

**INSTITUTO FEDERAL GOIANO, CAMPUS URUTAÍ - GO
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**TOXICIDADE DE BIOMARCADORES COMPORTAMENTAIS E MUTAGÊNICOS
EM JUVENIS DE *Podocnemis expansa* (SCHWEIGGER, 1812) EXPOSTOS À
EFLUENTE DE CURTUME**

Estudante: Julya Emmanuela de Andrade Vieira

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Malafaia

**Urutaí, GO
Março de 2021**

JULYA EMMANUELA DE ANDRADE VIEIRA

TOXICIDADE COMPORTAMENTAL E MUTAGÊNICA EM JUVENIS DE *Podocnemis expansa* (SCHWEIGGER, 1812) EXPOSTOS À EFLUENTE DE CURTUME

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Licenciatura em Ciências Biológicas do Instituto Federal Goiano - Campus Urutaí como parte dos requisitos para conclusão do curso de graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas sob orientação do Prof. Dr. Guilherme Malafaia.

**Urutaí, GO
Março de 2021**

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

V658t Vieira, Julya Emmanuela de Andrade
TOXICIDADE COMPORTAMENTAL E MUTAGÊNICA EM JUVENIS
DE *Podocnemis expansa* (SCHWEIGGER, 1812) EXPOSTOS À
EFLUENTE DE CURTUME / Julya Emmanuela de Andrade
Vieira; orientador Guilherme Malafaia. -- Urutaí,
2021.
36 p.

Monografia (Graduação em Licenciatura em Ciências
Biológicas) -- Instituto Federal Goiano, Campus
Urutaí, 2021.

1. Quelônios. 2. Meio ambiente. 3. Poluição
aquática. 4. Ecotoxicologia. 5. Efluentes
agroindustriais. I. Malafaia, Guilherme, orient. II.
Título.

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610/98, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, a disponibilizar gratuitamente o documento no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, em formato digital para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

Identificação da Produção Técnico-Científica

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Tese | <input type="checkbox"/> Artigo Científico |
| <input type="checkbox"/> Dissertação | <input type="checkbox"/> Capítulo de Livro |
| <input type="checkbox"/> Monografia – Especialização | <input type="checkbox"/> Livro |
| <input checked="" type="checkbox"/> TCC - Graduação | <input type="checkbox"/> Trabalho Apresentado em Evento |
| <input type="checkbox"/> Produto Técnico e Educacional - Tipo: _____ | |

Nome Completo do Autor: Julya Emmanuela de Andrade Vieira

Matrícula: 2017101220530036

Título do Trabalho: TOXICIDADE COMPORTAMENTAL E MUTAGÊNICA EM JUVENIS DE *Podocnemis expansa* (SCHWEIGGER, 1812) EXPOSTOS À EFLUENTE DE CURTUME

Restrições de Acesso ao Documento

Documento confidencial: Não Sim, justifique: _____

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: 19/03/21

O documento está sujeito a registro de patente? Sim Não

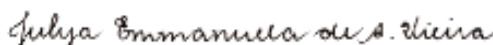
O documento pode vir a ser publicado como livro? Sim Não

DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA


O/A referido/a autor/a declara que:

- o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
- obteve autorização de quaisquer materiais incluídos no documento do qual não detém os direitos de autor/a, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
- cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Urutaí, 19 de março de 2021.


Assinatura do Autor e/ou Detentor dos Direitos Autorais

Ciente e de acordo:



Assinatura do(a) orientador(a)

ATA DE APRESENTAÇÃO DE TRABALHO DE CURSO

Às 9h do dia 18 de março de 2021, reuniu-se por vídeo conferência a Banca Examinadora do Trabalho de Curso intitulado “TOXICIDADE COMPORTAMENTAL E MUTAGÊNICA EM JUVENIS DE *Podocnemis expansa* (SCHWEIGGER, 1812) EXPOSTOS À EFLUENTE DE CURTUME” composta pelos professores

