

**Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática da
Área Ambiental I – Porção Capixaba do Rio Doce e Região
Marinha e Costeira Adjacente**

A6MTS1 – Material Suplementar 1

Anexo 6 Megafauna - Tartarugas

RT-39 RRDM/FEV 22

RA2021 PMBA/FEST-RRDM

Vitória,

Fevereiro de 2022

1 METODOLOGIA

1.1 GENÉTICA

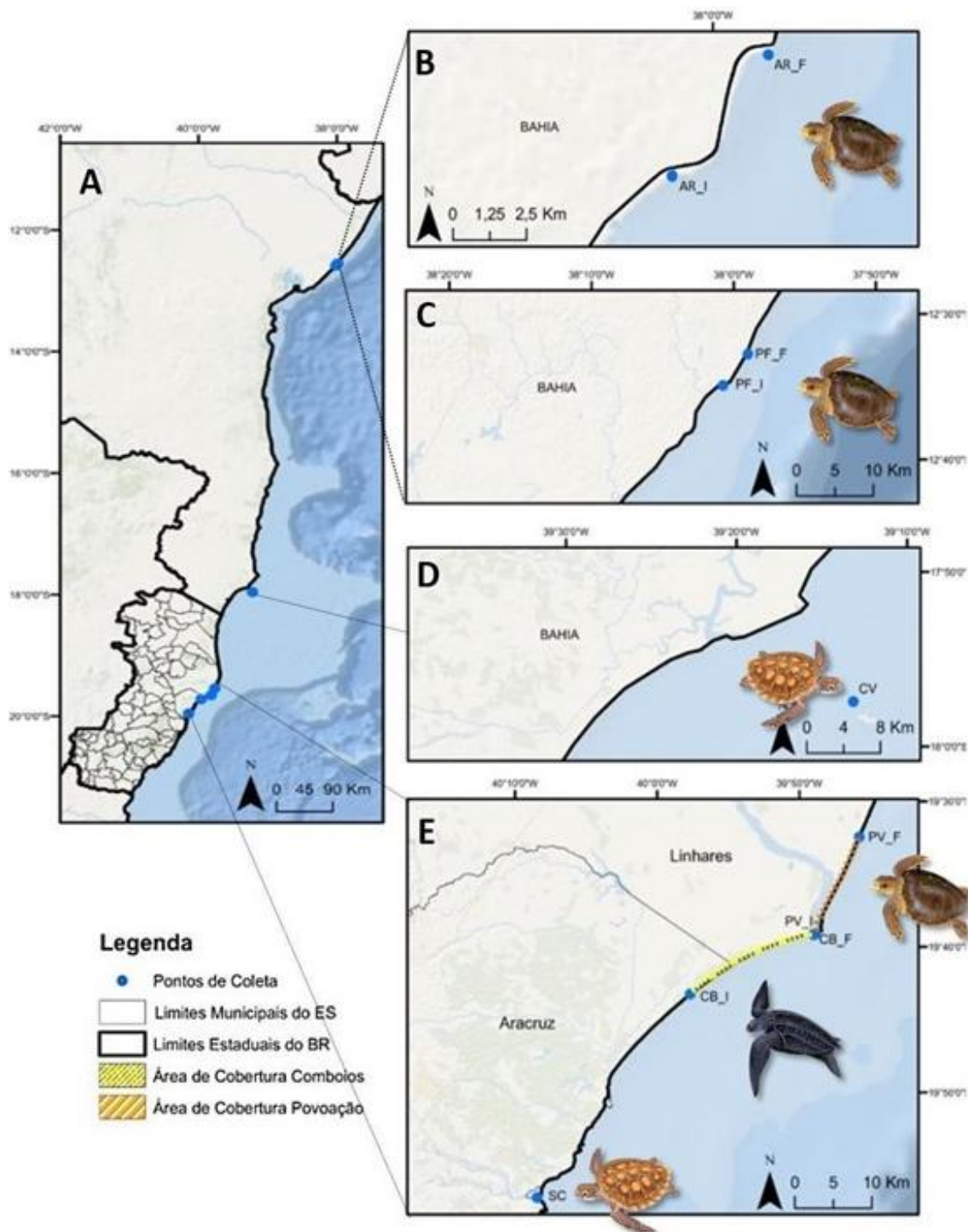
1.1.1 Área de estudo e procedimentos de campo

