated superior amounts of Cd, Cu, Fe, Mn, Sn, and Zn while the shell denoted higher values of Cr, Pb and Al.

PCA analysis outcomes of the hatchlings tissues from the Araguaia River are shown in Table 3. The first two axes collectively explained 65.3 % of the total variation in metal concentration in the evaluated tissues of *P. expansa*. The first axis represents 49.69 % of the total data variance, with positive scores attributed to the metals Al, Cr and Pb, while Cd, Cu, Fe, Mn, Sn and Zn showed negative scores on this axis.

The results of the PCA analysis for hatchlings tissues from the Crixás-Açu River are shown in Table 4. The first two axes collectively explained 70.97 % of the total variation in metal concentration in the evaluated *P. expansa* tissues. The first axis represents 46.78 % of the total data variance, with positive scores attributed to the metals Al, Cd, Cu, Fe, Mn, Sn and Zn, while Cr and Pb portrayed negative scores on this axis.

3.5 Genotoxic Analysis - Micronuclei Test

The frequency of quantified micronuclei was significantly higher in the Crixás-Açu River animals ($P = 0.006$), with an average of 15.25 ‰ micronuclei. However, hatchlings on the Araguaia River beach presented 10 ‰ erythrocyte micronuclei which was also an elevated average. These values are more preeminent when compared to other turtles, such as the *Chelonia mydas* hatchlings found in Trindade Island, an oceanic island located at 620 miles offshore without direct anthropogenic impacts, which averaged 1.3 ‰ micronuclei after hatching (Table 5).

The correlation analysis between each metal quantified in the hatchlings and the frequency of micronuclei found showed that there are no specific correlations (table 6).

4. DISCUSSION

The quantification of metals (Al, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb, Sn, and Zn) in the hatchlings of giant Amazon River turtle reveals two possible sources of accumulation. The first accumulation of metals may come from the females during egg production, and the second source is from the metals transfer of sediment from the nests to the newly hatched turtles. Despite of the eggshell efficiency to prevent metals transfer from the environment to the embryo, this barrier was not sufficient to completely inhibit metals transfer to the hatchlings, which resulted in their bioaccumulation in tissues. This transfer of metals, especially for the nonessential ones, is the feasible cause of the genotoxic damage observed in hatchlings, as highlighted by the elevated incidence of erythrocytes micronuclei.

The large numbers of erythrocyte micronuclei found in the hatchlings (15.25 ‰ and 10 ‰ in hatchlings of Crixás-Açu River and Araguaia River, respectively), is a significative evidence of the sediment's toxicity and damaging effects on hatchlings. These results indicate a loss of DNA integrity in *P. expansa* individuals, considering that these values are significantly superior to those found by other authors: Zapata et al. (2016) observed a frequency of 0 to 2 MN in *T. callirostris* blood samples collected in areas without anthropic interference (negative control); and Frossard et al. (2020) observed a MN frequency of 1.3 ‰ in *C. mydas* hatchlings on preserved beaches of Trindade Island. In contrast, hatchlings from *Podocnemis unifilis* exposed to copper for 60 days presented similar MN values (12 ‰) (Frossard et al. 2013) to those found in the present study. These observations indicate that the existing environmental conditions on the beaches of both rivers, whether in a Conservation Unit or not, are prone to significant anthropogenic interference. According to some authors (Shugart 1990; 2000; Shugart and Theodorakis 1998; Jha 2008), loss of DNA integrity can cause genotoxic effects such as DNA base modifications, strand breaks, DNA adducts, and crosslinking. These types of damages have been associated with carcinogenesis and detrimental effects on fecundity, longevity and growth rates of the affected organisms, which may have important demographic implications (Theodorakis et al. 2000).

Therefore, evidence of genotoxic damage as observed here can be considered a useful biomarker, employed as an effective early warning tool in ecological risk assessment and environmental biomonitoring (Park and Choi 2007).

The results obtained in the present study also shows that there are no specific correlations of erythrocyte micronuclei with a particular metal. In this case, the sum of the individual metal effect, or the potential synergistic (>additive) of them may be the reason of the increase on micronuclei frequency. In addition, and concomitant to metals accumulation, other biotic and abiotic agents may be present in the eggs producing this genotoxic effect that we did not test for.

Maternal transfer of metals has also acted in these genotoxic effects on hatchlings turtle, since this type of transfer was observed in the present study, where an accumulation of metals in the eggshells and egg contents was noticed for both essential (Cr, Cu, Fe, Mn, and Zn) and nonessential (Al, Cr, Pb, and Sn) metals. Maternal transfer of metals has also been reported in previous studies (Sakai et al. 1995; Keen et al. 1997; Nagle et al. 2001; Roe et al. 2004; Guirlet et al. 2008). According to Sakai et al. (1995), a feasible pathway for turtles to excrete excess metal is through reproduction by transferring the pollutants to their eggs. As females acquire metals through the food chain, these elements can be stored or disposed by them (Burger and Gochfeld 1991). The transference of essential metals, such as Cu, Se and Zn, is important to promote standard embryo growth, enabling normal functioning of both cellular and structural metabolisms as well as precise operation of several vital proteins (Eisler 1998; Pappas et al. 2006). Therefore, maternal transfer to egg is necessary for successful embryo development (Keen et al. 1997). However, a study on bioaccumulation in freshwater turtles (*Trachemys scripta* and *Chrysemis picta*) pointed out higher Cd levels, suggesting that maternal transfer of toxic elements to eggs could be advantageous to the females, as they could regularly decrease the concentration of metals in their own bodies during nesting events (Nagle et al. 2001). On the other hand, the question of how these compounds impact embryo development and physiological systems obviously arises (Roe et al. 2004). In this study, lower metal concentrations were found in egg contents (EC) in comparison to eggshells (ELT). This difference in metal transfer between these two compartments may indicate a strategy for embryo protection, in which females transfer greater concentrations of metals to the eggshells. However, the effects of metals on the newly hatchling turtles could not be avoided, since there also have a transfer of metals from the contaminated sediment of the nests to the hatchlings.

The giant Amazon river turtle is an opportunistic omnivorous animal, with predominant herbivore habit. Its diet is varied and includes fruits, flowers, seeds, stems, roots and leaves as well as insects crustaceans, mollusks and fishes (Pritchard and Trebbau 1984; Ernst and Barbour 1989; Luz 2005). As the food preference is predominantly herbivorous for these animals (Vogt 2008), it is assumed that the accumulation of metals in their tissues is relatively low compared to several other species presenting other feeding habits. Nevertheless, these levels are still significant, especially if these turtles feed on polluted environments. In the present study, an accumulation of metals was recorded in the *P. expansa* individuals, since was observed maternal transfer of metals to the eggs.

Contaminants' influence on certain freshwater turtle species were examined by previous studies (Burger and Gibbons 1998; Nagle et al. 2001; Henny et al. 2003; Tryfonas et al. 2006; Valdes et al. 2015; Frossard et al. 2020). According Nagle et al. (2001) incubation of *Trachemys scripta* embryos in ash

polluted soil could be associated with reduced embryo survivorship. Tryfonas et al. (2006) identified variations in the amount of metals (Al, Cd, Cu, Cr, Mn, Ni, Pb, Sn, and Zn) between eggshells and egg contents of *Trachemys scripta* elegans and they concluded that Al, Cu, Mn, Sn, and Zn detected in the egg content can be related to the concentrations available in sediments, to the time spent by *T. scripta* females in the water, and to their eating habits. The present study observed higher proportions of metals (Al, Cd, Cu, Mn, Pb, and Sn) in eggshells at the time of laying (ELT) in relation to egg contents. According to Tryfonas et al. (2006) the high levels of Zn in egg contents, compared to eggshells and other metals, were probably due to the essentiality of Zn for embryonic development. In the present study, we confirmed this hypothesis since greater amounts of Zn and Fe were also observed in the egg contents of *P. expansa* from both sites than in the eggshell. However, during such natural transfer process, non-essential metals are also transferred, including Cd, Ni, and Pb (Frossard et al. 2020), and also Al in the present study. Even Burger and Gibbons (1998) identified that the concentrations of Pb, Hg and Se were higher in the egg content than in the shell of *T. scripta*.

Regarding the metals quantified in the sediment of the two locations in this study, it is observed that there is a greater amount of metals (such as Al, Cd, Cr, Cu, Fe, and Mn) in the sediment of the beaches of the Crixás-Açu river in relation to the sediment of the Araguaia beaches. This situation may be due to the stronger ongoing anthropic influence in the area of the Crixás-Açu River, which receives domestic, industrial, agricultural, etc., effluents. Another feasible explanation would be the geomorphological differences between both studied areas. These distinctions between the nesting areas of Araguaia River and Crixás-Açu River are significant and may also influence the movement of contaminants' as well as their sedimentation on bar sands, leading to a consequent bioaccumulation of contaminants. According to Castro and Ferreira Júnior (2008), the beaches of the Crixás-Açu River are higher, compared to the river water level, than those of the Araguaia River. However, it is common that almost every year the nests of Crixás-Açu become totally flooded during the rainy season, while the nests located at the Araguaia are less influenced by rising water levels. These events are due to the deeper insertion of the Crixás-Açu River in its basin, an insertion that results in a narrower channel with higher riverbanks. With higher precipitation levels during the rainy season, the waters become restricted within the river channel, resulting in fast water level rises, wherein the water can reach the most elevated areas of the riverbanks.

Conversely, the Araguaia River floodplain is wider and, therefore, its water level rises at a slower rate despite the larger water volume, with a greater dilution potential than those found in smaller rivers, such as the Crixás-Açu. According to Castro and Ferreira Júnior (2008), this geomorphological difference in association with the seasonal variations of rainfall regime ultimately affects the reproductive success of turtles and could also play a significant role regarding metals' concentration and other bioavailable contaminants in river sediments. In addition, expansion of agricultural frontiers and the proliferation of gold mining activities have been observed in the Upper Araguaia River basin from the 1970s onwards, particularly on the side of Goiás state where the Crixás-Açu River is located, with a significantly intensification of natural resources degradation. These impacts may be the reason for the larger amount of metals accumulated in eggshells after the incubation period (ENH), since the

concentration of most metals (Al, Cd, Cr, Fe, Mn, and Pb) in eggshells of this site are significantly greater than those found in eggs incubated in nests of the Araguaia River beaches.

As reported, the nests sediment of both sites transfers metals to the eggshell (ENH) and, consequently, to the hatchlings turtle. However, a significantly greater amount of metals is observed in the eggshells from the nests of the Crixás-Açu river, probably due to the greater amount of metals present in the soil of this region. According to Valdes et al. (2015), water and gases are exchanged between the egg/embryo and the incubation environment by a natural process. However, together with the necessary components for the formation of the embryo, essential and non-essential metals were also absorbed, causing differential accumulation of these metals in the different tissues studied, which must also have been the cause of genotoxic damage observed on newly hatchling turtle, as detected in the present study. Frossard et al. (2020) observed similar results in eggs of *Caretta caretta* after Fundão dam failure, in Minas Gerais State, Brazil that reached the nesting areas of this specie in Espírito Santo, Brazil. Even these authors identified high values of erythrocyte micronuclei in the newly hatchling turtles.

Nagle et al. (2001) found no relationship between the type of incubation substrate and the contamination by trace elements of the developing hatchlings. However, they suggest that the elements dissolved in the water next to the incubation sediment may enter the egg through the pores of the limestone shell and be absorbed by the shell membranes due to the fact that the turtle eggs have a flexible shell and have been shown to absorb a considerable amount of water during development. In the present study, we observed that the accumulation of Cd, Cu, and Zn in the hatchlings occurred differently between the two studied sites. The hatchlings hatched in the Araguaia River had higher amounts of these metals, and less in their eggshells. This fact can be corroborated by the combined action of the absorption of metals from water and incubations' sediments of the turtles' eggs.

The hatchlings' tissues with the highest metal bioaccumulation in beaches of both rivers were the kidney and the liver, demonstrating their strategies of filtering out and metabolizing these substances. Although it was the shell that had the strongest relationship with Al and Zn, the liver was the tissue with the largest Cd, Cu, Fe, Mn, and Sn amounts, followed by the kidney, with the largest Cr and Pb values. Studies on the distribution of metals in newly hatchlings turtle's body are scarce, but multiple studies with adults and eggs turtles show that usually metals concentrate in the order of kidneys, liver, muscle and in their eggs (Storelli e Marcotrigiano 2003; Jakimska et al. 2011; Ross et al. 2017). Frossard et al (2020) also identified a predominance of Cd and Mn in liver, Pb in kidney, Ni in carapace and Fe in blood of hatchlings of *C. mydas*. Physiologically, different elements are processed by the body through different metabolic mechanisms (Ross et al. 2017), following similar patterns of metal accumulation among marine vertebrates. For example, As, Cd, Hg, and Pb are often found to concentrate most highly in specific tissues in marine turtles, in that As concentrations tended to be highest in muscle, Cd concentrations inclined to be highest in kidneys, Hg in the liver, and Pb levels tended to be higher in calcified tissues, specifically bones and carapace (Storelli and Marcotrigiano 2003; Agusa et al. 2008; Jakimska et al. 2011; Perrault 2012). However, even closely related species can show great variation in metal contents, or even the same species in different places, which complicates making general predictions of metal accumulation rates (Fairbrother et al. 2007; Ross et al. 2017).

The results of this study emphasize that the hatchlings of and *P. expansa* can accumulate metals from maternal transfer and from nests' sediments, which can affect their health. Since genotoxic damage may occur, with effects that could be associated with carcinogenesis and effects on the growth rate of affected organisms (Theodorakis et al. 2000). Hatchlings' turtles contaminated with metals could also have problems with the righting time, since Frossard et al. (2013) observed that this behavior was affected by exposure to the Cd-contaminated diet after 30 days on *P. unifilis*. This behavior is frequently observed in young aquatic turtles (Burger 1976) and if it is harmed it can increase exposure to predation or sensitivity to dehydration (Finkler 1999; Steyermark and Spotila 2001; Kolbe and Janzen 2002). The ability to correct (that is, the correction response) may therefore be related to juvenile survival and, therefore, be a critical fitness component for juvenile turtles exposed to contaminants.

5. CONCLUSION

We concluded that eggs and hatchlings of *Podocnemis expansa* hatched in beaches of Crixás-Açu River and Araguaia River acquired metals (Al, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb, Sn, and Zn) from maternal transfer and from nests' sediments. The accumulation of metals occurred at different extents depending on in the tissues analyzed (liver, kidney and shell), and this metal accumulation in the hatchlings of *P. expansa* provoke an increase in the frequency of erythrocyte micronuclei. We also conclude that hatchlings of *P. expansa* appear to be useful bioindicators of metal contamination.

6. ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank ICMBio/RAN, IBAMA and their respective Amazon Chelonians Project (ACP) for carrying out the sampling expeditions when possible, especially Ana Paula Lustosa and Leo Caetano Fernandes da Silva. The authors would also like to gratefully acknowledge the Higher Education Personnel Improvement Coordination - Brazil (CAPES) for providing postgraduate stipends for the student Alexandra Frossard. The authors also thank all their undergraduation students and the local people for their logistical support in the field, and for all field work assistance during the monitoring of females and nests on the island's beaches. The authors also acknowledge Marli de Oliveira Silva for her assistance with the chemical analysis. The authors would like to thank to Research and Development Department of Tommasi Ambiental for the trace element analysis and support assistance. This work was supported by Espirito Santo State Scientific Research Foundation (FAPES), grants # 76413730/16.

7. COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

ETHICAL APPROVAL

Sampling methodology and all the procedures realized in this study were conducted respecting the following authorizations for scientific activities: Ministry of the Environment (Ministério do Meio Ambiente (MMA)); Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation (Instituto Chico Mendes de

Conservação da Biodiversidade (ICMBio)); Biodiversity Authorization and Information System (Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) (Number: 50290-1)); and Committee on Ethics in Animal Use at Vila Velha University (Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) (# 357-2015), for the 2015/2018 breeding seasons.

8. REFERENCES

Agusa T, Takagi K, Iwata H, Tanabe S (2008) Arsenic species and their accumulation features in green turtles (*Chelonia mydas*). Mar Pollut Bull 57(6-12):782-789.

<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2008.01.010>

Andreani G, Santoro M, Cottignoli S, Fabbri M, Carpenè E, Isani G (2008) Metal distribution and metallothionein in loggerhead (*Caretta caretta*) and green (*Chelonia mydas*) sea turtles. Sci Total Environ 390:287-294. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.09.014>

Barraza AD, Komoroske LM, Allen C, Eguchi T, Gossett R, Holland E, Lawson DD, LeRoux RA, Long A, Seminoff JA, Lowe CG (2019) Trace metals in green sea turtles (*Chelonia mydas*) inhabiting two southern California coastal estuaries. Chemosphere. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.107>

Burger J (1976) Behavior of hatchling diamondback terrapins (*Malaclemys terrapin*) in the field. Copeia 1976:742-748. <https://doi.org/10.2307/1443457>

Burger J, Campbell KR, Murray R, Campbell TS, Gaines KF, Jeitner C, Shukla T, Burke S, Gochfeld M (2007) Metal levels in blood, muscle and liver of water snakes (*Nerodia* spp.) from New Jersey, Tennessee and South Carolina. Sci. Total Environ 373(2/3):556-563. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.06.018>

Burger J, Gibbons JW (1998) Trace elements in egg contents and egg shells of slider turtles (*Trachemys scripta*) from the Savannah River site. Arch Environ Contam Toxicol 34:382-386. <https://doi.org/10.1007/s002449900334>

Burger J, Gochfeld M (1991) Cadmium and lead in common terns (*Aves Sterna-Hirundo*) relationship between levels in parents and eggs. Environ Monit Assess 16:253-258. <https://doi.org/10.1007/BF00397612>

Burger J, Jeitner C, Schneider L, Vogt RC, Gochfeld M (2010) Arsenic, Cadmium, Chromium, Lead, Mercury, and Selenium levels in blood of four species of turtles from the Amazon in Brazil. J Toxicol Environ Health Part A 73:33-40. <https://doi.org/10.1080/15287390903248877>

Brasil (1998) Decreto de 2 de outubro de 1998. Dispõe sobre a criação da Área de Proteção Ambiental dos Meandros do rio Araguaia nos Estados de Goiás, Mato Grosso e Tocantins e dá outras providências. Brasília, Diário oficial da República Federativa do Brasil, pp 4

Brendon J.C, Bradley J, Skinner JM (1995) Differences between standard and high-sensitivity immunohistology in tissue sections — comparison of immunoperoxidase staining methods using computerized video image analysis techniques. *Pathology* 27-3: 221-223.
<https://doi.org/10.1080/00313029500169013>

Castro PTA, Ferreira Júnior PD (2008) Caracterização ecogeomorfológica das áreas de desova de quelônios de água doce (gênero *Podocnemis*) no entorno da ilha do bananal, rio Araguaia. *Geografias Artigo Científicos*. 04:15-22

Chovanec A, Hofer R, Schiemer F (2003) Fish as bioindicators Bioindicators and biomonitoring. *J. Trace Elem. Med. Biol* 6:639-676

Eisler R (1988) Lead hazards to fish, wildlife, and invertebrates: A synoptic review. US Fish and Wildlife Service. *Biol Rep*. 85:1-14