1. Prof. Dr. Guilherme Malafaia
2. Prof. Dr. Thiago Lopes Rocha
3. Prof. Dr. Ives Charlie-Silva

para a sessão de defesa pública do citado trabalho, requisito parcial para a obtenção do Grau de Licenciado em Ciências Biológicas. O Presidente da Banca Examinadora, Prof. Dr. Guilherme Malafaia, passou a palavra a licencianda “Julya Emmanuela de Andrade Vieira” para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos membros da Banca Examinadora e respectiva defesa da licencianda. Logo após, a Banca Examinadora se reuniu, sem a presença do(a) licenciado(a) e do público, para expedição do resultado final. A Banca Examinadora considerou que a discente foi APROVADA por unanimidade, tendo sido atribuído a nota 10,0 ao seu trabalho. O resultado foi então comunicado publicamente à licencianda pelo Presidente da Banca Examinadora. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Banca Examinadora deu por encerrada a defesa, às 11h45min.

Assinatura dos membros da Banca Examinadora	Notas
	10,0
<i>Thiago Lopes Rocha</i>	10,0
<i>Ives charlie da silva</i>	10,0
Média final:	10,0

Urutaí-GO, 18 de março de 2021.

AGRADECIMENTOS

Nessa seção, gostaria de registrar uma série de agradecimentos às pessoas especiais que marcaram minha vida acadêmica.

Inicialmente, agradeço à toda a minha família, sendo minha mãe Patrícia Gomes, minha avó Tarcília Gomes Pereira, meu avô Benedito Isidro, meu padrasto Oscar Moros, meu tio Rogério Gomes, meu irmão Nycollas Gomes e meu primo Jacob Gomes, os quais foram minha fonte de inspiração e meu arcabouço para que eu suportasse momentos difíceis e chegasse até aqui.

Agradeço também ao meu primeiro orientador, prof. Dr. Daniel Paiva, quem foi o primeiro a acreditar no meu potencial como cientista, dando-me a oportunidade de virar bolsista logo na segunda semana da graduação.

Imensamente, agradeço ao meu orientador, prof. Dr. Guilherme Malafaia, não apenas pela orientação e pela oportunidade de conquistar e descobrir tanto dentro da comunidade científica, como também pelos momentos de desabafo e risadas que corroboraram para a construção da “atual Julya”. A ele, minha eterna gratidão por tudo.

Na oportunidade, agradeço também à prof^{za}. Dra. Aline Sueli de Lima Rodrigues, pelas palavras sempre doces e carinhosas que me ajudaram em todas as vezes em que eu precisei.

Agradeço com coração aberto a todos os meus companheiros de laboratório, em especial à Fernanda Neves, que me acompanhou desde o meu ingresso no curso superior e se tornou, sabiamente, uma grande amiga e conselheira.

Agradeço também à Lainara Cristina e à Thalia Barbosa, que foram pessoas que eu conheci durante a graduação e sempre foram companheiras em todos os momentos: riram e choraram comigo, alegraram-se com minhas vitórias e passaram juntos comigo por todas as minhas lutas. Convictamente, afirmo que foram amigas para todas as horas e eu as amo muito.

Ao meu melhor amigo Matheus Augusto, que não me deixou enfraquecer em muitas situações difíceis e me apoia dentro e fora da faculdade, o que o torna único e especial na minha vida.

Agradeço ao meu amigo Marcos Vinícius Souza, que me trata com carinho e respeito e enaltece minhas conquistas acadêmicas como ninguém, me incentivando a sempre estudar e seguir meus sonhos.

E o agradecimento mais importante é para Deus. Agradeço à Ele por toda inteligência, sabedoria, paciência, misericórdia e amor para comigo. Obrigada por cuidar de cada detalhe, Papai. A ti, toda honra e glória.