A procura por fêmeas adultas de tartaruga-cabeçuda (*Caretta caretta*, Figura 1 A e tartaruga-de-couro (*Dermochelys coriacea*, Figura 1 C) ocorreu no município de Linhares, norte do Espírito Santo, uma das principais áreas de desova de tartarugas do estado (Figura 2) A região é monitorada pela equipe da Fundação Pró-TAMAR que faz rondas noturnas para flagrante das fêmeas e rondas diurnas para monitoramento dos ninhos. Durante o período de nidificação nas temporadas reprodutivas de 2018/2019 (Ano 1) e 2019/2020 (Ano 2) e 2020/2021 (Ano 3), foi monitorado um trecho de praia próximo à foz do rio Doce, que abrangeu toda a praia de Povoação a partir do km 38 (lat.-19,652033, long.-39,814616) e se estendeu por mais 13 km a norte até o km 51, início da praia Monsarás (lat.-19,540880, long.-39,763120) (Figura 2). Nesse estudo também realizamos coletas em três áreas controle, onde não houve exposição à pluma principal de rejeitos, com o intuito de observar se ocorreram diferenças entre as áreas analisadas. Para a espécie *C. caretta* foi amostrada a área de reprodução da Praia do Forte, Mata de São João, BA (lat. 12,55563, long. -37,98918) para o Ano 1 e Arembepe para o Ano 2. Para o Ano 3 não foram realizadas coletas de *Caretta caretta* na Área Controle em Arembepe no período correspondente, pois as atividades estavam suspensas devido à COVID-19, no entanto, adicionamos nas análises subsequentes amostras doadas por colaboradores externos.

Figura 1: Tartarugas marinhas monitoradas na área de estudo. (A) *Caretta caretta*; (B) *Chelonia mydas*; (C) *Dermochelys coriacea*.



Figura 2: Mapa das áreas de estudo, demonstrando a distribuição dos pontos de coleta para as populações de tartarugas marinhas (A). Detalhe para a distribuição dos locais de coleta em Áreas Controle para: *Caretta caretta* de Arembepe, BA (B) e Praia do Forte, BA (C); *Chelonia mydas* de Coroa Vermelha, BA (D); Detalhe para a distribuição dos locais de coleta em Áreas impactadas para: *Caretta caretta* e *Dermochelys coriacea* na Praia de Povoação e Comboios, Linhares, ES e *Chelonia mydas* na APA Costa Das Algas, Santa Cruz, ES (E).



Nota: AR= Arembepe; CB=Comboios; CV=Coroa Vermelha; PF = Praia do Forte; PV=Povoação; SC=Santa Cruz; I=Inicial; F=Final.

Durante as rondas noturnas, quando a equipe do TAMAR encontrava alguma fêmea de *C. caretta* ou *D. coriacea* desovando, nossa equipe era contactada para execução dos procedimentos experimentais. Os animais capturados foram identificados nas nadadeiras com marcas de liga de inonel (modelo 681C, National Band and Tag Co.), de acordo com a metodologia utilizada pela Fundação Pró-TAMAR, na qual cada animal recebeu uma numeração única para que em seguida a coleta do material biológico fosse realizada por nossa equipe.