Ernst CH, Barbour RW (1989) *Turtles of the world*. Washington and London: Smithsonian Institution. pp 313

Esposito M, Roma AD, Sansone D, Capozzo D, Iaccarino D, Nocera F, Gallo P (2020) Non-essential toxic element (Cd, As, Hg and Pb) levels in muscle, liver and kidney of loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) stranded along the southwestern coasts of Tyrrhenian sea. *Comp Biochem Physiol C Toxicol*.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108725>

Fairbrother A, Wenstel R, Sappington K, Wood W (2007) Framework for metals risk assessment. *Ecotoxicol Environ Saf* 68:145–227. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.03.015>

Ferreira Júnior PD, Castro PTA (2006) Características geológicas das áreas de nidificação da tartaruga-da Amazônia (*Podocnemis expansa*) no rio Crixás-Açu no Estado de Goiás, Brasil. *Acta Amazon*. 36:249–258. <http://dx.doi.org/10.1590/S0044-59672006000200015>

Fenech M (2000) The in vitro micronucleus technique. *Mut Res*. 455:81-95.
[https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00065-8](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00065-8)

Finkler MS (1999) Influence of water availability during incubation on hatchling size, body composition, desiccation tolerance, and terrestrial locomotor performance in the snapping turtle *Chelydra serpentina*. *Physiol. Biochem. Zool*. 72:714–722. <http://dx.doi.org/10.1086/316711>

Frenzilli G, Nigro M, Lyons BP (2009) The Comet assay for the valuation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 681:80–92. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.03.001>

Frossard A, Ferreira PD, Carneiro MTWD, Heringer DC, Endringer OA, Gomes LC (2013) Effect of dietary cadmium on fitness, growth, genotoxicity and accumulation in the Yellowspotted River Turtle, *Podocnemis unifilis*. *Aquat Toxicol* 141:239–241. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.06.002>

Frossard A, Leite FLG, Silva ELF, Carneiro MTWD, Gomes LC, Rossi Júnior JL, Endringer DC (2019) Snake *Bothrops jararaca* (Squamata: Viperiadae) is a suitable bioindicator of environmental Cadmium exposure. *Ecol Indic*. 104:166-171. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.04.079>

[Frossard A, Carneiro MTWD](#), Silva ELF, Camargo-Filho CB, Rossi Júnior JL (2017) Concentração de elementos traços em serpentes do litoral e da região serrana do Espírito Santo. *Pesq Vet Bras*. 37-10:1146-1152. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2017001000017>

Frossard A, Vieira LV, Carneiro MTWD, Gomes LC, Chippari-Gomes AR (2020) Accumulation of trace metals in eggs and hatchlings of *Chelonia mydas*. *J. Trace Elem. Med. Biol* <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2020.126654>

Frossard A (2020) Avaliação toxicológica de metais em testudines. PhD. Thesis - Universidade Vila Velha, Vila Velha

Grisolia CK, Rivero CLG, Starling FLRM, Silva ICR, Barbosa AC, Dorea JG (2009) Profile of micronucleus frequencies and DNA damage in different species of fish in a eutrophic tropical lake. *Genet Mol Biol* 32:138–143. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572009005000009>

Guirlet E, Das K, Girondot M (2008) Maternal transfer of trace elements in leatherback turtles (*Dermochelys coriacea*) of French Guiana. *Aquat Toxicol*. 88:267–276. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.05.004>

Guzman HM, Kaiser S, Hinsberg VJv (2019) Accumulation of trace elements in leatherback turtle (*Dermochelys coriacea*) eggs from the south-western Caribbean indicates potential health risks to consumers. *Chemosphere* [243](#):125424. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125424>

Haskins DL, Hamilton MT, Jones AL, Finger JWJ, Bringolf RB, Tuberville TD (2017) Accumulation of coal combustion residues and their immunological effects in the yellow-bellied slider (*Trachemys scripta scripta*). *Environ Pollut* 224:810-819. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2017.01.048>

- Henny CJ, Beal KF, Bury RB, Goggans R (2003) Organochlorine pesticides, PCBs, trace elements and metals in western pond turtle eggs from Oregon. *Northwest Sci* 77:46–53
- Hopkins WA, Roe JH, Snodgrass JW, Jackson BP, Kling DE, Rowe LC, Congdon JD (2001) Nondestructive indices of trace element exposure in squamate reptile. *Environ Pollut*. 115:1-7
- Iverson JB (1982) Biomass in turtle populations: a neglected subject. *Oecologia*. Berlin. 55:69-76. <https://doi.org/10.1007/BF00386720>
- Jakimska A, Konieczka P, Skora K, Namiesnik J (2011) Bioaccumulation of metals in tissues of 673 marine animals, Part II: Metal concentrations in animal tissues. *Pol. J. Environ. Stud*. 20(5):1117-1125
- Jha AN (2008) Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis*. 23:207–221 <http://dx.doi.org/10.1093/mutage/gen014>
- Keen CL, Taubeneck MW, Zidenberg-Cherr S, Daston GP, Rogers JM (1997) Toxicant exposure and trace element metabolism in pregnancy. *Environ Toxicol Pharmacol* 4:301–308. 10.1016/s1382-6689(97)10028-x
- Kolbe JJ, Janzen FJ (2002) Experimental analysis of an early life-history stage: water loss and migrating hatchling turtles. *Copeia* 1:22-226. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2006.01220.x>
- Luz VLF (2005) Criação comercial de tartaruga e tracajá – Manual técnico. Cuiabá: SEBRAE. pp 72
- Malvasio A, Souza AM, Molina FB, Sampaio FA (2003) Comportamento e preferência alimentar em *Podocnemis expansa* (Schweigger) *P. Unifilis* (Troschel) e *P. sextuberculata* (Cornalia) em cativeiro (Testudines, Pelomedusidae). *Rev Bras Zool* 20(1):161-168. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-81752003000100021>
- Martins AIP (2008) Redução da qualidade do ambiente com reflexos na disponibilidade e qualidade do alimento, redução dos abrigos e da Biodiversidade. Dissertação de Mestrado em Sustentabilidade em Ecossistemas. Universidade Federal do Maranhão
- Muñoz CC, Vermeiren P (2020) Maternal Transfer of Persistent Organic Pollutants to Sea Turtle Eggs: A Meta- Analysis Addressing Knowledge and Data Gaps Toward an Improved Synthesis of Research Outputs *Environ Toxicol Chem* 39(1) 9–29. <https://doi.org/10.1002/etc.4585>
- Nagle RD, Rowe CL, Congdon JD (2001) Accumulation and selective maternal transfer of contaminants in the turtle *Trachemys scripta* associated with coal ash deposition. *Arch Environ Contam Toxicol* 40:531–536. <https://doi.org/10.1007/s002440010206>

Ohlendorf HM, Harrison CS (1986) Mercury, selenium, cadmium and organochlorines in eggs of three Hawaiian seabird species. *Environ Pollut Series B* 11:169–191

Ohlendorf HM, Saiki MK, Aldrich TW (1986) Embryonic mortality and abnormalities of aquatic birds: apparent impacts of selenium from irrigation drainwater. *Sci Total Environ* 52:49–63

Pappas AC, Karadas F, Surai PF, Wood NAR, Cassey P, Bortolotti GR, Speake BK (2006) Interspecies variation in yolk selenium concentrations among eggs of free-living birds: the effect of phylogeny. *J Trace Elem Med Biol* 20:155-160. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtemb.2006.03.001>.

Packard MJ, Packard GC, Boardman TJ (1982) Structure of eggshells and water relations of reptilian eggs. *Herpetologica* 38:136–155

Park SY, Choi J (2007) Cytotoxicity, genotoxicity and ecotoxicity assay using human cell and environmental species for the screening of the risk from pollutant exposure. *Environ Int* 33:817–822 <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2007.03.014>

Pezzuti JCB, Lima JP, Silva DF, Begossi A (2010) Uses and taboos of turtles and tortoises along Rio Negro, Amazon Basin. *BioOne* 30-1:153-168

Perrault JR (2012) Assessment of mercury and selenium concentrations in tissues of stranded leatherback sea turtles (*Dermochelys coriacea*). *J Herpetol Med Surg* 22:76–85. <https://doi.org/10.5818/1529-9651-22.3.76>

Pritchard PCH (1979) *Encyclopedia of turtles*. Neptune NJ. TFH Publications Incorporated, Limited. 880p

Pritchard PCH, Trebbau P (1984) *The turtles of Venezuela. Contributions to Herpetology 2*. Society for the Study of Amphibians and Reptiles, Oxford, Ohio, pp. 33-73

Pusch PB (2007) Inventário de cargas de metais a partir de fontes difusas de poluição. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Campinas, SP. pp 118

Ramalho JFGP, Amaral S, Nelson MB, Velloso ACX (2000) Contaminação da microbacia de Caetés com metais pesados pelo uso de agroquímicos. *Pesq agropec bras* [online] 35-7:1289-1303 <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2000000700002>

- Roe JH, Hopkins WA, Baionno JA, Staub BP, Rowe CL, Jackson BP (2004) Maternal transfer of selenium in *Alligator mississippiensis* nesting downstream from a coal-burning power plant. *Environ Toxicol Chem.* 23:1969–1972
- Roe JH, Sill NS, Columbia MR, Paladino FV (2011) Trace Metals in Eggs and Hatchlings of Pacific Leatherback Turtles (*Dermochelys coriacea*) Nesting at Playa Grande, Costa Rica. *Chelonian Conserv Biol* 10:3–9
- Ross DAN, Guzman HM, Potvin C, van Hinsberg VJ (2017) A review of toxic metal contamination in marine turtle tissues and its implications for human health. *Reg Stud Mar Sci* 15:1-9
<http://dx.doi.org/10.1016/j.rsma.2017.06.003>
- Roze JA (1964) Pilgrim of the river. *Nat Hist* 73:35-41
- Sakai H, Ichihashi H, Suganuma H, Tatsukawa R (1995) Heavy-metal monitoring in sea-turtles using eggs. *Mar Pollut Bull* 30:347–353. [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(94\)00185-C](https://doi.org/10.1016/0025-326X(94)00185-C)
- Schneider L, Belger L, Burger J, Vogt RC (2009) Mercury bioaccumulation in four tissues of *Podocnemis erythrocephala* (Podocnemididae: Testudines) as a function of water parameters. *Sci Total Environ* 407:1048-1054. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.09.049>
- Schneider L, Belger L, Burger J, Vogt RC, Ferrara CR (2010) Mercury Levels in Muscle of Six Species of Turtles Eaten by People Along the Rio Negro of the Amazon Basin. *Arch Environ Contam Toxicol* 58:444–450. <http://dx.doi.org/10.1007/s00244-009-9358-z>
- Shugart LR (2000) DNA damage as a biomarker of exposure. *Ecotoxicology.* 9:329–340
<http://dx.doi.org/10.1023/A:1026513009527>
- Shugart LR 1990) Biological monitoring: testing for genotoxicity. In: McCarthy, J. F., Shugart LR (Eds.), *Biomarkers of Environmental Contamination*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, US. pp 205–216
- Shugart L, Theodorakis C (1998) New trends in biological monitoring: application of biomarkers to genetic ecotoxicology. *Biotherapy* 11:119–127. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1007911027243>
- Sílvia P, Duarte B, Castro N, Almeida PR, Caçador I, Costa JL (2015) The Lusitanian toadfish as bioindicator of estuarine sediment metal burden: The influence of gender and reproductive metabolism. *Ecol Indic* 48:370-379. <https://doi.org/10.1590/s0100-736x2017001000017>

- Souza NLN, Carneiro MTWD, Pimentel EF, Frossard A, Freire JB, Endringer DC, Ferreira PD (2018) Trace elements influence the hatching success and emergence of *Caretta caretta* and *Chelonia mydas*. J. Trace Elem. Med. Biol 50: 117–122. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2018.06.007>
- Sparling DW, Matson C, Bickham J, Doelling-Brown (2006) Toxicity of glyphosate as glypro® and L1700 to red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*) embryos and early hatchlings. Environ Toxicol Chem 25: 2768–2774. <https://doi.org/10.1897/05-152.1>
- Steyermark AC, Spotila JR (2001) Body temperature and maternal identity affect snapping turtle (*Chelydra serpentina*) righting response. Copeia 4:1050-1057. [https://doi.org/10.1643/0045-8511\(2001\)001\[1050:BTAMIA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1643/0045-8511(2001)001[1050:BTAMIA]2.0.CO;2)
- Storelli MM, Marcotrigiano GO (2003) Heavy metal residues in tissues of marine turtles. Mar Pollut Bull 46:4 397-400. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(02\)00230-8](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00230-8)
- Theodorakis CW, Swartz CD, Rogers WJ, Bickham JW, Donnelly KC, Adams SM (2000) Relationship between genotoxicity, mutagenicity, and fish community structure in a contaminated stream. J Aquat Ecosyst Stress Recover 7:131–143. <https://doi.org/10.1023/A:1009971330138>
- Tiller K.G. (1989) Heavy Metals in Soils and Their Environmental Significance. In: Stewart B.A. (eds) Advances in Soil Science. Advances in Soil Science, vol 9. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3532-3_2
- Tryfonas AE, Tucker JK, Brunkow PE, Hohnson KA, Hussein HS, Lin Z (2006) Metal accumulation in eggs of the red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*) in the Lower Illinois River. Chemosphere 63:39–48. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.07.080>
- Valdes SAC, Vieira LG, Ferreira CH, Mendonça JS, Ribeiro PRQ, Fernandes EA, Santos ALQ (2015) Effects of Exposure to Methyl Parathion on Egg Hatchability and Eggshell Chemical Composition in *Podocnemis expansa* (Testudines, Podocnemididae). Zool Sci 32:135–140. <https://doi.org/10.2108/zs140164>
- Vazquez GF, Reyes MC, Fernandez G, Aguayo JEC, Sharma VK (1997) Contamination in Marine Turtle (*Dermochelys coriaca*) Egg Shells of Playon de Mexiquillo, Michoacan, Mexico. Environ Contam Toxicol 58:326-333. <https://doi.org/10.1007/s001289900338>
- Vogt RC (2008) Amazon turtles. Gráfica Biblos, Lima, Peru. 104p.

Zapata LM, Bock BC, Orozco LY, Palacio JA (2016) Application of the micronucleus test and comet assay in *Trachemys callirostris* erythrocytes as a model for in situ genotoxic monitoring. *Ecotoxicol Environ Saf* 127:108–116. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.01.016>

Table 1 Metal quantification ($\mu\text{g/g}$) in the sediments of *Podocnemis expansa* nests collected in the beaches of Araguaia and Crixás-Açu Rivers, GO, Brazil.

Metals	Values	Araguaia (AR)	Crixás-Açu (CR)	P	CR/AR
Al	Median	4.345	15.190*	<0.001	3.50
	Min-Max	3.98-6.65	7.25-15.19		
Cd	Median	0.001	0.002*	<0.001	2.41
	Min-Max	0.0007-0.0012	0.001-0.002		
Cr	Median	0.029	0.085*	<0.001	2.95
	Min-Max	0.021-0.037	0.085-0.128		
Cu	Median	0.007	0.029	<0.001	4.35
	Min-Max	0.003-0.011	0.017-0.029		
Fe	Median	18.468	84.139*	<0.001	4.56
	Min-Max	13.06-24.61	45.26-84.14		
Mn	Median	0.213	2.498*	0.012	11.70
	Min-Max	0.13-0.28	0.92-2.498		
Pb	Median	0.028	0.042	0.181	1.52
	Min-Max	0.02-0.04	0.027-0.042		
Sn	Median	0.048	0.026	0.133	0.54
	Min-Max	0.03-0.09	0.024-0.026		
Zn	Median	0.044	0.883	0.048	20.22
	Min-Max	0.034-0.287	0.23-0.883		

Number of sampled nests: Araguaia River = 8 and Crixás-Açu River = 3.

Table 2 P-values from comparisons (Mann-Whitney's test) between the metal concentrations found in eggshells at laying time (ELT) vs egg contents (EC), and between eggshells of newly hatchlings (ENH) vs hatchlings (H) of *Podocnemis expansa* collected in the beaches of Araguaia and Crixás-Açu Rivers, GO, Brazil. Significant differences were considered when $p < 0.050$.

River	Comparison	Metals								
		Al	Cd	Cr	Cu	Fe	Mn	Pb	Sn	Zn
Araguaia	ELT vs EC	<0.001	<0.001	<0.001	0.010	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	ENH vs H	0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.168	<0.001
Crixás-Açu	ELT vs EC	<0.001	<0.001	0.116	0.003	0.112	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	ENH vs H	<0.001	<0.001	0.010	0.027	<0.001	<0.001	<0.001	0.025	<0.001

Table 3 Eigenvalues and correlation coefficients of principal component analysis (PCA) based on metal concentration values (Al, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb, Sn, and Zn,) for all tissue samples (kidney, liver and turtle shell) of *Podocnemis expansa* hatchlings nested on the beaches of the Araguaia River.

Correlation coefficients		
Variables	PC1	PC2
Al	0.3034304	0.75062366
Cd	-1.2770231	-0.41870867
Cr	0.8021218	-0.99051522
Cu	-1.1634550	-0.47719565
Fe	-1.3879037	-0.28640259
Mn	-1.5467668	-0.05815893
Pb	0.7508741	-0.69461659
Sn	-1.4836653	-0.30342385
Zn	-0.9162694	1.02503895
Eigenvalues	4.4723	1.4052
Explained variance (%)	49.69	15.61

Table 4 Eigenvalues and correlation coefficients of principal component analysis (PCA) based on metal quantity values (Al, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb, Sn, and Zn) for all tissue samples (kidney, liver and hull) of *Podocnemis expansa* hatchlings nested on the beaches of the Crixás-Açu River.

Correlation coefficients		
Variables	PC1	PC2
Al	0.06014599	0.95792495
Cd	1.14614134	-0.22852
Cr	-0.17318935	1.31492672
Cu	1.21861110	0.05563899
Fe	1.12272829	0.09824329
Mn	1.17159868	0.33839845
Pb	-0.22710497	1.16892584
Sn	1.30153408	-0.13637919
Zn	1.04496245	0.28868801
Eigenvalues	4.2104	2.1775
Explained variance (%)	46.78	24.19

Table 5 Line equation, R and p-values from correlation between the concentration of each metal in the hatchlings of *Podocnemis expansa* and their micronuclei frequency (‰), at each sampling site.