Como não há registros de desovas de *C. mydas* (tartaruga-verde, Figura 1 B) nessa região, as capturas de indivíduos da espécie ocorreram nas áreas de alimentação mais próximas da foz do rio Doce, na APA Costa das Algas, no distrito de Santa Cruz, próximo a foz do rio Piraquê-Açu, Aracruz, ES (lat. -19,953439, long.-40,140484). Como área controle de *C. mydas*, foi definida a região do banco dos Abrolhos, no entorno da Ilha de Coroa Vermelha, Nova Viçosa, BA (lat. -17,956977, long. -39,219050) (Figura 2), ao longo dos três anos do monitoramento realizado pelo PMBA/Fest-RRDM. Por estas populações de *C. mydas* serem compostas de indivíduos em fase juvenil e não saírem da água durante esta fase, foram necessários embarques para captura desses animais com rede de espera. A equipe de coleta ficou em um barco a motor de 12 m, tendo um bote de alumínio à motor que foi utilizado para deslocamento do barco principal até o ponto de disposição da rede para revisão e captura das tartarugas que eventualmente ficaram emalhadas. Foi utilizada uma rede de emalhe de 200 m de comprimento por 4 m de altura, malha de 10 cm, que era conferida a cada 30 minutos em um período que variava de 6 a 8 horas de amostragem diária. Após a captura, as tartarugas eram levadas para o barco principal para realização dos procedimentos de registro biométrico (CCC, LCC), pesagem, identificação com marcas de inonel numeradas e coleta de material biológico. As campanhas de captura e coleta foram realizadas ao longo destes três anos do PMBA/Fest-RRDM conforme descrito em Material Suplementar (*Material Suplementar, A6MTS2, Quadro 1*).

Para cada indivíduo das três espécies capturadas em nosso estudo, foi utilizado um *punch* de biópsia 6mm (Figura 3 C) para coletar amostras de tecido epitelial da região da base do pescoço e início do ombro das tartarugas (Figura 3 B C). Para reduzir os riscos de contaminação do material coletado e infecções do animal amostrado, realizamos a antissepsia do tecido do animal, antes e após o procedimento de coleta do material biológico. Foram coletados dois fragmentos de tecido de cada animal, sendo um de cada lado da base do pescoço. Em alguns casos, também foram realizadas coleta de material biológico através de punção sanguínea também da base do pescoço usando seringa (25 x 7 mm) de 10 mL, conforme previsto no TR-4 e em acordo previsto nas licenças #65543-3, #65543-7 emitidas pelo SISBIO. Posteriormente, cada amostra foi identificada, imersa individualmente em microtubo de 1.5 ml contendo álcool absoluto e armazenados em freezer a -18 °C no LGEM-UFES (Figura 3 D).

Figura 3: Coleta e armazenamento de amostras de tartarugas marinhas na foz do rio Doce (ES) e adjacências. (A) *Punch* de biópsia de 6mm para coleta de tecido; (B) Procedimento de coleta de tecido com *punch* em fêmea de *Caretta caretta* e (C) em juvenil de *Chelonia mydas*; (D) Amostra biológica identificada e armazenada em tubo de 1,5 ml contendo álcool absoluto.



Os dados aqui apresentados referem-se aos períodos Ano 1, Ano 2 e Ano 3, salvo quando expresso no texto em referência a dados pretéritos obtidos pela equipe do Laboratório de Genética e Evolução Molecular da UFES (LGEM-UFES) em parceria com a Fundação Pró-TAMAR ou da literatura.

1.1.2 Procedimentos de laboratório de genética

A extração do DNA das amostras biológicas dos indivíduos das três espécies de tartarugas coletadas foi obtida pelos protocolos de extração salina de DNA (BRUFORD et al., 1992) e CTAB 2% (DOYLE & DOYLE, 1987). Os DNAs extraídos foram ressuspensos em água ultrapura (50 ng/μL), quantificados em espectrofotômetro NanoDrop ND100 e observadas a qualidade das bandas de DNA em gel de agarose 1% por trans-iluminador UV.

Foram utilizados dois tipos de marcadores moleculares para avaliar o padrão de diversidade e estrutura genético-populacional das tartarugas marinhas em nosso estudo: a região controle do DNA Mitocondrial e Microssatélites do DNA Nuclear.

Os fragmentos dos DNAs extraídos das amostras de cada indivíduo coletado foram amplificados por PCRs (Reação de Polimerase em Cadeia) para posterior sequenciamento da região controle do DNA mitocondrial (DNAm) e genotipagem dos microssatélites.

Para amplificação das sequências foram utilizados os primers LCM e H950 (ABREU-GROBOIS et al., 2006) para as três espécies de tartarugas marinhas: *C. caretta*, *C. mydas* e *D. coriacea*. A reação foi realizada com 8.775 µL de ddH₂O, 1.250 µL de tampão [1X], 0.75 µL de MgCl₂ [50mM], 0.2 µL de dNTPs [10mM], 0.2 µL de cada *primer* [10µM], 0.125 µL de Taq platinum [5u/µL] e 2 µL de DNA [50ng/µL], totalizando um volume 13.5 µL de mix de PCR para cada amostra a ser amplificada. O perfil aplicado para reação desse marcador foi dividido em cinco etapas: 1) 94 °C por 3 minutos para desnaturação, 2) 94 °C por 30 segundos para desnaturação, 3) 51 °C por 30 segundos para o anelamento dos primers, 4) 72 °C por 30 segundos para extensão. As etapas 2, 3 e 4 repetiram-se em 35 ciclos terminando com a etapa 5) 72 °C por 10 minutos para extensão final. Os produtos de PCR foram observados em gel de agarose de 1% por eletroforese, posteriormente seguidos de três etapas: 1) purificação através da enzima ExoSAP-IT, 2) reação de sequenciamento e 3) precipitação das amostras, onde foram executadas as etapas de limpeza e remoção de excesso de reagentes que pudessem inibir a leitura da sequência. O sequenciamento ocorreu para ambas as direções (*forward* e *reverse*) em sequenciador ABI Prism 3700, tendo as sequências da região controle do DNA mitocondrial geradas e alinhadas com o algoritmo MUSCLE por meio do programa MEGA v.10 (KUMAR et al., 2018).

O número de *loci* de microssatélites que foram amplificados neste estudo variou entre as espécies avaliadas. Para *C. caretta* foram utilizados quinze *loci* microssatélites: Cc7G11, Cc1F01, Cc1G02, Cc1G03 (SHAMBLIN et al., 2007), CcP7D04, CcP2F11, CcP7C06, CcP8D06, CcP1F09, CcP5C11, CcP1F01, CcP1G03, CcP1B03, CcP5C08 e CcP5H07 (SHAMBLIN et al., 2009). O mix das reações de PCR foi de 12.5 µL, contendo 7.925 µL de ddH₂O, 1.25 µL de buffer [1X], 0.375 µL de MgCl₂ [50mM], 0.25 µL de dNTPs [10mM], 0.2 µL para cada *primer* (*forward* e *reverse*) [10µM], 0.2 µL de marcador fluorescente [10 µM]. Para os *primers* já marcados com as fluorescências, foram utilizadas quantidades diferentes, descritas a seguir: CCP1F01 (0.19 µL); CcP1G03 (0.29 µL); CcP1B03 (0.21 µL); CcP5C08 (0.14 µL); CcP5H07 (0.17 µL), finalizando com 0.125 µL de Taq platinum e 1 µL de DNA (50 ng/µL). A amplificação dos fragmentos dos primers Cc7G11, Cc1F01, Cc1G02, Cc1G03 seguiu o programa adaptado de SCHUELKE (2000), e para os *primers* CcP7D04, CcP2F11, CcP7C06, CcP8D06, CcP1F09, CcP5C11, CcP1F01, CcP1G03, CcP1B03, CcP5C08 e CcP5H07 foi seguido o perfil de SHAMBLIN et al., (2009), adaptado com técnica de touchdown.