Araguaia River				Crixás Açu River		
Metals	R	p	Line Equation	R	p	Line Equation
Al	-0.020	0.930	$y = -0.1065x + 9.8256$	0.190	0.430	$y = 5.4141x + 11.92$
Cd	-0.180	0.400	$y = -3367.7x + 11.322$	-0.250	0.300	$y = -68785x + 38.866$
Cr	-0.078	0.720	$y = -79.67x + 11.085$	0.027	0.910	$y = 39.724x + 14.611$
Cu	0.120	0.570	$y = 3.8047x + 8.1066$	-0.086	0.720	$y = -16.568x + 16.486$
Fe	-0.025	0.910	$y = -0.956x + 9.7685$	-0.240	0.310	$y = -2.6409x + 22.354$
Mn	0.055	0.800	$y = 8.4622x + 9.0154$	-0.370	0.110	$y = -1.401x + 15.352$
Pb	0.330	0.120	$y = 229.27x + 7.5105$	0.065	0.790	$y = 50.047x + 14.916$
Sn	0.180	0.410	$y = 378.43x + 6.9362$	-0.130	0.580	$y = -834.51x + 20.302$
Zn	0.290	0.180	$y = 1.7169x + 6.612$	-0.039	0.870	$y = -0.6122x + 15.948$

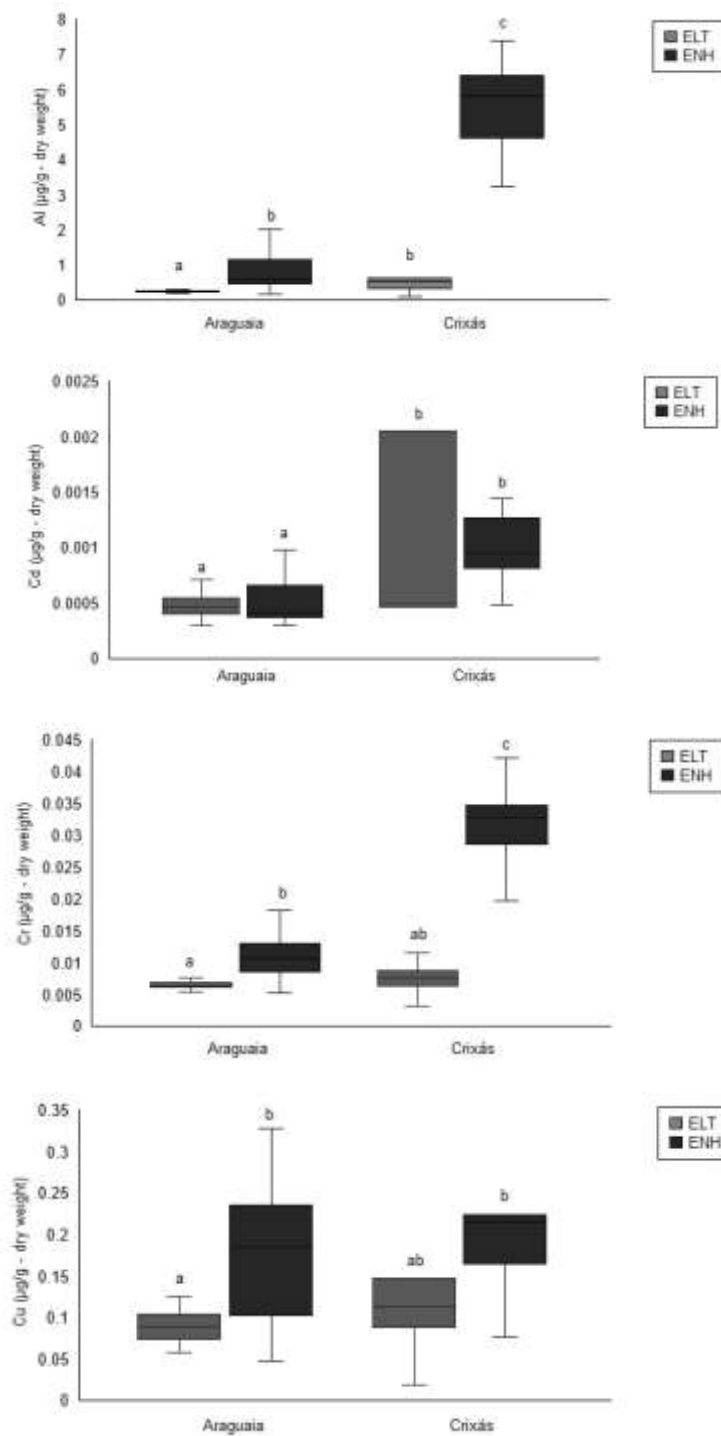
FIGURE CAPTIONS

Fig. 1 Metal quantification (Fe, Al, Zn, Mn, Sn, Cr, Pb, Cu and Cd) in *Podocnemis expansa* eggshell samples collected at egg laying time (ELT) and from the egg newly hatchlings (ENH), after approximately 60 days of incubation, in nests of Araguaia and Crixás-Açu Rivers. The box represents the interquartile amplitude containing 50 percent of the values. The external lines (vertical) stand for the highest and lowest values and the internal lines (horizontal) correspond to the median. Upper letter indicates significant differences ($p \leq 0.05$) between samples.

Fig. 2 Metal quantification (Fe, Al, Zn, Mn, Cr, Pb and Cu) in *Podocnemis expansa* egg contents samples (EC) collected directly from the female cloaca and the aggregate of hatchlings' tissues (H; sum of kidney, liver and hatch), after about 60 incubation days in the nests of Araguaia and Crixás-Açu Rivers. The boxplot represents the interquartile amplitude containing 50 percent of the values. The external lines (vertical) correspond to the highest and lowest values and the internal lines (horizontal) standing for to the median. Upper letter indicates significant differences ($p \leq 0.05$) between samples.

Fig. 3 Principal Components Analysis (PCA) of the assessed metal concentration (Fe, Zn, Al, Cu, Mn, Cr, Pb, Sn and Cd) in tissue samples (kidney, liver and shell) of *Podocnemis expansa* hatchlings nested on river beaches of the Araguaia (A) and the Crixás-Açu (B) Rivers. In the Graph A, Pb and Cr displayed greater influence over the clustering of kidney samples; Mn, Sn, Fe, Cd and Cu revealed greater influence over the grouping of liver samples and Al on shell samples. The metals that accumulated the most in the liver were Sn, Cd, Cu, Fe, Zn and Mn, as shown in Graph B.

FIGURE 1



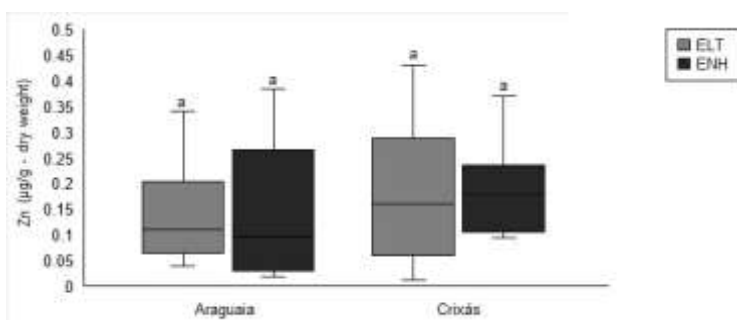
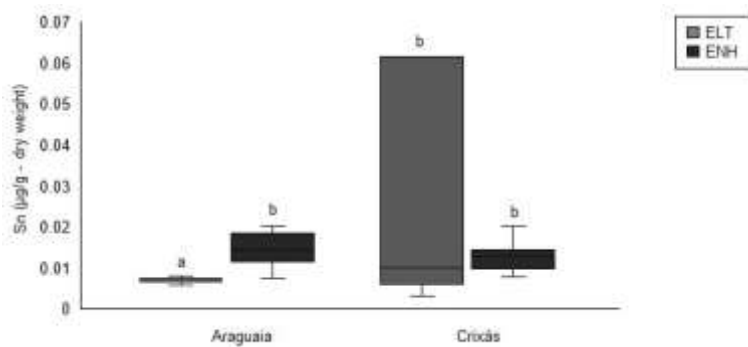
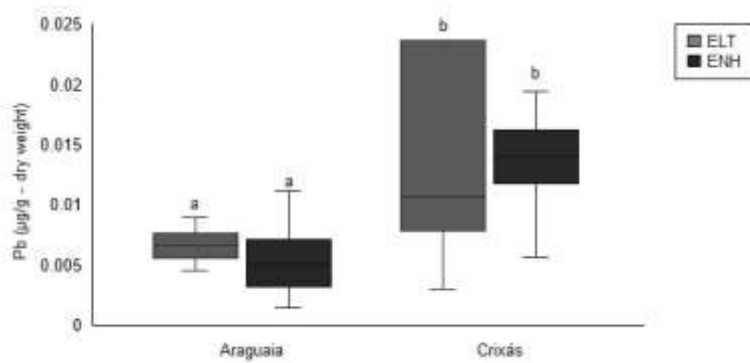
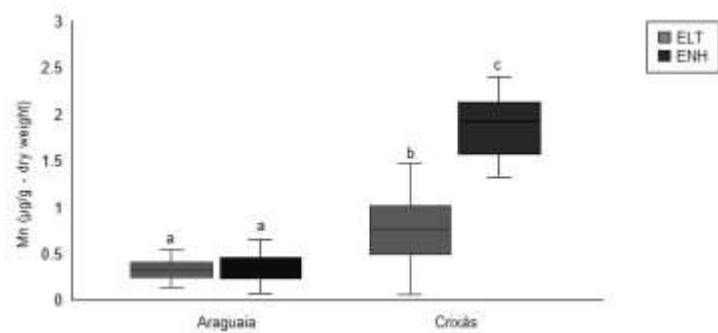
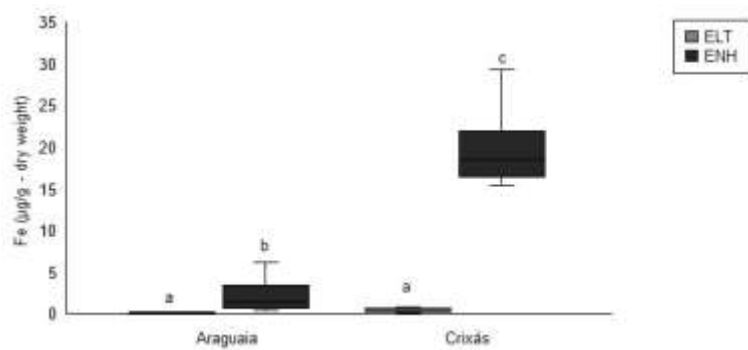
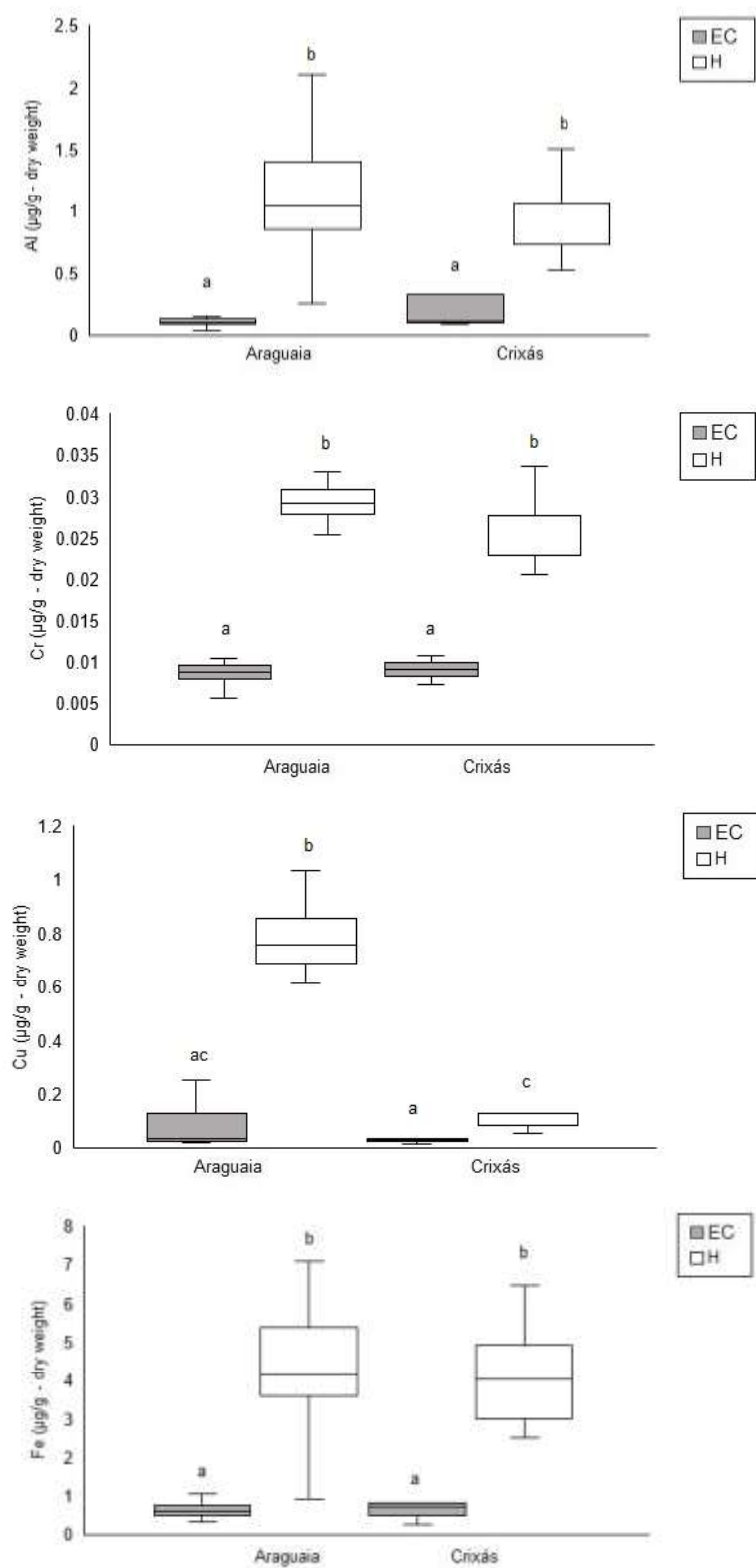


FIGURE 2



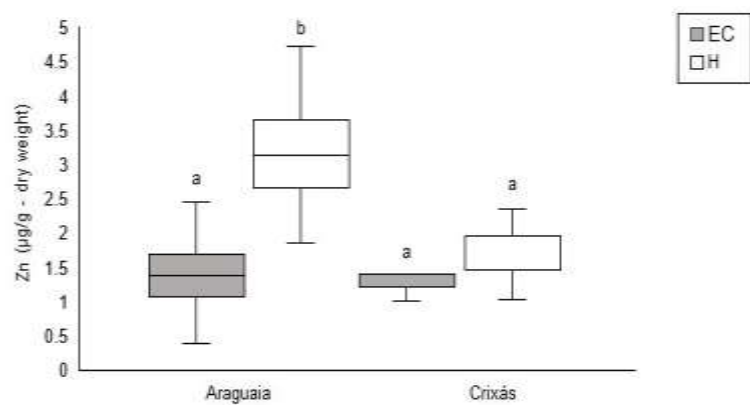
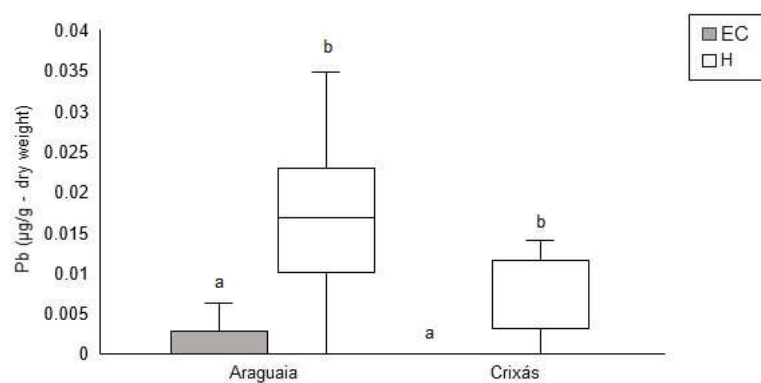
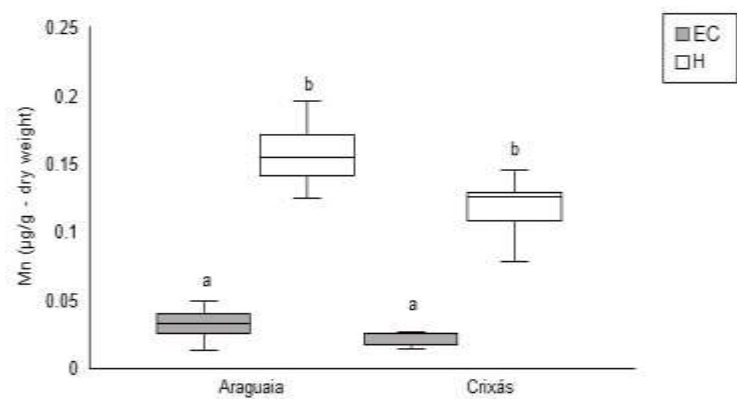
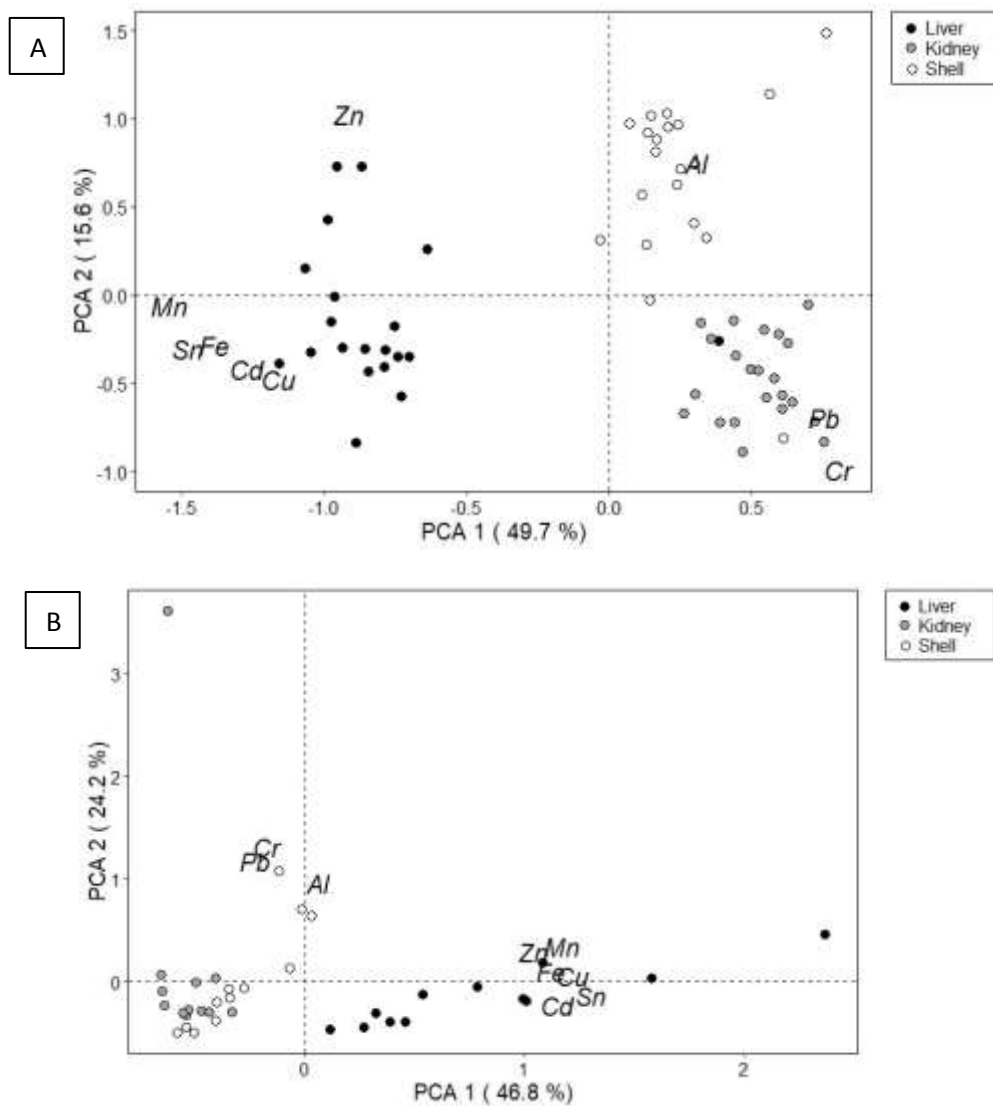


FIGURE 3



UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS

Formato da revista: Science of the Total Environment

CAPÍTULO 3:
BIOMONITORAMENTO COM OVOS E FILHOTES DE *Caretta*
***caretta* NA RESERVA BIOLÓGICA DE COMBOIOS, LINHARES–**
ES, BRASIL APÓS ROMPIMENTO DA BARRAGEM DE
MARIANA/MG

ALEXANDRA FROSSARD

VILA VELHA

JULHO/2020

Biomonitoramento com ovos e filhotes de *Caretta caretta* na Reserva Biológica de Comboios, Linhares– ES, Brasil após rompimento da barragem de rejeitos de Mariana/MG

Alexandra Frossard, Gabriel Carvalho Coppo, Adriana Regina Chippari Gomes

RESUMO

O rompimento de uma barragem de minério, em novembro de 2015 em Mariana, no estado de Minas Gerais, teve cerca de 39 milhões de metros cúbicos de lama de rejeitos liberados na bacia do rio Doce e adjacências, assim como nas águas costeiras do entorno da foz desse rio. O rejeito atingiu também importantes áreas de nidificação de tartarugas marinhas na foz do rio. Prevendo os impactos significativos nesses animais que usam essa área, foram coletados sedimento e amostras de ovos e filhotes das tartarugas da espécie *Caretta caretta* que fazem suas posturas nas praias protegidas da foz do rio Doce, na Reserva biológica de Comboios, Linhares – ES, em três temporadas reprodutivas (2016, 2017 e 2018). Todo esse material coletado foi usado como bioindicadores da avaliação dos impactos da lama de rejeitos proveniente do rompimento das barragens de Fundão e Santarém - Mariana/MG. Foram coletadas amostras de ovos diretamente da cloaca da fêmea, cascas e filhotes eclodidos nas praias da REBIO de Comboios, para quantificação de metais, danos genotóxicos e estresse oxidativo. A quantificação de metais em amostras de sedimento, filhotes, conteúdo dos ovos e cascas foi realizada por ICP-MS e ICP-OES para Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Sb, Sn e Zn. A análise do sedimento apresentou diferenças significativas antes e pós a chegada da lama de rejeitos, com diminuição da concentração dos metais ao longo dos três anos avaliados. Observou-se que houve transferência de metais da fêmea para os ovos, assim como do sedimento para os ovos. Já o sangue quando analisados os danos genotóxicos, observa-se que a frequência de micronúcleos quantificados foi significativamente menor nos animais coletados a cada temporada, com diminuição gradativa desses danos no passar dos anos, com uma média de 4,52 % de micronúcleos (em 2016) e foi reduzindo nas duas temporadas reprodutivas seguintes, 2,84 % e 1,47 % (2017 e 2018, respectivamente), contudo o fígado dos filhotes eclodidos foram analisados para o estresse oxidativo e não demonstraram diferenças significativas.

Palavras-chave: Bioacumulação, genotoxicidade, estresse oxidativo, metais, Testudines.

INTRODUÇÃO

Muitos dos ambientes aquáticos pelo mundo todo estão contaminados por diferentes substâncias, tais como metais, derivados de petróleo, agroquímicos, medicamentos, entre outras (Muñoz e Vermeiren 2020; Perrault et al., 2019; Gallen et al., 2019) fontes poluidoras: mineradoras, efluentes industriais e domésticos, agricultura, petroleiros, etc. O Brasil, não diferente de outros países, também tem seus corpos hídricos assim afetados.

O rompimento de uma barragem de uma mineradora em novembro de 2015 em Mariana, no estado de Minas Gerais, repercutiu pelo mundo. Nesse acidente cerca de 39 milhões de metros cúbicos de lama de rejeitos de minério atingiram as águas fluviais do rio Doce (Minas Gerais) e adjacências, assim como as águas costeiras do entorno da foz desse rio, já no estado do Espírito Santo (Hatje et al., 2017). Após o rompimento dessa barragem, registros instrumentais de qualidade de sedimentos no estuário do rio Doce mostraram que, mais de uma semana após a chegada da pluma contaminada nesse rio, as concentrações de alguns metais (por exemplo, Cu e Zn) eram 200 vezes mais altas do que antes (Queiroz et al., 2018). Colapsos repentinos de barragens de rejeitos como este que aconteceu podem transportar grandes quantidades de poluentes e de partículas de sedimentos por longas distâncias em pouco tempo, que depois se dispersam e se acumulam nas águas costeiras. Após estes tipos de acidentes, aumentos intermitentes da concentração total de poluentes podem ainda ocorrer por várias vezes, devido à remobilização de sedimentos após fortes tempestades ou ainda por ressuspensão causada pelo vento (Hatje et al., 2017), causando constantes prejuízos para a biota aquática.

Diante de situações como essas é que estudos de biomonitoramento devem ser ainda mais intensificados. Após o colapso dessa barragem em Mariana (MG-BR) muitos estudos estão sendo realizados abordando diferentes aspectos biológicos e não biológicos da área afetada. A bacia hidrográfica do rio Doce é adjacente à maior biodiversidade associada a recifes no Oceano Atlântico Sul (Francini-Filho et al., 2019), onde várias áreas marinhas protegidas foram estabelecidas (Magris et al., 2019). Portanto essa é uma área de alta importância para a conservação. Inclusive essa área costeira foi uma das mais afetadas pela lama de rejeitos (litoral de Regência e Povoação, norte do Espírito Santo), e é justamente nessa área, norte e sul da foz do Rio Doce que se encontram inseridas as principais áreas de nidificação dos testudines *Caretta caretta*

(Linnaeus, 1758) e *Dermochelys coriacea* (Vandelli, 1761). Em vista disso, essas tartarugas podem ser usadas como indicadores biológicos dessa área, já que esses organismos são capazes de armazenar quantidades de substâncias nocivas, como metais, do ambiente que vivem (Frossard et al., 2013).

Impactos na natureza como este causado pelo rompimento da barragem em Mariana (MG-BR) provocam danos na biota aquática, causando múltiplas alterações nos organismos (Gomes et al., 2017). O nível de severidade dessas alterações dependerá da toxicidade da substância e da estabilidade no ambiente em que se encontra (Vincente-Martorell et al., 2009). Em geral, quanto maior for a contaminação, e quanto maior for o tempo de exposição, maiores as chances de impactos negativos atingirem níveis superiores de organização biológica, como comunidades e ecossistemas (Zagatto e Bertoletti, 2006). Tradicionalmente, as técnicas para a avaliação destes impactos vêm sendo divididas em duas abordagens principais: aquelas associadas aos níveis superiores de organização, tais como populações, comunidades e ecossistemas; ou aquelas associadas em nível individual – que trata de alterações comportamentais, malformações, mudanças nas taxas de crescimento, reprodução, alimentação, alterações bioquímicas e fisiológicas (Lee e Steinert, 2003) e danos genotóxicos (Shugart 2000; Park e Choi 2007). Os estudos dessas respostas no nível individual (chamadas de biomarcadores) em diferentes níveis de organização biológica fornecem informações complementares, necessárias para a análise de risco ecológico (Shugart 2000; Park e Choi 2007; Theodorakis et al. 2000).

O uso de organismos como bioindicadores em estudos ecotoxicológicos possibilita avaliar como esses organismos respondem aos contaminantes, permitindo avaliar o quanto o ambiente está sendo alterado (Monroy et al. 2014a and b). Dentre os organismos usados como bioindicadores enquadram-se os peixes, as ostras, os ouriços-do-mar e as tartarugas, os quais acumulam metais por meio da alimentação, ou mesmo pelo uso do habitat (Ducan et al. 2017, Nicolau et al. 2017). Além de acumularem diversos contaminantes em seus tecidos, muitos desses organismos apresentam mudanças fisiológicas, bioquímicas e genotóxicas, tais como alterações na integridade da membrana celular, no transporte de íons, no metabolismo celular, em atividades enzimáticas (Lee e Steinert, 2003), assim como aumento na frequência de micronúcleos eritrocitários (Shugart 2000; Park e Choi 2007).

As tartarugas, de forma geral, são conhecidas como grupos-chave de animais que atuam como sentinelas de distúrbios ambientais, por causa de sua longa vida, hábitos alimentares, sua natureza migratória e seus longos períodos de residência em áreas de forrageamento (Keller, 2013; Novilo et al., 2017). Por serem espécies de vida longa, são susceptíveis à bioacumulação de metais e de outros contaminantes em seus tecidos no decorrer dos anos (Caurant et al., 1999, Finlayson et al., 2016). Portanto, podem refletir ameaças naturais e antropogênicas em uma porção mais ampla do ecossistema (Fossi et al., 2012; Nicolau et al., 2017). De acordo com o Grupo de Especialistas em Tartarugas Marinhas da União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN), as ameaças mais significativas às tartarugas marinhas incluem o desenvolvimento costeiro, o aquecimento global, os impactos das pescarias, os agentes patogênicos e a poluição (Mast et al., 2005).

Com base no que foi exposto, o objetivo do presente trabalho foi o biomonitoramento da praia da REBIO de Comboios/ES, afetada pela lama de rejeitos proveniente do rompimento das barragens de Mariana/MG, por meio da avaliação de bioacumulação de metais e possíveis alterações genotóxicas e bioquímicas em exemplares de ovos e filhotes da espécie *Caretta caretta* (tartaruga cabeçuda), em três temporadas reprodutivas (2015/2016, 2016/2017 e 2017/2018). As hipóteses do trabalho são de que: 1) há transferência de metais do sedimento dos ninhos de incubação da praia da REBIO de Comboios/ES para os ovos de *Caretta caretta*; 2) os filhotes dessa espécie nascidos dos ninhos da praia da REBIO de Comboios/ES apresentam bioacumulação de metais, assim como outras alterações (genotóxicas e bioquímicas) decorrentes da presença de metais no sedimento; 3) a bioacumulação nos filhotes diminui ao longo dos três anos de biomonitoramento devido ao decréscimo de metais no sedimento; 4) há transferência de metais das fêmeas para os ovos (cascas e conteúdo do ovo).

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido na Reserva Biológica de Comboios (REBIO) (19° 40' 19" S - 39° 52' 56" W) situada nos municípios de Aracruz e Linhares, no Estado do Espírito Santo (20° 29' e 20° 32' S - 29° 17' e 29° 21' W) localizada na foz sul do rio Doce, região atingida pela lama de rejeito após rompimento de uma barragem de uma mineradora em novembro de 2015 em Mariana, no estado de Minas Gerais. A REBIO possui 37 km de praia e é utilizada como área de desova para *C. caretta* (Baptistotte et al., 2003). Dados

referentes ao número de ninhos, localização, data da desova, duração de incubação, data e sucesso de eclosão foram coletados em conjunto com técnicos da Fundação Centro Brasileiro de Proteção e Pesquisa das Tartarugas Marinhas (TAMAR) junto ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), nas temporadas reprodutivas de 2015 a 2018.

Aquisição dos exemplares

As temporadas de desova e de eclosão da espécie *Caretta caretta* (Linnaeus, 1758) ocorrem de setembro a maio em Comboios, período o qual foram realizadas as coletas das amostras (tabela 1). Foram utilizadas 30 unidades de indivíduos: 30 ovos coletados no momento da postura, 30 cascas dos ovos após eclosão e 30 filhotes eclodidos, por temporada, obtidos por busca ativa nas praias da REBIO de Comboios. As 30 amostras foram coletadas em 10 ninhos diferentes, sendo que de cada um coletou-se 3 amostras de cada. As coletas de amostras biológicas e de sedimento se repetiram por três temporadas consecutivas, nos anos de 2016, 2017 e 2018. No entanto uma coleta de apenas sedimento foi realizada antes da chegada da lama ano de 2015 (novembro). O presente estudo foi autorizado pelo Ministério do Meio Ambiente - MMA, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio, Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO Number: 53977-1 e pelo Comitê de Ética e Uso Animal - CEUA – UVV - #367-2016.

As tartarugas fêmeas foram avistadas subindo a praia em direção ao seu ninho no momento da postura, três ovos foram coletados diretamente da cloaca da fêmea, antes mesmo de encostarem no sedimento da praia. Posteriormente ao tempo de eclosão, esses mesmos ninhos que foram abordados no momento da postura, e acompanhados durante todo o tempo de incubação foram abertos para a checagem do sucesso de eclosão, e em seguida foram coletadas as cascas dos ovos de filhotes eclodidos para a realização das determinações de metais. Os filhotes que eclodiram tiveram seus tecidos coletados na Base da REBIO para realização das análises: biometria, testes de genotoxicidade em eritrócitos, análises bioquímicas em tecidos e quantificação de metal. Esta última análise também foi realizada nos ovos no momento da postura (cascas e conteúdo do ovo), nas cascas dos ovos dos filhotes eclodidos e no sedimento de cada ninho.

Tabela 1. Período de coleta das amostras biológicas de *Caretta caretta* e de sedimento na região da Reserva Biológica de Comboios (REBIO), ES, Brasil.

Amostra	Data
Temporada de 2015 – antes da lama	
Sedimento	novembro
Temporada de 2016/2017 – após chegada da lama	
Ovos na postura	janeiro e fevereiro
Cascas e filhotes	maio
Sedimento	maio
Temporada de 2017/2018 – após chegada da lama	
Ovos na postura	novembro e dezembro/2016
Cascas e filhotes	janeiro e fevereiro/2017
Sedimento	janeiro e fevereiro/2017
Temporada de 2017/2018 – após chegada da lama	
Ovos na postura	novembro, dezembro /2017 e janeiro/2018
Cascas e filhotes	janeiro, fevereiro e março/2018
Sedimento	Janeiro, fevereiro e março/2018

Biometria

Todas as fêmeas, no momento da postura quando seus ninhos foram identificados e os ovos coletados, foram medidas usando uma fita métrica: comprimento curvilíneo da carapaça (CCC) e largura curvilínea da carapaça (LCC). Tão logo que os filhotes recém-eclodidos chegaram na Base da REBIO tiveram o CCC e LCC medidos. Esses filhotes também foram pesados em uma balança analítica.

Coleta de sangue e tecidos

Os filhotes recém-eclodidos foram contidos fisicamente e em seguida foi realizada a coleta de sangue por punção occipital, por meio de seringa de 1,0mL e agulha 25x7 heparinizada. O sangue coletado foi utilizado no Teste do Micronúcleo (teste genotóxico). Após a coleta do sangue, os animais foram eutanasiados com injeção de lidocaína 3 %, via intratecal. Em seguida o rim, o fígado e amostra do músculo esquelético foram dissecados para realização das análises de níveis de bioacumulação de metais. O tecido hepático também usado nas análises bioquímicas foram congeladas em nitrogênio líquido até o momento das análises.

Análise genotóxica - Teste do micronúcleo

O sangue de cada animal foi coletado e gotejado sobre duas lâminas para a realização de extensões sanguíneas. Após secas em temperatura ambiente por um período de 24 h, as lâminas foram submetidas a um banho de 30 minutos em Metanol P. A. (100 %) para fixação das células eritrocitárias. Em seguida foram coradas com uma solução de Giemsa 5 % por 40 minutos; lavadas posteriormente com água destilada e secas em temperatura ambiente por 24 h, como descrito por Grisolia et al. (2009). Depois de seco, o material foi observado em microscópio de luz em resolução de 400x. Mil células sanguíneas (eritrócitos) de cada lâmina foram contabilizadas em cada lâmina para a quantificação dos micronúcleos. Os valores de micronúcleos obtidos no presente trabalho corresponderam a uma média realizada a partir da contagem de duas lâminas por filhote recém-eclodido. Os micronúcleos (MNs) foram identificados seguindo o critério proposto por Fenech et al. (2000).

Análises bioquímicas

As amostras de tecido hepático dos animais foram descongeladas e homogeneizadas com tampão fosfato (pH 7,0) e centrifugados (30.000 G – marca Eppendorf) por 30 min a 4 °C, obtendo o sobrenadante utilizado para a análise de glutathione S-transferase (GST) e catalase (CAT). A atividade enzimática da GST foi determinada utilizando o método descrito por Habig et al. (1974); Habig e Jakoby (1981) utilizando tampão fosfato (pH 7,0) 0,1 M, GSH 100 mM e 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 100 mM como substrato. A atividade cinética da GST foi calculada a partir da leitura da absorbância em comprimento de onda de 340 nm, em um leitor de microplacas (Molecular Device). A atividade absoluta foi estimada usando o coeficiente de extinção do CDBN. A atividade enzimática da CAT foi determinada utilizando o método descrito por Aebi (1984), utilizando o tampão TE (TRIS – EDTA) (pH 8,0). A atividade cinética da CAT foi calculada a partir da leitura da absorbância em comprimento de onda de 240 nm, em um espectrofotômetro BioSpectro. A atividade da CAT foi estimada por meio da avaliação contínua do decréscimo da concentração do peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

Quantificação de metais

Foi realizada a quantificação dos seguintes metais: Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Sb, Sn, Zn. Para tal, as cascas dos ovos foram trituradas, a gema junto ao albumem de cada ovo foi homogeneizada, separadamente da casca, e os tecidos dos filhotes foram separados e preparados para a determinação dos metais. O procedimento de decomposição ácida foi conduzido utilizando entre 0,05 e 0,5 g de amostra, variando conforme a massa disponível. Em seguida, foram adicionados 9 mL de HNO₃ concentrado e 3 mL de HCl concentrado. A decomposição foi assistida por radiação micro-ondas (Marconi Mod. MA 851) a 250 °C por, aproximadamente, uma hora até a solução ficar translúcida. Após a decomposição, as amostras foram transferidas para balão volumétrico de 15 mL, tendo o volume ajustado com água ultrapura tipo 1 (18.2 MΩ).

Para a determinação dos elementos foi utilizado o Espectrômetro de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS) iCAP RQ (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha), juntamente com amostrador automático Cetac Autosampler ASX-560 (Thermo Fisher Scientific, Alemanha) e o Espectrômetro de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES) iCAP 6000 series com amostrador automático Cetac Autosampler ASX-520 (Thermo Fisher Scientific, Alemanha). Inicialmente, as amostras foram analisadas por ICP-MS, entretanto, foram observadas amostras com valores elevados de Al, Fe, Mn e Zn, para sedimento. Logo, foi conduzida a análise dessas amostras por ICP OES. Em seguida, foi avaliada a correlação dos valores encontrados por ICP-MS e ICP OES.