Dezoito *loci* microssatélites foram amplificados para *C. mydas* seguindo os perfis específicos: CM3, CM58 (FITZ SIMMONS, 1995), KLK314 (KICHLER et al., 1999), Cc2H12, Cc5H07, Cc7B07, Cc7E11, Cc1G02 (SHAMBLIN et al., 2007), Cc2, Cc28, Cc10 (MONZÓN-ARGUELLO et al., 2008), A6, B103,

B123, C102, D2 (DUTTON & FREY, 2009), CcP7D04, CcP8D06 (SHAMBLIN et al., 2009). Para *D. coriacea* foram utilizados dezenove *loci*, também com seus perfis específicos: C102, D1 (DUTTON & FREY, 2009), LB133, LB157, LB125, LB142, LB158, LB128, LB123 (RODEN & DUTTON, 2011), DERM01, DERM05, DERM06, DERM11, DERM15, DERM32, DERM34, DERM37, DERM39, DERM48 (ALSTAD, 2011).

Os volumes dos reagentes usados para amplificação dos fragmentos por PCR seguiu o mesmo padrão para *C. mydas* e *D. coriacea*: um volume total de 25 µl contendo 19.575 µl de ddH₂O, 2.5 µl de tampão [1X], 1.0 µl de MgCl₂ [50 mM], 0.2 µl de dNTPs [10 mM], 0.2 µl de *reverse primer*, 0.2 µl de *forward primer*, 0.2 µl de *primer* M13 marcado com fluorescências, 0.125 µl Taq platinum [5 u/µL] e 1 µl de DNA [50 ng/µL]. A genotipagem dos indivíduos foi feita em seguida, em uma reação que incluiu produto amplificado dos marcadores microssatélites (multiplexados), formamida e padrão de peso molecular (LIZ®), seguindo as recomendações do fabricante em um sistema de análise de DNA automatizado em sequenciador ABI Prism 3700. Os *loci* microssatélites gerados foram visualizados e identificados com o software GeneMapper 4.1®.

1.1.3 Análise de dados genéticos

As sequências da região controle do DNAm foram alinhadas manualmente no programa MEGA v.10 (KUMAR et al., 2018) usando como referência alinhamentos já publicados para tartarugas-marinhas. A identificação do haplótipo de cada indivíduo sequenciado foi feita no programa DNAsp v6 (ROZAS et al., 2003) comparando as sequências geradas com os haplótipos já publicados para cada uma das espécies analisadas. Foram considerados haplótipos novos as sequências de DNA diferentes das já publicadas, nomeando-as conforme tradicionalmente já vem sendo feito para cada espécie.

Para o presente relatório, os índices de diversidade genética foram avaliados comparando: dados pretéritos ao rompimento da barragem de Fundão (nomeados como Pré); dados coletados após o rompimento nos Anos 1, 2 e 3 de monitoramento (nomeados como Ano 1, Ano 2 e Ano 3); e dados coletados em áreas não impactadas pela onda de rejeitos da barragem nos Anos 1, 2 e 3 (Área-Controle) (Figura 2 B D). Os dados foram analisados seguindo a mesma metodologia conforme detalhado nos relatórios referentes ao Ano 1 e Ano 2 (RRDM 2019, 2020 RT23 - Anexo6 Megafauna).

As análises genéticas foram precedidas pelo agrupamento das sequências em grupos pré (até novembro de 2015) e pós-rompimento da barragem (a partir de novembro de 2015), resumizando-se dados publicados e disponíveis na literatura. Foram estimados os componentes de variância, incluindo as diversidades haplotípica (*H*) e nucleotídica (π), além da Análise de Variância Molecular (AMOVA) por meio do programa Arlequin 3.5.2. (EXCOFFIER & LISCHER, 2015), baseada no F_{ST} com 1000 permutações. As redes de haplótipos foram construídas com cálculos de *Median Joining* no programa PopART (LEIGH & BRYANT, 2015).