Para todas as amostras e demais soluções foi utilizada água ASTM tipo I (com resistividade de 18,2 MΩ.cm a 25 °C), em sistema Sartorius® (Sartorius, Darmstadt, Alemanha). Foram utilizados ácido nítrico (HNO₃) 65 % (m.m⁻¹) sub-destilado em DistillAcid® (Berghof Instruments, Alemanha) e ácido clorídrico (HCl) 37 % sub-destilado para preparo da curva analítica, padrão interno e solução rinse. Os padrões para construir a curva analítica dos elementos foram preparados em concentrações de HNO₃ 20 % (v.v-1) a partir de diluições adequadas de soluções estoque de 1000 mg.L⁻¹ Absolute Standards Inc (Hamden, Connecticut, EUA), todos rastreáveis.

Materiais de referência certificados para sedimento e para peixe (Tabela 2 e 3, respectivamente). O material de referência de sedimento utilizado foi o BCR-667

(Institute for Reference Material and Measurements[®]), e de músculo de peixe foi o ERM – BB422 (European Reference Materials[®]), para metais. As amostras destes materiais de referência certificados foram tratadas e analisadas da mesma forma que as amostras do material biológico e não biológico coletado e avaliado no presente estudo, conforme descrito anteriormente.

Tabela 2. Percentuais de recuperação dos metais presentes nos materiais de referência certificado de sedimento (BCR-667), limites de quantificação praticável e detecção (mg/kg de peso úmido), e limite de quantificação (LQ) dos metais. (LQ determinados por ICP-MS)

Metal	Valores indicativos (mg/kg⁻¹)	Valores encontrados (mg/kg⁻¹)	Recuperação (%)	LQ (µg.L⁻¹)
Ag	-		-	3,75
As	14,3 - 19,9	19,7	72,6	3,75
Cd	0,67 ± 0,11	0,60	111,7	3,75
Co	23,0 ± 1,3	20,6	111,7	3,75
Cr	0,178 ± 0,016	0,179	99,4	0,0075
Cu	60,0 ± 9,0	67,0	89,6	0,0375
Fe	44,8 ± 1,0	34,6	129,5	0,375
Hg	-	1,5	-	3,75
Mn	0,92 ± 0,04	0,73	126,0	0,0075
Ni	0,128 ± 0,009	0,113	113,3	7,5
Sb	0,096±	1,00	96,0	3,75
Sn	-	19,4	-	3,75
Zn	0,175 ± 0,013	0,179	97,8	0,075

Tabela 3. Percentuais de recuperação dos metais presentes nos materiais de referência certificado de músculo de peixe (ERM-BB422), limites de quantificação praticável e detecção (mg/kg de peso úmido), e limites de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) dos metais determinados por ICP-MS.

Metal	Valores indicativos (mg/kg)	Valores encontrados (mg/kg)	Recuperação (%)	LQ ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
Ag	-	<LD	-	3,75
As	12,7 $\pm$ 0,7	13,22	96,1	3,75
Cd	-	0,0086	87,2	3,75
Co	-	15,8	-	3,75
Cr	-	0,26	-	0,0075
Cu	1,76 $\pm$ 0,16	1,748	95,5	0,0375
Fe	9,4 $\pm$ 1,4	12,34	76,2	0,375
Hg	0,601 $\pm$ 0,030	0,708	84,9	3,75
Mn	0,368 $\pm$ 0,028	0,400	92,0	0,0075
Ni	-	1,6	-	7,5
Sb	-	14,8	-	3,75
Sn	-	9,2	-	3,75
Zn	16,1 $\pm$ 1,1	18,85	84,9	0,075

Análise Estatística

As concentrações de metal encontradas no sedimento foram comparadas em função da temporada de desova, por meio de permutação par a par. Para estes dados também foi realizada análise de componentes principais (PCA) em conjunto com a função “ordihull” do pacote “vegan”.

Os dados de concentração de todos os metais também foram comparados por meio de permutação par a par para: (1) cascas dos ovos no momento da postura (ELP), cascas dos filhotes recém eclodidos (ENH), gema dos ovos (EC) e a somatória das amostras de tecidos dos filhotes recém eclodidos, em função do compartimento biológico analisado; e (2) fígado, casco e rim, em função do tecido analisado. O mesmo teste estatístico foi utilizado para comparar a frequência de micronúcleos nos eritrócitos e a atividade das enzimas GST e CAT, em função da temporada de desova. Foram consideradas

diferenças significativas quando $p < 0,050$. Todas os testes e análises estatísticas foram realizados no software R 4.0.2 (R Core Team, 2020).

Foi realizada também uma análise de componentes principais (PCA), ordenando as unidades amostrais em cada tecido avaliado em relação aos descritores utilizados (concentração dos metais). Esta análise multivariada foi realizada utilizando o software R 3.3.2.. Antes dessa análise, todos os dados foram padronizados. A padronização tende a aumentar a influência de variáveis cuja variação é pequena e reduzir a influência de variáveis cuja variação é grande.

RESULTADOS

3.1 Biometria

As fêmeas adultas de tartaruga cabeçuda *C. caretta* de cada ninho experimental tinham $0,96 \pm 0,07$ m de comprimento curvilíneo da carapaça (CCC) e $0,88 \pm 0,05$ m de largura curvilínea da carapaça (LCC), sem diferenças significativas entre a biometria delas ao longo das temporadas, indicando que possuíam idades próximas umas das outras. Os filhotes coletados pesavam $19,8 \pm 2,5$ g, com $4,8 \pm 0,3$ cm de LCC e $4,6 \pm 0,3$ cm de CCC (tabela 4). Diferenças significativas foram observadas no tamanho desses filhotes, a partir do segundo ano de coleta, quando comparados ao ano em que os ninhos foram incubados durante a chegada da lama de rejeitos na praia da REBIO de Comboios (2015/2016). Eles passaram a eclodir maiores tanto em largura quanto em comprimento, mas não em peso.

Tabela 4. Média da biometria dos filhotes da tartaruga cabeçuda *Caretta caretta*, largura curvilínea da carapaça (LCC), comprimento curvilíneo da carapaça (CCC) e peso no momento da postura.

Medidas dos Filhotes	Temporadas			P
	2015/2016	2016/2017	2017/2018	
LCC	4,3 ^b	4,5 ^c	4,8 ^a	<0,001
CCC	4,7 ^a	4,9 ^b	4,8 ^{ab}	0,007
PESO	19,0 ^a	20,5 ^a	19,8 ^a	0,098

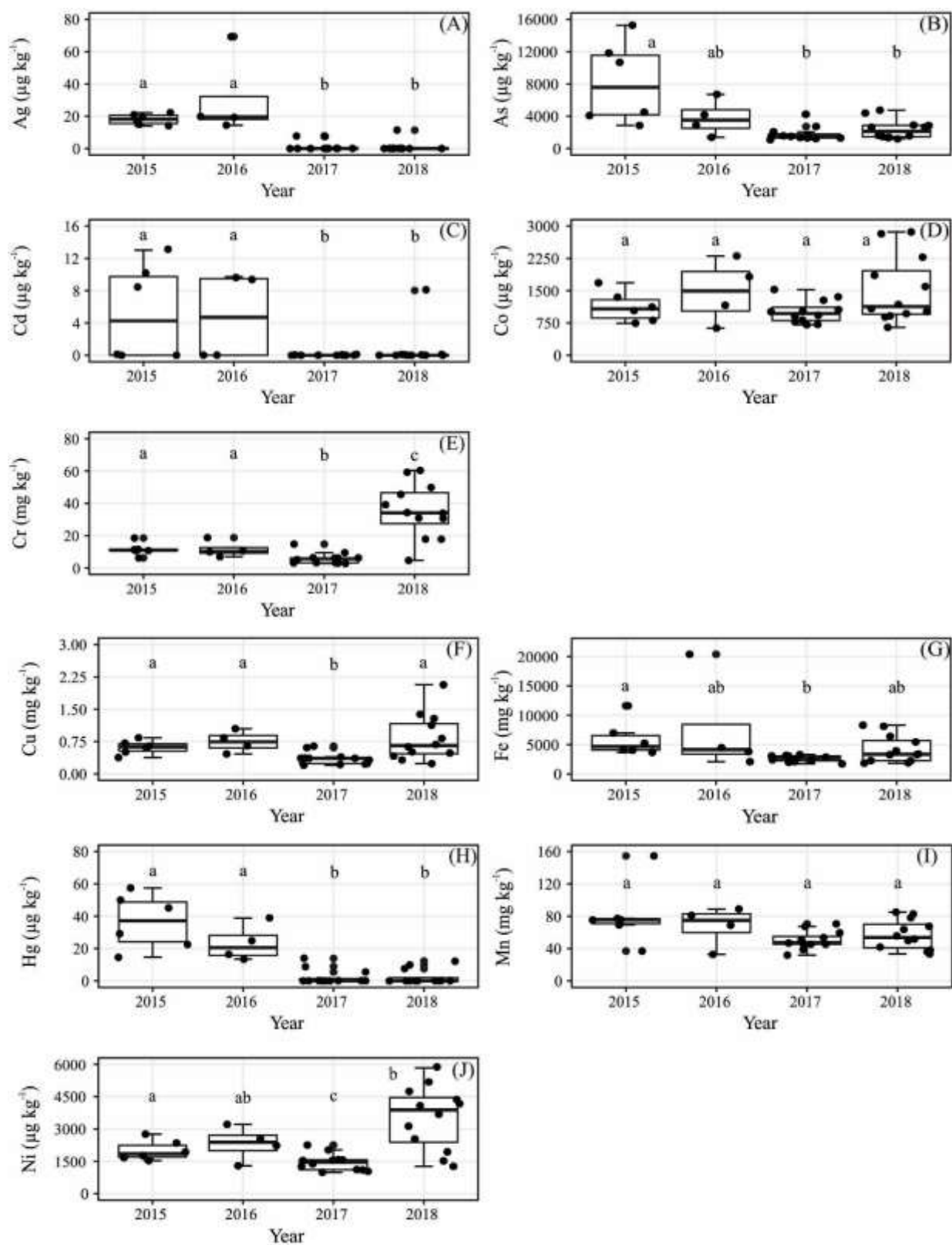
3.2 Quantificação de metais

3.2.1 Quantificação dos metais no sedimento

Observa-se na figura 1 que em 2015, antes da chegada da lama de rejeitos no sedimento da área de postura das tartarugas, já havia a presença dos 13 metais analisados no presente trabalho (Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Sb, Sn e Zn). Os metais Fe, Al, Mn, Cr, Zn, Ba, Cu, Se, Pb e Sn quantificados estão abaixo dos limites do CONAMA 420: Ag ($2 \mu\text{g.kg}^{-1}$), As ($15 \mu\text{g.kg}^{-1}$), Cd ($1,3 \mu\text{g.kg}^{-1}$), Co ($25 \mu\text{g.kg}^{-1}$), Cr (75mg.kg^{-1}), Cu (60mg.kg^{-1}), Fe (--), Hg ($0,5 \mu\text{g.kg}^{-1}$), Mn (--), Ni ($30 \mu\text{g.kg}^{-1}$), Sb ($2 \mu\text{g.kg}^{-1}$), Sn (--), Zn (300mg.kg^{-1}).

Nos anos seguintes, observa-se que em 2016, todos os metais tiveram suas concentrações similares a do ano de 2015. A partir do ano de 2017 a maioria dos metais apresentaram diminuição significativa de seus valores, com exceção do Co e do Mn que tiveram suas concentrações similares a de 2015. No ano de 2018, as concentrações dos metais: Ag, As, Cd e Hg mantiveram-se similares a de 2017; Cr e Ni apresentaram aumento significativo em relação aos demais anos; Cu foi similar aos anos de 2015 e 2016; Fe e Sn não diferiram significativamente dos demais anos; o Zn embora tenha aumentado no ano de 2018 em relação ao ano de 2017, ainda se mantiveram menores do que nos anos de 2015 e 2016; e o Mn e Co tiveram suas concentrações constantes ao longo dos 4 anos de coleta de sedimento.

Os cinco metais mais presentes no sedimento quantificados no presente estudo em todo o período de biomonitoramento foram: $\text{Fe} > \text{Mn} > \text{Cr} > \text{Zn} > \text{Cu}$. Sendo metais essenciais o Fe, Zn e Cu e os não essenciais Mn e Cr,.



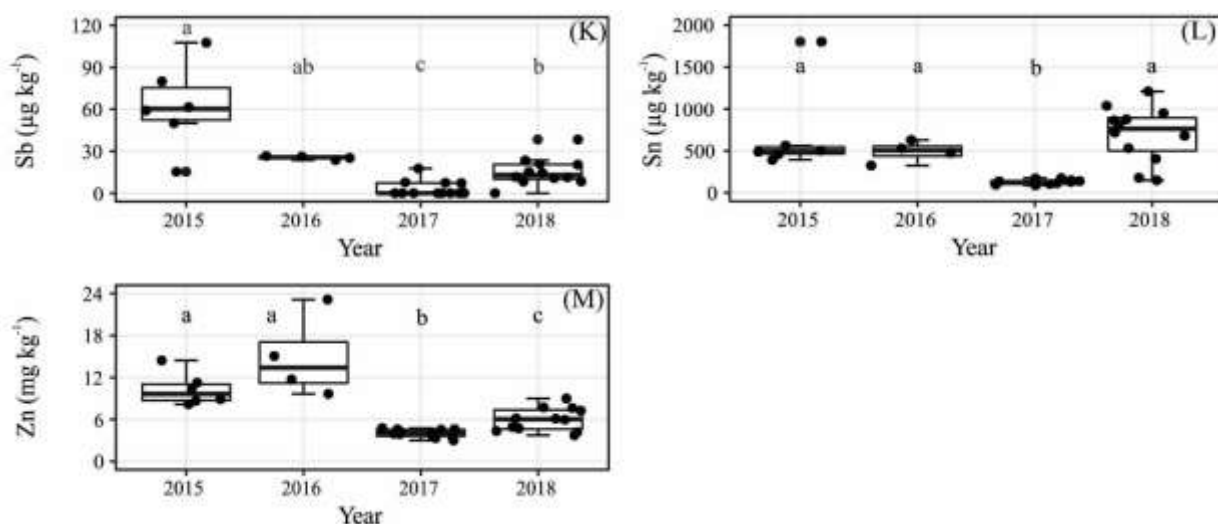


Figura 1. Boxplot das concentrações dos metais (Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Sb, Sn, Zn) em amostras de sedimento dos ninhos de *Caretta caretta* coletados em um trajeto de 20 km da REBIO de Comboios, ES, Brasil.

As quantidades de metais no sedimento de incubação dos ovos das tartarugas *C. caretta* na REBIO de Comboios também foram avaliadas por uma PCA apresentadas na figura 2. Essa figura mostra que dentre todas as temporadas reprodutivas em que os sedimentos dos ninhos foram analisados, os anos de 2015 e de 2016 assemelham-se na quantidade e no tipo de metal, assim como os anos 2017 e 2018 assemelham-se entre si. Apenas os metais Cr e Ni se distanciam dos demais metais no ano de 2018, visto que ambos aumentaram significativamente em relação a todos os demais anos (como visto na figura 1).

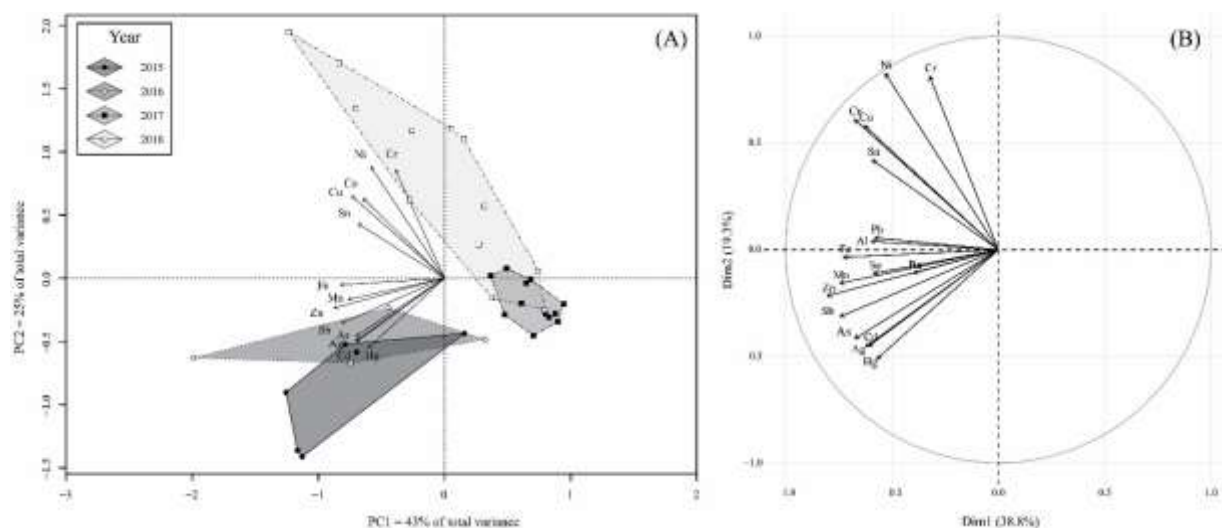


Figura 2. Análise de componentes principais de metais (Ag, As, Cd, Co, Cu, Cr, Fe, Hg, Mn, Ni, Sb, Sn e Zn) em amostras de sedimento do fundo dos ninhos das fêmeas de tartarugas *Caretta caretta* que nidificaram nas praias da REBIO de Comboios, foz sul do Rio Doce, ES, Brasil. As amostras de sedimento das temporadas de 2015 e 2016 apresentam similaridades em relação aos metais presentes; enquanto as amostras de 2017 e 2018 assemelham-se entre si.

Os resultados da PCA para o sedimento dos ninhos explicam que em conjunto, os dois primeiros eixos explicam 68% da variação total da concentração dos metais nos sedimentos avaliados para os ninhos da *C. caretta*. O primeiro eixo representa 43% da variância total dos dados, com scores negativos atribuídos a todos os metais (figura 2A). Duas PCAS foram realizadas uma com todas as variáveis (2B) e outra só com as variáveis mais explicativas (2A). Com a retirada dessas variáveis pouco explicativas obtivemos um ganho de 4% a mais de explicação no eixo 1 e 6% no eixo 2. Nosso modelo melhorou 10% removendo 4 variáveis (Al, Ba, Pb e Se).