Para os marcadores microssatélites, múltiplos parâmetros de diversidade genética foram calculados através do programa GenAlex 6.5 (Peakall & Smouse, 2006) sendo, número de alelos por loco (*N_a*),

heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e), testes de equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). A estimativa de riqueza alélica (A_r) foi calculada usando o pacote PopGenReport para R (ADAMACK e GRUBER, 2014). A identidade individual foi estimada pelo programa COLONY 2.0 (JONES & WANG, 2010), através do método de máxima verossimilhança e o cálculo de probabilidade de identidade (P_I) no programa GenAEx 6.5 (PEAKALL & SMOUSE, 2012). A análise de alelos raros foi realizada através do software HP-Rare (KALINOWSKI, 2005). Já o número populacional efetivo (N_e) foi calculado utilizando o método de Desequilíbrio de Ligação (DL) realizado por meio do programa NeEstimator 2.1 (DO et al., 2014).

Para determinar a existência ou não de mudanças na composição e variação genética bem como avaliar os níveis de estrutura populacional, foram realizadas comparações par-a-par entre as amostras pré e pós rompimento da barragem e entre as áreas impactadas e não-impactadas, para ambos marcadores moleculares (DNAm e *loci* microssatélites). Adicionalmente, utilizando somente os dados de microssatélites, foi realizado um método de agrupamento por meio da Análise Discriminante de Componentes Principais (DAPC) disponível no pacote adegenet 2.1 para R (Jombart 2008), que inferem o número de padrões genéticos (K) utilizando um Critério de Inferência Bayesiana (BIC), bem como estimam proporções de mistura entre as populações/origem geográfica (Jombart et al. 2010) traçando uma probabilidade de agrupamento (0-100%), comparando as áreas e períodos. E, complementarmente, foi realizada uma Análise de Componentes Principais (PCoA) no GenAEx com o intuito de identificar a variação genética dos indivíduos de acordo com suas populações, revelando assim o maior nível de diferenciação entre eles.

1.2 SAÚDE

1.2.1 Procedimentos de amostragem e conservação das amostras de *Chelonia mydas*

Foram realizadas 2 campanhas de captura de juvenis de *C. mydas* na APA Costa das Algas em Santa Cruz, próximo à foz do rio Piraquê-açu, Aracruz, ES e 2 campanhas no Recife de Coroa Vermelha – Ba (Figura 2). Por campanha foram capturados 45 indivíduos em cada área de alimentação, portanto 90 amostras de plasma.

A captura de *Chelonia mydas* juvenis ocorreu por uso de tarrafa ou rede de espera de nylon com malha de 8 cm, 6 metros de largura e 200m de comprimento. A rede de espera foi fixada ao fundo com âncora a uma distância de 30 a 200 metros da praia. Após armada, a rede foi monitorada continuamente para evitar lesões nos animais que eram capturados. O tempo de esforço foi de 4 a 6 horas diárias a depender das condições climáticas e oceanográficas.

Após serem capturadas, foram tomadas medidas biométricas da carapaça com fita métrica flexível, obtendo o comprimento curvilíneo da carapaça (CCC, ponto cranial da linha média da carapaça até o ponto caudal) e largura curvilínea da carapaça (LCC, ponto mais largo da carapaça pela maior distância entre as placas marginais), ambos os dados em centímetros de acordo com a metodologia

utilizada pelo Projeto TAMAR/ICMBio. Também foi obtido o peso dos juvenis de *C. mydas* com uso de dinamômetro digital com capacidade para 50Kg com escala mínima de 0,1g.

Os animais capturados foram identificados em ambas as nadadeiras anteriores com marcas de liga de inonel (modelo 681C, National Band and TagCo.), de acordo com a metodologia utilizada pelo Projeto TAMAR/ICMBio, na qual cada animal recebe uma numeração única.