3.2.2 Quantificação dos metais nos ovos coletados diretamente da cloaca das fêmeas no momento da postura comparados com os filhotes (soma dos tecidos: casco, rim, fígado)

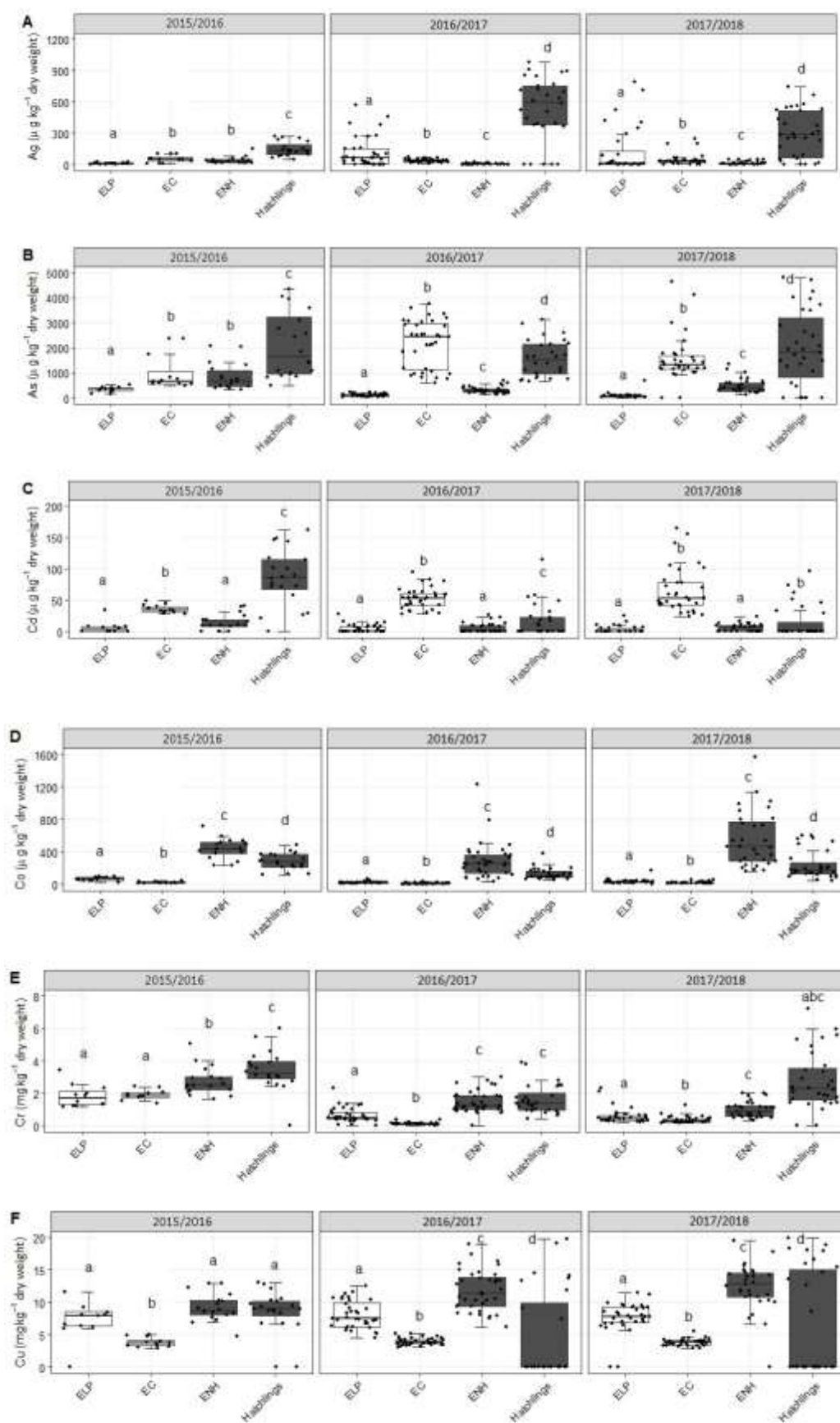
Para cada um dos 13 elementos metálicos que foram quantificados nas amostras biológicas (Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Sb, Sn e Zn) observa-se que houve transferência materna das fêmeas de *C. caretta* para seus ovos (casca (ELP) e conteúdo do ovo (EC)), visto que todos eles foram quantificados nas três temporadas de desova (figura 3). Ao longo das três temporadas reprodutivas analisadas, observa-se que a casca do ovo no momento da postura (ELP) possui uma quantidade maior de As, Cd, Fe, Hg, Mn e Zn do que o conteúdo do ovo (EC), os demais metais (Co, Cr, Ni e Sn) variaram em suas proporções nesses dois compartimentos, ao longo das 3 temporadas. O Sb apresentou quantidades similares na casca e no conteúdo do ovo em todos os momentos.

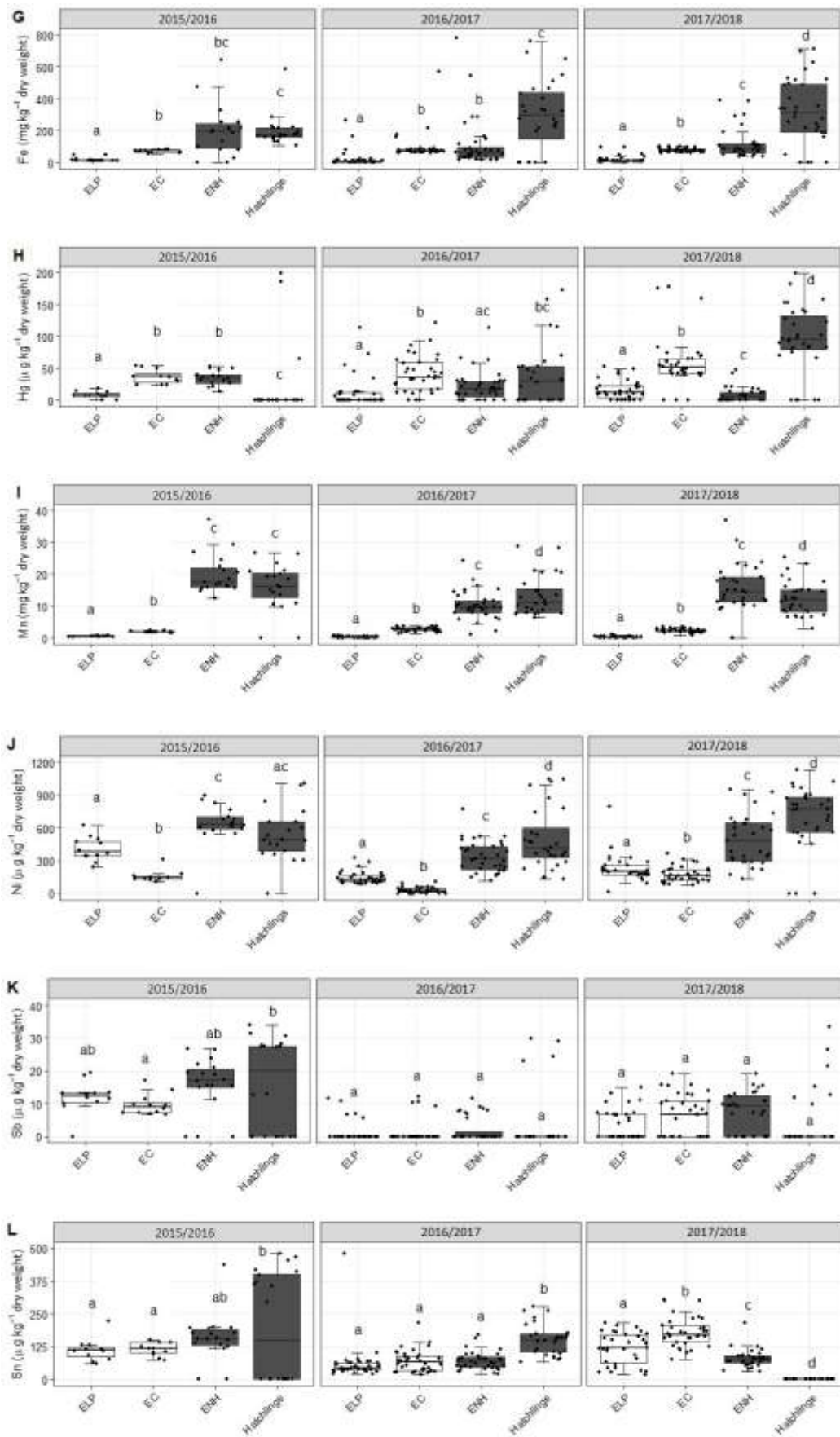
Em relação à distribuição de metais após incubação, observa-se que para alguns desses elementos (As, Ag, Cd e Zn) houve acúmulo maior nos filhotes recém-eclodidos (H – somatória dos tecidos) do que na casca do ovo (ENH), após o contato direto com o sedimento do ninho. O Sb mais uma vez permaneceu com as mesmas proporções entre esses dois compartimentos, ao longo das 3 temporadas reprodutivas. Observa-se ainda

que a casca do ovo reteve uma proporção maior de Co, e dessa forma o filhote (H) acumulou uma quantidade menor. Os demais metais (Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni e Sn) variaram em suas proporções e ao longo das 3 temporadas.

Observa-se ainda nessa figura 3 que Mn, principalmente, As, Fe, Co, Cr e Ni apresentaram um acúmulo significativamente maior nas amostras biológicas (ENH e H) após o período de incubação em comparação com as amostras coletadas diretamente da cloaca da fêmea (ELP e EC). Essa situação é reforçada ao observarmos a comparação entre ELP e ENH. As amostras de cascas de ovos após período de incubação possui uma quantidade significativamente maior desses metais em relação às cascas dos ovos coletados no momento da postura (ELP). A mesma situação ocorre para a maioria dos metais (Ag, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Sb e Zn), em todas as temporadas, quando comparamos o conteúdo do ovo (EC) com os filhotes recém-eclodidos (H). Em alguns metais, observa-se que no conteúdo do ovo há uma quantidade maior (As, Cd, Cr, Hg e Sb), em algumas das temporadas, do que em relação ao filhote, porém não necessariamente isso ocorreu, pois analisamos apenas três tecidos dos filhotes. Esses metais podem estar acumulados em outros órgãos do filhote. De uma forma geral, esses resultados indicam que há transferência de metais do sedimento para os ovos durante o processo de incubação.

Os cinco metais mais presentes nas amostras biológicas (ELP, EC, ENH e H) quantificados no presente estudo em todo o período de biomonitoramento foram: $Fe > Zn > Mn > Cu > Cr$. Sendo metais essenciais o Fe, Zn e Cu e os não essenciais Mn e Cr. Esses metais foram os mesmos cinco mais frequentes nas amostras de sedimento, porém dispostos em ordens diferentes. Excetuando-se pelo Fe, o qual foi quantificado em maiores proporções tanto no sedimento quanto nas amostras biológicas.





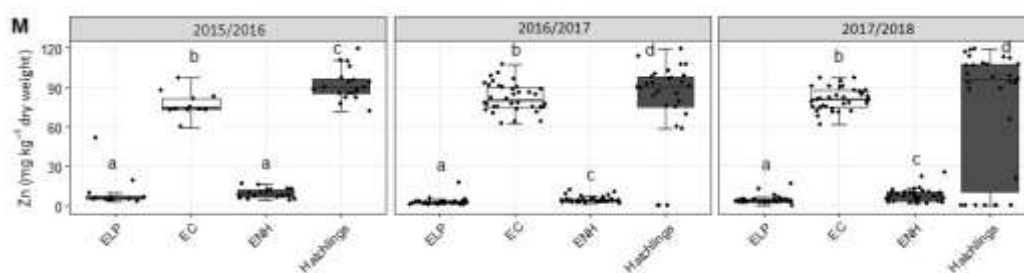
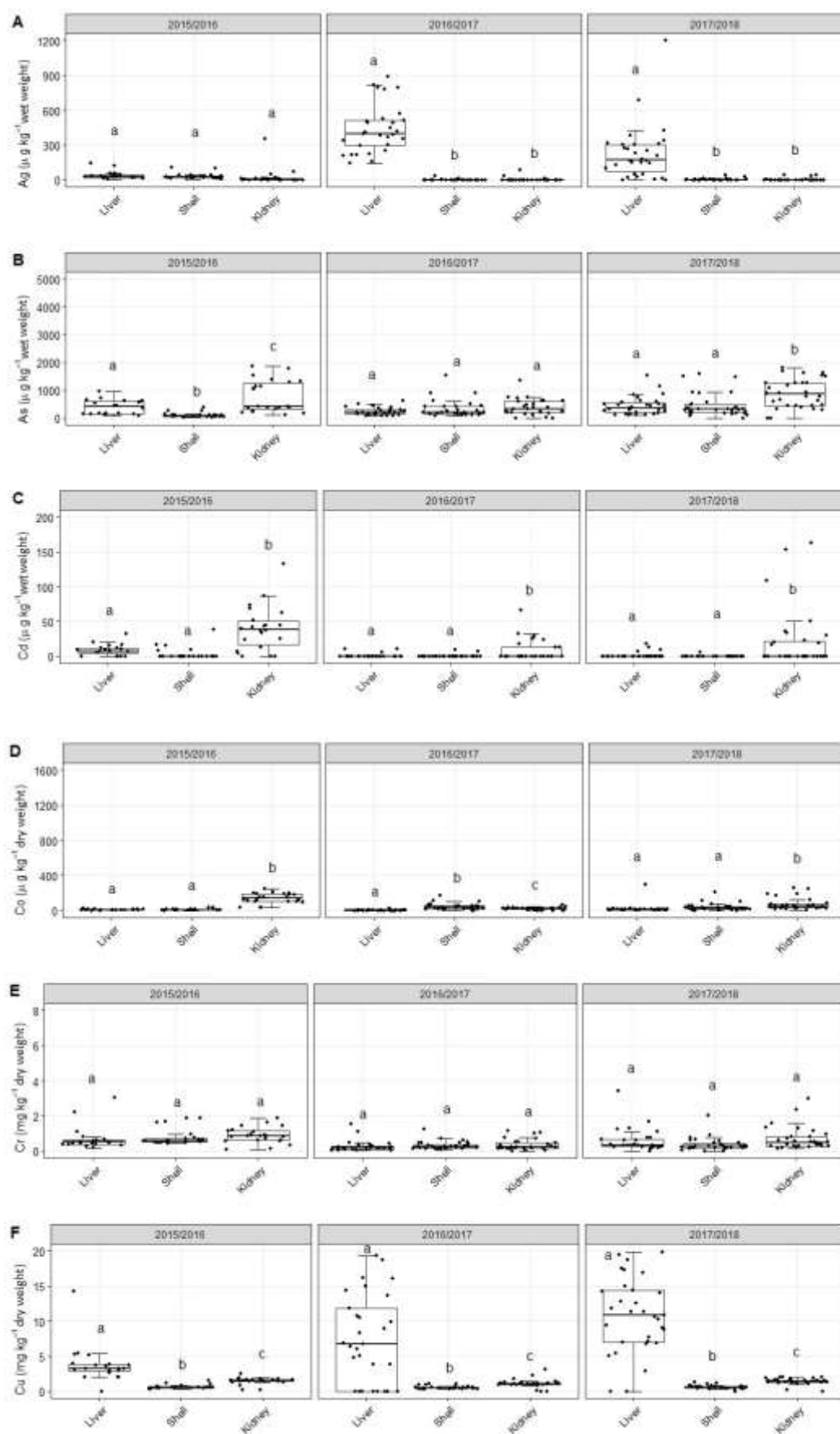


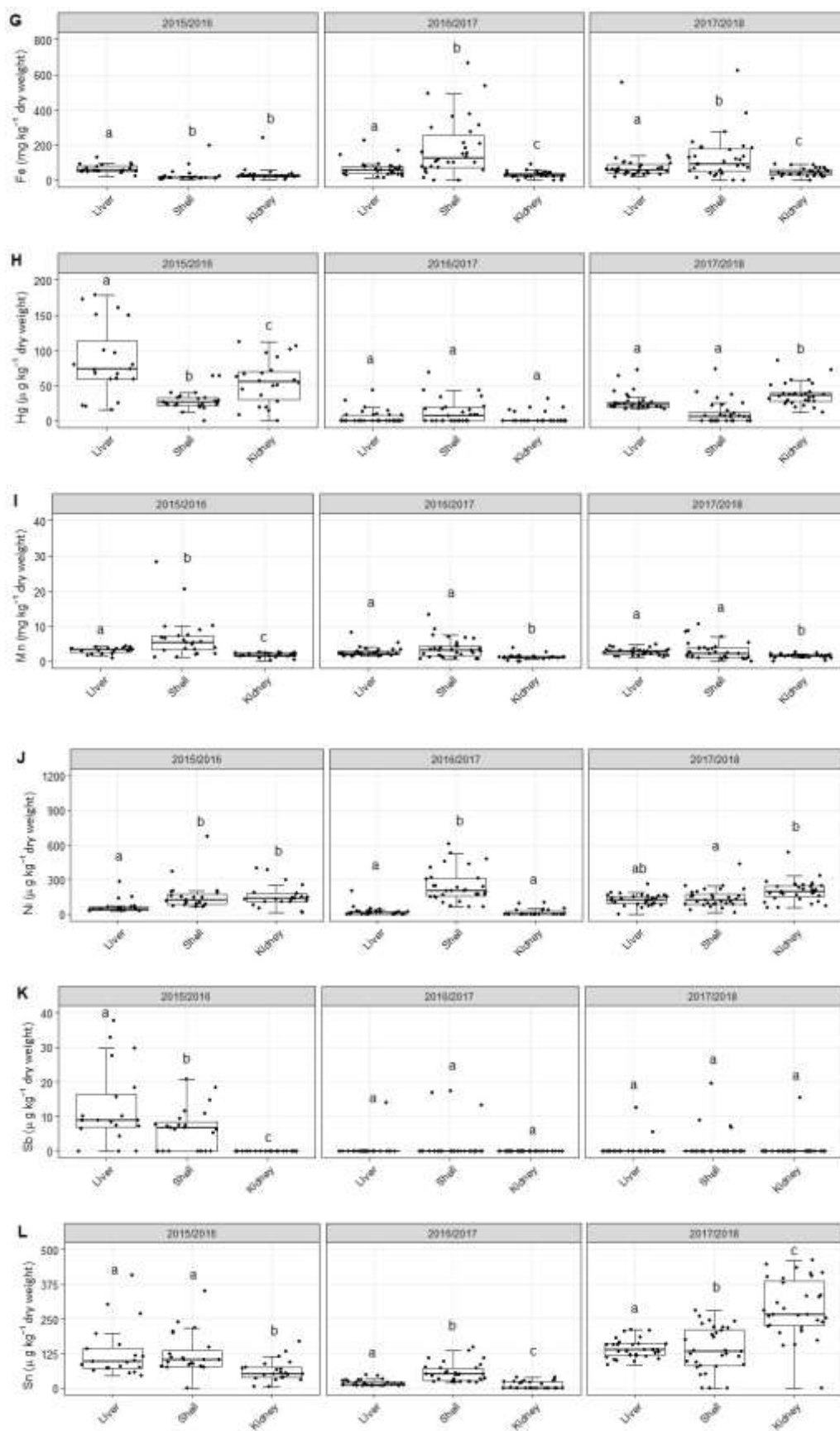
Figura 3: Metais (Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Sb, Sn e Zn) em amostras de cascas dos ovos (ELP); do conteúdo dos ovos (EC) no momento da postura; nas cascas dos ovos dos filhotes recém-eclodidos (ENH) e da somatória das amostras de tecidos dos filhotes recém-eclodidos (Hatchlings = soma de casco, rim e fígado) de *Caretta caretta* que eclodiram em um trajeto de 20 km da REBIO de Comboios, ES, Brasil (desde a foz do Rio Doce até base da REBIO), nas 3 temporadas reprodutivas: 2016, 2017 e 2018.

3.2.3 Quantificação dos metais nos tecidos dos filhotes recém eclodidos (rim, fígado, casco)

As concentrações dos 13 elementos metálicos também foram analisadas nos três tecidos (casco, rim e fígado) dos filhotes recém-eclodidos (figura 4). Observa-se que a quantidade dos metais nesses tecidos varia entre os tecidos, assim como varia nas três temporadas reprodutivas avaliadas. Assim, como observa-se que alguns desses metais não houve predomínio em nenhum dos três tecidos, como: Ag (2016), As (2017), Cr (2016, 2017 e 2018) e Hg (2017), Sb (2017 e 2018). No entanto, Ag (2017 e 2018), Cu, Fe (2016), e Sb (2016) predominam no fígado. No casco há o predomínio de Co (2017), Fe (2017 e 2018), Mn (2016) e Ni (2016 e 2017). No rim predominam: As (2016 e 2018), Cd, Co (2016 e 2018), Hg (2018), Ni (2018) e Sn (2018)

Os cinco metais quantificados em maiores concentrações nos três tecidos estudados são os mesmos do que os que predominam no sedimento, nas cascas dos ovos (ELP e ENH) e no conteúdo do ovo: rim e casco a ordem decrescente é $Fe > Zn > Mn > Cu > Cr$ e no fígado é $Fe > Zn > Cu > Mn > Cr$.





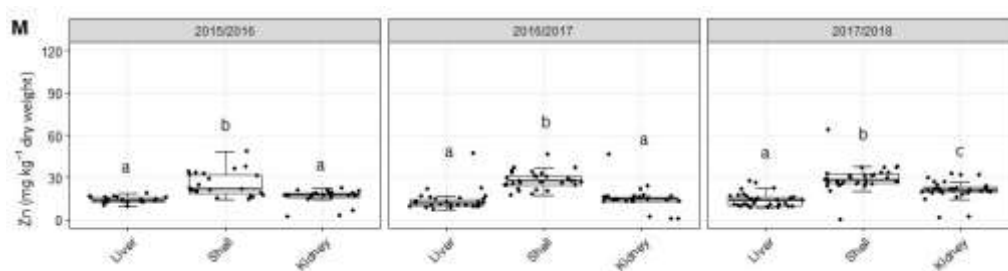


Figura 4: Metais (Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Sb, Sn e Zn) em cada tecido biológico dos filhotes recém-eclodidos (casco, rim e fígado) de *Caretta caretta* que eclodiram em um trajeto de 20 km da REBIO de Comboios, ES, Brasil (desde a foz do Rio Doce até base da REBIO), nas 3 temporadas reprodutivas: 2016, 2017 e 2018.

3.3. Análise genotóxica e Análises bioquímicas

A maior frequência de micronúcleos quantificados foi observada nos animais coletados na primeira temporada de desova, diminuindo significativamente e gradativamente a cada uma das temporadas subsequentes (figura 5A). O maior valor observado corresponde à temporada em que a lama de rejeitos chegou ao litoral capixaba com uma média de 4,52 ‰ de micronúcleos (em 2016) e foi reduzindo nas duas temporadas reprodutivas seguintes, 2,84 ‰ e 1,47‰ (2017 e 2018, respectivamente).

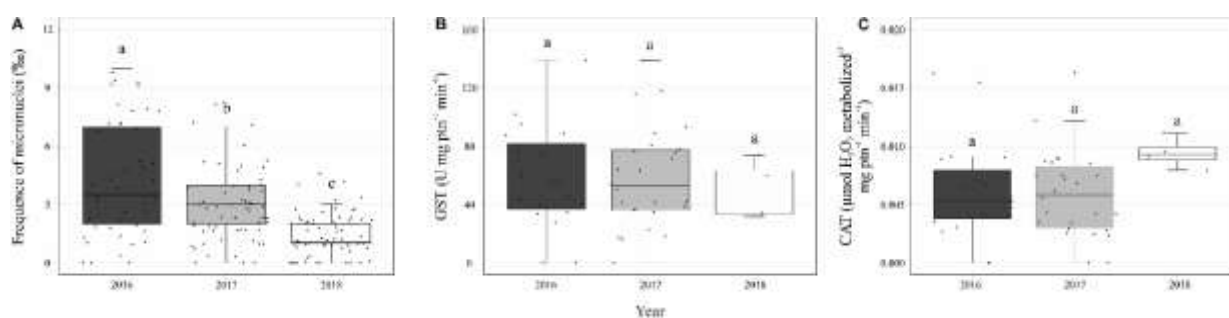


Figura 5. Frequência de micronúcleos eritrocitária (‰) (A); atividade hepática da enzima glutathione S-transferase (GST) (B); e atividade hepática da enzima catalase (CAT) (C) em filhotes recém-eclodidos de *Caretta caretta* que nidificaram nas praias da REBIO de Comboios (ES, Brasil) que se estende desde as proximidades da foz do Rio Doce à 37 km na direção sul do litoral.

Os resultados obtidos a partir da análise das atividades das enzimas GST e CAT no tecido hepático dos filhotes de tartarugas de *C. caretta* (figura 5) revelam que, apesar de todos os metais quantificados no organismo desses filhotes recém-eclodidos nas três temporadas reprodutivas, não houve alterações significativas na atividade dessas duas enzimas.

DISCUSSÃO

Este trabalho reporta a quantidade de metais no sedimento das praias na foz sul do rio Doce, no sudeste brasileiro, a fim de avaliar a transferência desses metais, durante o período de incubação, para filhotes recém-eclodidos de tartarugas da espécie *Caretta caretta*, em três temporadas reprodutivas consecutivas. O intuito dessas averiguações foi o de realizar um biomonitoramento dessa região usando os ovos/filhotes dessa espécie de tartaruga, após o colapso da barragem de rejeitos de uma mineradora (Mariana/MG) ocorrido em novembro de 2015, cuja lama percorreu todo o rio Doce e atingiu a sua foz e regiões adjacentes. Nossas avaliações revelaram que antes mesmo da chegada da lama aos locais de desova das tartarugas já havia uma quantidade significativa de metais, os quais tiveram suas concentrações reduzidas nos anos de 2017 e 2018 (Ag, As, Cd, Hg, Sb e Zn). Parte desses metais observados no sedimento também foi encontrada nas respectivas cascas que protegeram os filhotes durante o período de incubação. É importante ainda ressaltar que mesmo que as cascas após o período de incubação tenham apresentado de modo geral concentrações de metais superiores às cascas coletadas no momento da postura, nem toda a quantidade de metais observada nas cascas dos ovos e nos filhotes após incubação foi proveniente de uma transferência a partir do sedimento, visto que os ovos coletados diretamente da cloaca da mãe já continham parte desses metais acumulados tanto na casca quanto no conteúdo desses ovos.

Ao longo desse estudo de biomonitoramento observamos que a quantidade de alguns metais nas amostras de sedimentos foram mais elevadas nos anos de 2015 e 2016 e sofreram uma diminuição nos anos de 2017 e 2018 (Ag, As, Cd, Hg, Sb e Zn), mesmo com a remoção e dispersão de solos e sedimentos causados pelo forte fluxo de lama (Silva et al., 2018) percebidos principalmente nos anos de 2015 e 2016. Essa alta quantidade de metais antes da chegada da lama pode ser explicada devido a

contaminação prévia desse sedimento por efluentes domésticos, industriais, da agricultura e de mineração (Davila et al., 2019); e inundações que intensificam a dispersão de poluentes em um sistema fluvial Ciszewski e Grygar (2016), como o do rio Doce. Da mesma forma a diminuição/suspensão de chegada de rejeitos na foz do rio, assim como um período de estiagem podem justificar os valores mais baixos de metais nos anos seguintes, principalmente no ano de 2017.

De acordo com Ciszewski e Grygar (2016) e Davila et al. (2019) as areias da praia da foz do Rio Doce já apresentavam valores significativamente altos de As, Cu, Cr e Ni antes da chegada da lama de rejeitos devido ao fluxo do rio e deposição de sedimentos, fazendo com que esses elementos fossem transportados para as áreas dos ninhos da foz e por toda extensão da REBIO de Comboios, corroborando com os resultados encontrados no presente trabalho. De acordo com Magris et al. (2019) a extensão da pluma de sedimentos foi espacialmente restrita à zona costeira adjacente à foz do rio em fevereiro de 2016 quando a maior diferença em termos de carga de sedimentos foi documentada (ou seja, $11,9 \text{ kg m}^{-2}$), e que a direção sul desta pluma de sedimentos a partir da foz do rio expôs áreas costeiras do sul aos constituintes da pluma. Estando de acordo com o período das primeiras coletas de filhotes de tartarugas cabeçudas e sedimento dos ninhos, devido à exportação de sedimentos na foz do rio que permaneceu alta até abril de 2016 (cinco meses após o início do evento de pulso) (Hatje et al., 2017; Rudorff et al. 2018; Magris et al., 2019). Embora os rejeitos da lama apresentem baixos níveis de metais em comparação com o que se encontrou na água e no sedimento da foz do rio Doce logo após o desastre (CPRM 2015; Segura et al, 2016; e Davila et al, 2019), deve-se saber que o forte fluxo de lama causou a remoção e dispersão de solos e sedimentos previamente contaminados (Silva et al., 2018), unindo-se aos metais contidos a essa lama de rejeitos da barragem, que atingiu a foz do rio Doce.

Queiroz et al. (2018) e Davila et al. (2019) estudaram os rejeitos depositados no estuário do rio Doce e encontraram níveis mais elevados do que todos os 13 metais analisados na presente pesquisa, com exceção dos sedimentos coletados na presente pesquisa em 2015. Esta observação apoia a ideia de que o fluxo de lama foi misturado com solos e sedimentos previamente contaminados, levando-os a jusante. Davila et al. (2019) também analisaram As em profundidade e destacaram observações que indica que o conteúdo de As no sedimento foi muito maior no passado, uma vez que as

camadas mais profundas estão relacionadas à partículas depositadas em eventos de inundação mais antigos (Suguio e Bigarella, 1990), justificando a presença desses elementos nas areias das praias da REBIO.

Outras observações importantes foram relatadas nos estudos de Rudorff et al. (2018) que registraram aumento das precipitações no final de janeiro de 2016, quanto realmente iniciou a estação úmida. O que se faz entender de acordo com a presente pesquisa é que as coletas de sedimento feitas em novembro de 2015 antes da chegada da lama na foz do Rio Doce já estavam com quantificações consideráveis de elementos metálicos, mas que possivelmente receberam o aporte desses elementos junto a lama nas areias da praia de Comboios. Porém após as precipitações de 2016, quando as coletas em cada ninho foram feitas em abril e maio, o sedimento dos ninhos tenha passado por uma considerável lavagem, diminuindo então a intensidade dos elementos metálicos adsorvidos no sedimento nesse período. Na segunda temporada reprodutiva das tartarugas cabeçudas após o desastre, as análises mostram uma queda acentuada da quantificação dos metais, o que também corrobora com Rudorff et al. (2018) e Magris et al. (2019) ao registrarem dois importantes eventos de precipitação pluviométrica no final de novembro e meados de dezembro de 2016 (correspondente a temporada reprodutiva de 2016/2017), lavando ainda mais intensamente o sedimento dos ninhos. Nesse período, os ninhos experimentais foram perdidos com as fortes chuvas na região, o que alterou a estrutura da praia e muitos dos ninhos foram escavados e levados pelas fortes ondas juntamente com a chuva. Esses ninhos tiveram que ser coletados novamente, desde o momento de flagrar as fêmeas cavando os ninhos, até o final do monitoramento, quando ocorreu a eclosão. Magris et al. (2019) ao descreverem o padrão de exportação de sedimentos gerado pelo modelo GCM, relatam que a exportação de sedimentos atingiu um pico de cerca de 107 t durante a estação chuvosa dos anos 2017, 2018, nas suas simulações, corroborando então com a menor quantificação de alguns metais no sedimento e em todas as outras amostras (ovos e filhotes) que ficaram em contato com o sedimento durante as respectivas temporadas reprodutivas.

Para avaliarmos a bioacumulação dos metais nas amostras de filhotes das tartarugas cabeçudas, que foram incubadas nas praias da REBIO, primeiramente foi averiguado como estavam os ovos assim que as mães chegavam às praias para fazerem suas posturas. Isso porque os poluentes armazenados nos tecidos adiposos das fêmeas

podem ser liberados durante a vitelogênese e subsequentemente ser integrados à vitelogenina (Muñoz e Vemeiren, 2020). Uma via alternativa de síntese de vitelogenina sugere que o longo período vitelogênico em tartarugas marinhas (vários meses, possivelmente até anos) (Miller, 1985) pode permitir que eles ignorem a necessidade de usar lipídios armazenados no tecido adiposo para desenvolver gema e, em vez disso, permitem uma vitelogênese lenta e contínua usando nutrientes ingeridos (Price, 2017), que corresponde a uma estratégia de geração de energia. As reservas de gordura armazenadas podem então ser direcionadas para suportar os altos custos energéticos das tartarugas fêmeas posteriormente, durante sua migração para os locais de nidificação, um período durante o qual as fêmeas ingerem pouca ou nenhuma comida (Fossette et al. 2007; Caut et al. 2008). Poluentes derivados de nutrientes ingeridos ou presentes no fígado no momento da vitelogênese são as prováveis fontes de metais em ovos de tartarugas marinhas. A geração e captação de energia então apresenta dois extremos de um continuum. Embora uma das estratégias possa dominar, é provável que sempre haja uma mistura das duas ocorrendo ao mesmo tempo. Independentemente da estratégia de melhoramento dominante, no entanto, o perfil de poluição dos ovos refletirá a poluição na área de forrageamento, porque grande parte da vitelogênese ocorre durante esse período (Frossard et al 2020; Frossard et al 2020 - submetidos). Assim, sabemos que os metais quantificados nos ovos (ELP e EC) retirados direto da cloaca da fêmea não estão relacionados aos metais da região da foz do Rio Doce e sim com o histórico de migração e forrageamento das fêmeas.

As amostras que passaram aproximadamente 60 dias de incubação em contato com o sedimento dos ninhos que eclodiram nas praias da REBIO de Comboios (desde a foz do Rio Doce até base da REBIO, nas três temporadas reprodutivas: 2016, 2017 e 2018 foram então monitoradas junto e após o desastre do rompimento da barragem de rejeitos que atingiu o rio. Dos teores de metais (Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Sb, Sn, Zn) pode-se observar que todas as amostras que ficaram em contato com o sedimento, como as cascas dos ovos que se desenvolveram (ENH) e os filhotes recém-eclodidos (Hatchlings), apresentaram concentrações maiores de metais corroborando com Vazquez et al. (1997) e Godley et al. (1999) ao afirmarem que a porosidade das cascas permite as trocas gasosas entre o embrião e o meio, e que consequentemente permite a entrada de metais para o interior do ovo. Quando observa-se as diferenças entre as amostras de cascas dos ovos coletados diretamente da cloaca da fêmea (ELP)

com as amostras de cascas dos ovos incubados no sedimento das praias (ENH), em cada temporada, o que vimos foi que o As, Co, Cr, Fe, Mn e Ni estão significativamente em maiores quantidades em ENH. Esses resultados mostram que houve transferência desses metais do sedimento para as cascas dos ovos, assim como podemos observar que houve um incremento da muitos desses metais (metais (Ag, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Sb e Zn)) aos filhotes recém-eclodidos (H) após a incubação no sedimento em comparação com o conteúdo dos ovos (EC). Mostrando então o aporte de absorção de contaminantes para o embrião, com uma parte se mantendo retido nas cascas, e mantendo então a função parcial de proteção exercida pelas cascas dos ovos das tartarugas. Para tanto, deve-se notar que as maiores concentrações dos metais, absorvida do sedimento, para cada tecido dos filhotes foram, primeiramente, encontrados no rim, seguido do casco e em menores quantidades no fígado. Corroborando com os estudos de Ross et al. (2017) cujas pesquisas mostraram que normalmente os metais se concentram em tecidos renais, fígados, musculares e ovos, respectivamente, nas tartarugas marinhas.

A partir de todas essas observações comparativas entre os metais encontrados no sedimento, vimos que no início, o contato do embrião com o ambiente de incubação, parte do material metálico que foi encontrado no sedimento passa para as amostras. Com isso observa-se que uma quantidade menor de metais é retida nas cascas dos filhotes, e outra em maior quantidade, é absorvida pelos filhotes que eclodiram na praia da REBIO. O efeito tóxico dos metais contidos no sedimento reflete-se nos filhotes, resultando em efeitos genotóxicos. Visto que foi observada uma elevada quantidade de micronúcleos eritrocitários nos filhotes recém-eclodidos durante o primeiro período de coleta. O intervalo de valor de mínimo a máximo variou de 0 a 13 micronúcleos, com uma média de 4,5 ‰ na temporada concomitante à chegada da lama na praia (2015/2016); 2,8 ‰ na segunda temporada; e de 1,5 ‰ na terceira temporada reprodutiva das tartarugas cabeçudas. Esses primeiros valores estão acima dos encontrados por outros autores: 0 a 2 MN em amostras de sangue de *Trachemys callirostris* coletados em áreas sem interferência antrópica (controle negativo) (Zapata et al. 2016); e 1,3 ‰ de MN em filhotes recém-eclodidos de *Chelonya mydas* em praias conservadas da Ilha da Trindade (Frossard et al. 2020 – in press). Por outro lado, a frequência de micronúcleos na temporada de 2015/2016 assemelha-se aos 12 ‰ dos filhotes recém eclodidos de *Podocnemis expansa* incubados em sedimento de praias contaminadas dos rios Araguaia e Crixás (norte do Brasil) (Frossard et al 2020-

submetido). O que indica que as condições ambientais existentes nas praias próximas a região da foz do Rio Doce, passaram por um período crítico com a chegada da lama de rejeito, mas que essa fase crítica foi amenizando no decorrer dos anos pós-evento, que é justificado também ao observar a diminuição de metais no sedimento, e consequentemente nos tecidos dos filhotes. De acordo com vários autores (Jha, 2008; Shugart, 2000; 1990; Shugart e Theodorakis, 1998) a perda na integridade do DNA pode causar efeitos genotóxicos, como modificações na base do DNA, quebras de fita, depuração e ligações cruzadas. Esses tipos de danos têm sido associados à carcinogênese e efeitos negativos sobre a fecundidade, longevidade e taxas de crescimento em organismos afetados que pode ter importantes repercussões demográficas (Theodorakis et al., 2000). Por isso a evidência de danos genotóxicos como este é tido como um biomarcador útil, empregado como uma ferramenta eficaz de alerta precoce em avaliações de risco ecológico e de biomonitoramento ambiental (Park e Choi, 2007).

As enzimas do sistema antioxidante podem apresentar um aumento ou uma redução de sua atividade dependendo do tipo e da concentração do estressor (Javed et al. 2015) sendo frequentemente usadas como biomarcadoras (Morcillo et al., 2016; Cortés-Gómez et al., 2018). Contudo, estudos que relacionam atividade enzimática e metais são poucos em número para animais de vida selvagem, já que a maioria é desenvolvida em experimentos controlados em laboratório. No caso das tartarugas marinhas, qualquer literatura sobre o estresse oxidativo é recente e muito limitada (Finlayson et al., 2016). No presente estudo as atividades enzimáticas da GST e da CAT não sofreram alterações nas diferentes temporadas reprodutivas. Esses resultados sugerem que não houve a ativação da rota metabólica dessa enzima ou até mesmo que foi utilizada outra via de detoxificação na tentativa da eliminação dos metais acumulados. O mesmo não ocorreu com outras espécies de tartarugas marinhas nos estudos de Labrada-Martagón et al. (2011); Perrault et al. (2014); Tremblay et al., (2016) e Cortés-Gómez et al., (2018), que trabalharam com GST e CAT no sangue de animais adultos vivos, e Valdivia et al. (2007) e Andreani et al. (2008) com tartarugas mortas acidentais, porém não encontramos relatos para filhotes recém eclodidos de tartarugas, tanto marinhas quanto de água doce.