Amostras sanguíneas foram coletadas por venopunção no Seio Venoso Cervical com agulhas hipodérmicas 25 x 0,7 mm em juvenis e seringas descartáveis, obtendo-se um volume entre 3 e 30 mL de acordo com o tamanho dos animais, respeitando o limite máximo de 0,1% do peso vivo. Imediatamente após a coleta, foi realizado um esfregaço sanguíneo com sangue sem anticoagulante. As amostras foram fracionadas em tubos contendo heparina lítica e próprios para a determinação de elementos traço e acondicionadas em recipiente isotérmico de 4 a 8°C. Ao chegar ao laboratório de campo, 1 ml de sangue total de cada espécime foi destinada a realização do hemograma e o restante foi centrifugado a 5000 RPM durante 10 minutos para obtenção do plasma e armazenadas em alíquotas de 2 mL em criotubos plásticos em nitrogênio líquido. Após envio ao laboratório as amostras foram estocadas em ultra congelador a -80°C até posterior análise bioquímica e extração de contaminantes no plasma sanguíneo.

1.2.2 Procedimentos de amostragem e conservação das amostras de *Caretta caretta* e *Dermochelys coriacea*

O monitoramento de tartarugas-marinhas em área de reprodução foi realizado na Foz do Rio Doce, em Linhares (ES) e a área controle foi a Arembepe (BA). A temporada reprodutiva se estende de setembro a abril, porém as campanhas de coleta de sangue das fêmeas foram feitas de outubro a dezembro. As coletas de sangue e ovos foram à noite durante a temporada reprodutiva em dias alternados. A coleta de ovos e filhotes natimortos foi feita diariamente, pela manhã de novembro a janeiro.

As praias foram monitoradas com veículo com tração 4x4 das 20 às 4h em busca de fêmeas de *Caretta caretta* e *Dermochelys coriacea* em desova. Após a fêmea ter colocado metade dos ovos no ninho, foram tomadas medidas biométricas da carapaça com fita métrica flexível, obtendo o comprimento curvilíneo da carapaça (CCC, ponto cranial da linha média da carapaça até o ponto caudal) e largura curvilínea da carapaça (LCC, medida do ponto mais largo da carapaça pela maior distância entre as placas marginais), ambos os dados em centímetros de acordo com a metodologia utilizada pelo Projeto TAMAR/ICMBio.

Os animais foram identificados em ambas as nadadeiras anteriores com marcas de liga de Inonel (modelo 681C, National Band and TagCo.), de acordo com a metodologia utilizada pelo Projeto TAMAR/ICMBio, na qual cada animal recebe uma numeração única.

Os ovos foram coletados no momento da desova (sendo 3 por ninho de *C. caretta*, totalizando 90, e até 45 ovos de *D. coriacea*) sem contato com o solo e armazenados congelados a -80°C em sacolas

plásticas. O ninho foi georreferenciado e monitorado para que ovos não eclodidos e filhotes natimortos (aproximadamente 3 por ninho) fossem coletados após a eclosão e armazenados congelados em sacolas plásticas a -80°C . O monitoramento dos ninhos e coleta de filhotes natimortos foi realizado em conjunto com a equipe do Projeto TAMAR que também obteve os dados reprodutivos.