Os resultados obtidos indicam que o contato direto dos ovos com o sedimento de incubação contaminado exerce um papel importante na transferência de poluentes, sendo

possível estimar a genotoxicidade desses elementos nos filhotes recém-eclodidos na área litorânea próxima da Foz do rio Doce, ao qual foi atingida pela lama de rejeitos, quando a barragem da Samarco se rompeu. Contudo vimos que a quantificação dos metais existentes nas areias da praia da REBIO de Comboios antes da chegada dos rejeitos era próxima da quantificação feita logo após a chegada da lama. Por isso, o que vimos foi que esses compostos químicos são então decorrentes dos efluentes doméstico, industrial, de mineração e de produção agrícola que são lixiviados para o rio, contaminando parte do ecossistema aquático e terrestre e todos os organismos a ele associados. Esses mesmos contaminantes chegam constantemente às praias do entorno da foz do rio. Já a compreensão dos efeitos do colapso das barragens de mineração nos sistemas marinhos a jusante requer a modelagem do fluxo de partículas da terra para o mar, para então chegar até o ambiente de incubação das tartarugas nas praias da REBIO de Comboios. Até a presente data, um número substancial de abordagens para escoamento superficial e transporte de sedimentos tem se concentrado nas cargas de poluentes contínuas, resultantes de mudanças de longo prazo no uso da terra e fontes de poluição não pontuais, como escoamento agrícola e silvicultura (Álvarez-Romero et al., 2014). Apesar da ocorrência desses incidentes em larga escala ter ocorrido ao longo de um período de várias décadas (Kossoff et al., 2014), o rompimento da barragem de rejeitos de Mariana em novembro de 2015 afetou todo o curso do rio Doce na época do evento, mas o ocorrido não se mantém afetando o desenvolvimento natural das tartarugas cabeçudas da espécie *Caretta caretta* que desovam nas praias do entorno da foz. Visto que a quantificação de metais pode diminuir no sedimento onde os ovos são anualmente incubados, os danos genotóxicos nos filhotes que ali eclodem também tendem a ser diminuídos.

CONCLUSÃO

O desastre causado pelo rompimento da barragem envolveu o derramamento de milhões de toneladas de rejeitos enriquecidos com rejeitos de mineração, no rio Doce. No entanto a presença de metais nas amostras de sedimento de 2015 coletadas antes da chegada da lama de rejeitos na foz do rio mostram que a região já estava contaminada por metais. Ou seja, a areia da praia da REBIO de Comboios, que é ambiente de incubação das tartarugas *Caretta caretta*, e de outras espécies, está intimamente associada a metais potencialmente tóxicos, antes mesmo do desastre. O que foi apresentado no presente

estudo foi que apesar do acúmulo de metais nos filhotes, o desastre da chegada da lama de rejeitos, afetou inicialmente esses filhotes, mas que com o passar dos anos a presença elevada de metais reduziu. Conclui-se ainda neste trabalho, que além da transferência dos metais do sedimento de incubação para os ovos de tartaruga, há uma transferência prévia da fêmea para o ovo.

Declaração de interesse

Os autores declaram que não tiveram interesses financeiros concorrentes ou relacionamentos pessoais que possam parecer influenciar o trabalho relatado neste artigo.

AGRADECIMENTOS

Os autores reconhecem a Fundação Pró-TAMAR por possibilitarem o monitoramento e as amostragens, juntamente aos biólogos de campo na temporada reprodutiva concomitante ao desastre da Lama de Rejeitos e posteriormente junto aos estagiários nas duas temporadas reprodutivas consecutivas, pela assistência no monitoramento de fêmeas e ninhos nas praias da REBIO de Comboios. Os autores gostariam de agradecer a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil - CAPES por fornecer bolsas de pós-graduação para a aluna Alexandra Frossard. Este trabalho foi financiado pela Fundação de Pesquisa Científica do Espírito Santo (FAPES - bolsas nº 76413730/16) e pela Universidade de Vila Velha (UVV - # 2018PI001).

REFERÊNCIA

- Álvarez-Romero, J.G., Wilkinson, S.N., Pressey, R.L., Ban, N.C., Kool, J., Brodie, J., 2014. Modeling catchment nutrients and sediment loads to inform regional management of water quality in coastal-marine ecosystems: a comparison of two approaches. *J. Environ. Manag.* 146, 164–178.
- ANA. Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico, 2015. Encarte Especial sobre a Bacia do Rio Doce: Rompimento da Barragem em Mariana/MG.
- CPRM. Serviço Geológico do Brasil, 2015. Monitoramento Especial da bacia do Rio Doce.
- Baptistotte, C., Thomé, J.C.A., Bjørndal, K.A., 2003. Reproductive biology and conservation status of the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) in Espírito Santo Estate, Brazil. *Chelonian Conserv. Biol.* 4(3), 523-529.
- Bianchini, A. 2016., RELATÓRIO: Avaliação do impacto da lama/pluma Samarco sobre os ambientes costeiros e marinhos (ES e BA) com ênfase nas Unidades de Conservação. 1a Expedição do Navio de Pesquisa Soloncy Moura do CEPSUL/ICMBio.
- Caurant, F., Bustamante, P., Bordes, M., Miramand, P., 1999. Bioaccumulation of cadmium, copper and zinc in some tissues of three species of marine turtles stranded along the French Atlantic coasts. *Mar Pollut Bull* 38:1085–1091.
- Caut, S., Guirlet, E., Ângulo, E., Das, K., Girondot, M., 2008. Isotope analysis reveals foraging area dichotomy for Atlantic leatherback turtles. *PLoS One* 3:e1845.
- Ciszewski, D., Grygar, T.M., 2016. A Review of Flood-Related Storage and Remobilization of Heavy Metal Pollutants in River Systems. *Water. Air. Soil Pollut.* 227. <https://doi.org/10.1007/s11270-016-2934-8>
- Davila, R.B., Fontes, M.P.F., Pacheco, A.A., Ferreira, M.S., 2019. Heavy metals in iron ore tailings and floodplain soils affected by the Samarco dam collapse in Brazil, *Science of the Total Environment* <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136151>
- Ducan, E.M., Botterell, Z.L.R., Broderick, A.C., Galloway, T.S., Lindeque, P.K., Nuno, A., Godley, B.J., 2017. A global review of marine turtle entanglement in anthropogenic

debris: a baseline for further action. ESR Inter-Research 34:431-448. DOI:
<https://doi.org/10.3354/esr00865>.

Fenech, M., 2000. The in vitro micronucleus technique. Mutation Research. 455, 81-95.

Finlayson, K.A., Leusch, F.D.I., van der Merwe, J.P., 2016. The current state and future directions of marine turtle toxicology research. Environ. Int. 94, 113–123.

Finlayson, K.A., Leusch, F.D.I., van der Merwe, J.P., 2016 The current state and future directions of marine turtle toxicology research. Environ Int 94:113–123.

Fossette, S., Ferraroli, S., Tanaka, H., Ropert- Coudert, Y., Arai, N., Sato, K., Naito, Y., Le Maho, Y., Georges, J.Y., 2007. Dispersal and dive patterns in gravid leatherback turtles during the nesting season in French Guiana. Mar Ecol Prog Ser 338, 233–247.

Fossi, M.C., Panti, C., Guerranti, C., Coppola, D., Giannetti, M., Marsili, L., Minutoli, R., 2012. Are baleen whales exposed to the threat of microplastics? A case study of the Mediterranean fin whale (*Balaenoptera physalus*). Mar. Pollut. Bull. 64, 2374–2379.

Francini-Filho, R.B., Cordeiro, M.C., Omachi, C.Y., Rocha, A.M., Bahiense, L., Garcia, G.D., Tschoeke, D., Almeida, M.G., Menezes, R., Mazzei, E.F., Joyeux, J.C., Rezende, C.E., Thompson, F.I., 2019. Remote sensing, isotopic composition and metagenomics analyses revealed Doce River ore plume reached the southern Abrolhos Bank Reefs. Science of the Total Environment. 697, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134038>

Frossard, A., Ferreira, P.D., Carneiro, M.T.W.D., Heringer, O., Edringer, D.C., Gomes, L.C., 2013. Effect of dietary cádmium on fitness, growth, genotoxicity and accumulation in the Yellow-spotted River Turtle, *Podocnemis unifilis*. Aquatic Toxicology. 140-141, 239-241. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.aquatox.2013.06.002>.

Frossard, A., Coppo, G.C., Heringer, O.A., Chippari-Gomes, A.R., 2020. Metal bioaccumulation and its genotoxic effects on eggs and hatchlings of South American River Turtles (*Podocnemis expansa*). Ecotoxicology.

Frossard, A., Vieira, L.V., Carneiro, M.T.W.D., Gomes, L.C., Chippari-Gomes, A.R., 2020. Accumulation of trace metals in eggs and hatchlings of *Chelonia mydas*. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology

- Gallen, C., Heffernana, A.L., Kaserzona, S., Dogruer, G., Samanipour, S., Gomez-Ramos, M.J., Mueller, J.F., 2019. Integrated chemical exposure assessment of coastal green turtle foraging grounds on the Great Barrier Reef. *Science of the Total Environment*. 657, 401–409. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.322>.
- Godley, B.J., Thompson, D.R., Furness, R.W., 1999. Do heavy metal concentrations pose a threat to marine turtles from the Mediterranean Sea? *Mar. Pollut. Bull.* 38, 497–502.
- Gomes, L.E. de O., Correa, L.B., Sá, F., Neto, R.R., Bernardino, A.F., 2017. The impacts of the Samarco mine tailing spill on the Rio Doce estuary, eastern Brazil. *Mar. Pollut. Bull.* 120, 28–36.
- Grisolia, C.K., Rivero, C.L.G., Starling, F.L.R.M., Silva, I.C.R., Barbosa, A.C., Dorea, J.G., 2009. Profile of micronucleus frequencies and DNA damage in different species of fish in a eutrophic tropical lake. *Genet Mol Biol.* 32, 138–143.
- Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1981. Assays for differentiation of Glutathione S-transferases. *Methods Enzymol*, 77, 398–405.
- Habig, W.H., Pabst, W.B., Jakoby W.B., 1974. Glutathione S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249, 7130–7139.
- Hatje, V., Pedreira, R.M.A., Schettini, C.A.F., Souza, G.C., Marin, D.C., Hackspacher, P.C., 2017. The environmental impacts of one of the largest tailing dam failures worldwide. *Scientific Reports*. 7, 10706. DOI:10.1038/s41598-017-11143-x.
- Jha, A.N., 2008. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis*. 23, 207–221 <http://dx.doi.org/10.1093/mutage/gen014>.
- Keller, J.M., McClellan-Green, P.D., 2004. Effects of organochlorine compounds on cytochrome P450 aromatase activity in an immortal sea turtle cell line. *Mar. Environ. Res.* 58, 347–351.

Kossoff, D., Dubbin, W.E., Alfredsson, M., Edwards, S.J., Macklin, M.G., Hudson-Edwards, K.A., 2014. Mine tailings dams: characteristics, failure, environmental impacts, and remediation. *Appl. Geochem.* 51, 229–245.

Lamont, M.M., Iverson, A.R., 2018. Shared habitat use by juveniles of three sea turtle species. *MEPS Inter-Research* 606:187-200.
DOI:<https://doi.org/10.3354/meps12748>.

Lee, R.F., Steinert, S., 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* 544(1), 43–64. [http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5742\(03\)00017-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5742(03)00017-6).

Magris, A.R., Marta-Almeida, M., Monteiro, J.A.F., Ban, N.C., 2019. A modeling approach to assess the impact of land mining on marine biodiversity: Assessment in coastal catchments experiencing catastrophic events (SW Brazil). *Science of the Total Environment*. 659, 828-840. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.238>.

Mast, R.B., Hutchinson, B.J., Howgate, E., Pilcher, N.J., 2005. MTSG update: IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group host the 2nd Burning Issues Assessment Workshop. *Mar. Turt. Newsl.* 110, 13-15.

Miller, J.D., 1985. Chapter 4: Embryology of marine turtles. In Gans, C., Billett, F., Maderson, P.F.A., 1985. Eds, *Biology of the Reptilia*, vol. 14: Development. Wiley, New York, NY, USA, pp 269–328.

Monroy, M., Maceda-Veiga, A., de Sostoa, A., 2014a. Metal concentration in water, sediment and four fish species from Lake Titicaca reveals a large-scale environmental concern. *The Science of the total environment* 487, 233–44.
[doi:10.1016/j.scitotenv.2014.03.134](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.03.134).

Monroy, M., Maceda-veiga, A., Sostoa, A.de., 2014b. Science of the Total Environment Metal concentration in water, sediment and four fish species from Lake Titicaca reveals a large-scale environmental concern. *Science of the Total Environment*. 487, 233–244.
[doi:10.1016/j.scitotenv.2014.03.134](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.03.134).

Muñoz, C.C., Vermeiren, P., 2020. Material Transfer os Organic Pollutants to Sea Turtle Eggs: A Metal-Analysis Addressing Knowledge and Data Gaps Toward an

Improved Synthesis of Research Outputs. Environmental Toxicology and Chemistry. 39, 9-29.

Nicolau, L., Monteiro, S.S., Pereira, A.T., Marçalo, A., 2017. Trace elements in loggerhead turtles (*Caretta caretta*) stranded in mainland Portugal: Bioaccumulation and tissue distribution. Chemosphere 03:108.

Novillo, O., Pertusa, J.F., Tomás, J., 2017. Exploring the presence of pollutants at sea: Monitoring heavy metals and pesticides in loggerhead turtles (*Caretta caretta*) from the western Mediterranean. Science of the Total Environment 598, 1130–1139.

Park, S.Y., Choi, J., 2007. Cytotoxicity, genotoxicity and ecotoxicity assay using human cell and environmental species for the screening of their risk from pollutant exposure. Environ Int 33:817–822. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2007.03.014>.

Pearson, R.P., Merwe, J.P.V., Limpus, C.J., Connolly, R.M., 2017. Realignment of sea turtle isotope studies needed to match conservation priorities. DOI: <https://doi.org/10.3354/meps12353>.

Perrault, J.R., Lehner, A.F., Buchweitz, J.P., Page-Karjian, A., 2019. Evidence of accumulation and elimination of inorganic contaminants from the lachrymal salt glands of leatherback sea turtles (*Dermochelys coriacea*). Chemosphere. 217, 59-67. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.206>.

Price, E.R., 2017. The physiology of lipid storage and use in reptiles. Biol Ver 92:1406–1426.

Queiroz, H.M., Nóbrega, G.N., Ferreira, T.O., Almeida, L.S., Romero, T.B., Santaella, S.T., Bernardino, A.F., Otero, X.L., 2018. The Samarco mine tailing disaster: A possible time-boomb for heavy metals contamination? Science of the Total Environment. 637-638, 498-506. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.370>.

R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Segura, F.R., Nunes, E.A., Paniz, F.P., Paulelli, A.C.C., Rodrigues, G.B., Braga, G.U.L., dos Reis Pedreira Filho, W., Barbosa, F., Cerchiaro, G., Silva, F.F.F.F., Batista, B.L., 2016. Potential risks of the residue from Samarco's mine dam burst (Bento Rodrigues, Brazil). *Environmental Pollution*. 218, 813-825.

<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.08.005>

Shugart, L.R., 2000. DNA damage as a biomarker of exposure. *Ecotoxicology* 9:329–340. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1026513009527>.

Shugart, L.R., 1990. Biological monitoring: testing for genotoxicity. In: McCarthy, J. F., Shugart LR (Eds.), *Biomarkers of Environmental Contamination*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, US. pp 205–216.

Shugart, L., Theodorakis, C., 1998. New trends in biological monitoring: application of biomarkers to genetic ecotoxicology. *Biotherapy*. 11:119–127. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1007911027243>.

Potential risks of the residue from Samarco's mine dam burst (Bento Rodrigues, Brazil). *Environ. Pollut.* 218, 813–825. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.08.005>.

Silva, D., Bellato, C., Marques Neto, J., Fontes, M., 2018. Trace elements in river waters and sediments before and after a mining dam breach (Bento Rodrigues, Brazil). *Quim. Nova* XY, 1–10. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170252>.

Theodorakis, C.W., Swartz, C.D., Rogers, W.J., Bickham, J.W., Donnelly, K.C., Adams, S.M., 2000. Relationship between genotoxicity, mutagenicity, and fish community structure in a contaminated stream. *J Aquat Ecosyst StressRecover* 7:131–143.

Vazquez, G.F., Reyes, M.C., Fernandez, G., Aguayo, J.E.C., Sharma, V.K., 1997. Contaminations in marine turtle (*Dermochelys coriaca*) egg shells of Playon de Mexiquillo, Michoacan, Mexico. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 58, 326-333.

Vincente-Martorell J.J., Galindo-Riaño M.D., Garcia-Vargas M., Granado-Castro M. D. 2009. Bioavailability of heavy metals monitoring water, sediments and fish species from a polluted estuary. *Journal of Hazardous Materials*, v. 162, p. 823-836.

Zagatto P.A., Bertoletti E. 2006. *Ecotoxicologia aquática, princípios e aplicações*. São Carlos. Ed Rima. p 55-88.

Zapata, L.M., Bock, B.C., Orozco, L.Y., Palacio, J.A., 2016. Application of the micronucleus test and comet assay in *Trachemys callirostris* erythrocytes as a model for in situ genotoxic monitoring. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 127, 108–116.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As conclusões que foram feitas com a realização da presente tese são de que a transferência materna de metais ocorre para as três espécies de tartarugas estudadas, independente se são de ambiente marinho ou de água doce, assim como também há transferência de metais do sedimento para os ovos após período de incubação. Neste caso, observou-se que apesar das cascas dos ovos atuarem como uma proteção para os embriões durante seu desenvolvimento, permitem a passagem de uma quantidade significativa de metais existentes no ambiente para os filhotes, durante a incubação.

Os metais transferidos para o embrião podem ser acumulados nos diferentes tecidos analisados (sangue, fígado, rim, músculo e casco) das tartarugas, e em diferentes proporções. De acordo com o acúmulo de metais ocorrido nos filhotes, pode haver danos genotóxicos nesses indivíduos, observados por meio do teste do micronúcleo. Sendo este teste podendo ser usado como uma excelente ferramenta nos estudos de biomonitoramento. Em relação ao uso de enzimas (no caso GST e CAT) como biomarcadoras de exposição aos metais, serão necessárias avaliações complementares para que possam ser efetivadas como bons biomarcadores, visto que no presente estudo (capítulo 3) elas não alteraram significativamente.

Outra conclusão é de que os locais estudados refletem as ações antrópicas na região, sendo a região do Araguaia e da foz do rio Doce impactadas pela presença de metais e o ambiente insular da Ilha de Trindade apresenta-se conservado em relação aos demais.

Portanto, os resultados sugerem que ovos e filhotes recém-eclodidos das espécies de tartaruga *C. mydas*, *C. caretta* e *P. expansa*, mediante todas as suas características e todas as respostas apresentadas por elas no presente estudo, podem ser utilizadas como bioindicadoras dos efeitos tóxicos de metais.