Foram coletadas amostras de sangue de 60 *Caretta caretta* ao longo da temporada reprodutiva em Linhares e em Arembepe. Não foram coletadas amostras sanguíneas de *D. coriacea* devido à dificuldade de obtenção e o estresse excessivo dos animais. Amostras sanguíneas foram coletadas por venopunção no Seio Venoso Cervical com agulhas hipodérmicas 40 x 1,2 mm e seringas descartáveis, obtendo-se um volume de 10 mL, respeitando o limite máximo de 0,1% do peso vivo. Imediatamente após a coleta, foi realizado um esfregaço sanguíneo sem anticoagulante. As amostras foram fracionadas em tubos contendo heparina lítica e próprios para análises de elementos traço e acondicionadas em recipiente isotérmico de 4 a 8°C . Ao chegar ao laboratório de campo, 1 mL de sangue total de cada espécime foi destinado para a realização do hemograma e o restante foi centrifugado a 5000 RPM durante 10 minutos para obtenção do plasma e armazenadas em alíquotas de 2 mL em criotubos plásticos em nitrogênio líquido. Após envio ao laboratório as amostras foram estocadas em ultra congelador a -80°C até posterior análise bioquímica e de contaminantes. Os ovos e os filhotes foram homogeneizados em “pools” de 3 ovos ou filhotes por ninho totalizando assim 30 amostras de pool de ovos e 30 de filhotes de *C. caretta* e 15 de *D. coriacea*.

1.2.3 Hemograma

Os hemogramas foram realizados sempre em um intervalo inferior a 6 horas após a coleta da amostra sanguínea. A determinação do hematócrito (HTC) foi realizada por microcentrifugação a 11.000 rpm em centrífuga para hematócrito e em seguida feita a leitura em escala própria. A contagem total de eritrócitos (He), leucócitos (L) e trombócitos foi realizada na câmara de Neubauer com diluição de 1:100 em solução de Natt e Herrick. A dosagem de hemoglobina (Hb) foi feita pelo método de cianometahemoglobina após a centrifugação da reação para remoção dos lisados celulares, reagindo 10 μL de sangue total com 2,5 mL do reagente em cubetas quadradas de 10 mm em espectrofotômetro, com filtro de 540nm. A partir dos valores de hematócrito, hemoglobina e hemácias foi realizado o cálculo para determinação do volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). A contagem diferencial dos leucócitos foi feita após a fixação do esfregaço sanguíneo em álcool metílico e coloração pelo método Panótico Rápido®. Foram contadas 100 células para diferenciação leucocitária.

1.2.4 Parâmetros bioquímicos

Foi analisado um perfil bioquímico plasmático de 18 parâmetros dos animais capturados: glicose, colesterol, triglicerídeos, proteínas totais, albumina, globulinas, uréia, ácido úrico, cálcio, fósforo, ferro, magnésio, sódio, potássio, aspartatoaminotransferase, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, creatinofosfoquinase. As análises foram realizadas no sistema automatizado

BeckmanCoulter AU2700, utilizando os kits próprios e de acordo com as recomendações do fabricante.

1.2.5 Contaminantes

A extração dos contaminantes do plasma foi feita por um protocolo líquido-líquido por centrifugação usando ciclohexano grau HPLC como solvente e cisheptaclorepóxido a 1 ppm como padrão interno. O sobrenadante foi filtrado a 0,2 µm e evaporado em corrente de nitrogênio e resuspendido a 0,4 ml em ciclohexano.

A dosagem de elementos traço foi realizada por Espectrometria de Emissão com Plasma Indutivamente Acoplado – ICP/EOS ou equivalente disponível na RRDM após digestão com ácido nítrico e peróxido de hidrogênio a quente.

1.2.6 Análises estatísticas

Os valores bioquímicos, hematológicos e de contaminantes foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro Wilks. Grupos de dados com distribuição normal foram comparados (por exemplo local, temporada reprodutiva) por ANOVA (soma dos quadrados tipo IV) com teste de Games-Howell *post-hoc*, ou por ANOVA não paramétrica com teste de Mann-Whitney *post-hoc* se não forem normais. Correlações de Spearman foram utilizadas para verificar se há correlação entre parâmetros bioquímicos e as concentrações de contaminantes. Os níveis de contaminantes foram comparados entre tartarugas na primeira desova e as posteriores por anova de medidas repetidas. A avaliação do sucesso de eclosão com os contaminantes nos ovos, filhotes e tartarugas foi avaliada por modelo linear generalizado. Todas as análises estatísticas foram feitas com significância de <0,05 usando o pacote IBM SPSS 17.0.