Eu temo pela minha espécie quando penso que Deus é justo.
Thomas Jefferson

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Desenho esquemático do aquário utilizado no teste de natação.....	18
Figura 2- Delta da biomassa dos animais, considerando o início e fim do período de exposição.	24
Figura 3- (A) Frequência de tentativas de endireitamento; (B) Latência para endireitamento; (C) Total de Tentativas de endireitamento; (D) Índice de Respiração E; (E) Total de cruzamentos percorridos por <i>P. expansa</i>	26
Figura 4- Total de anormalidades nucleares evidenciadas em <i>P. expansa</i> expostas ou não ao efluente de curtume	28
Figura 5- Frequência de: (A) células tipo broto; (B) células tipo chanfro; (C) núcleo deslocado; (D) células anucleadas; (E) células multilobuladas e; (F) micronúcleos	28
Figura 6- Concentração de: (A) cromo; (B) cálcio; (C) magnésio; (D) zinco e; (E) ferro presentes nos fragmentos de fígados de <i>P. expansa</i> expostas ou não ao efluente de curtume.	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados da análise química e microbiológica da água, do efluente de curtume e de suas respectivas diluições (concentrações).....	22
Tabela 2- Informação geral da análise de componentes orgânicos do EC 100%.....	23

SUMÁRIO

1. Introdução.....	10
2. Material e métodos	12
2.1. Animais e delineamento experimental.....	12
2.2. Determinação das diluições do efluente de curtume	13
2.3. Caracterização físico-química do efluente de curtume	14
2.4. Biomarcadores	14
2.4.1. Testes comportamentais	14
2.4.1.1 Capacidade natatória.....	14
2.4.1.2 Endireitamento	15
2.4.2. Análise de mutagenicidade	15
2.4.3. Quantificação de metais pesados.....	16
2.5. Análises estatísticas	17
3. Resultados e Discussão	17
4. Conclusão	28
5. Conflitos de interesse e questões éticas	29
6. Referências	29

TOXICIDADE COMPORTAMENTAL E MUTAGÊNICA EM JUVENIS DE *Podocnemis expansa* (SCHWEIGGER, 1812) EXPOSTOS À EFLUENTE DE CURTUME

Resumo

O vasto ritmo de crescimento populacional e aumento na demanda por bens de consumo contribuem significativamente para a redução da biodiversidade. Um exemplo disso são as indústrias de curtume, as quais apresentam grande impacto econômico, uma vez que é responsável pela criação de emprego e geração de renda em diversos países. Entretanto, sabe-se que o efluente de curtume (EC) gera grandes quantidades de resíduos potencialmente tóxicos ao ambiente. Visto isso, objetivamos avaliar se a exposição de juvenis de *Podocnemis expansa* ao EC poderia ocasionar alterações comportamentais, mutagênicas e promover captação de Zn, Ca, Mg, Fe e Cr no fígado desses animais. Para isso, quatro grupos experimentais foram estabelecidos: controle, EC (1,4%), EC 3,1(%) e EC (6,5%). Os animais foram expostos por 21 dias. Tartarugas expostas ao EC, em todos os grupos experimentais, apresentaram alterações comportamentais, tais como déficits natatórios e respiratórios, e dificuldade de endireitamento. Não observamos efeito diluição-resposta. Além disso, a partir do teste do micronúcleo e análise das alterações nucleares eritrocíticas, evidenciamos o aparecimento de diversas anormalidades eritrocitárias, tais como micronúcleo, núcleos *notcheds* e eritrócitos anucleados, que apareceram em maior frequência em animais dos grupos que foram expostos ao EC. Ainda, observamos que a acumulação de zinco, cálcio, ferro, magnésio e cromo nos fígados dos animais expostos ao EC. Portanto, nosso estudo fornece evidências pioneiras de que a exposição de juvenis de *P. expansa* ao EC induz efeitos comportamentais e mutagênicos nesses animais.

Palavras-chave: Quelônios; meio ambiente; poluição aquática; ecotoxicologia; efluentes agroindustriais.

**BEHAVIORAL AND MUTAGENIC TOXICITY IN *Podocnemis expansa*
(SCHWEIGGER, 1812) JUVENILES EXPOSED TO TANNERY EFFLUENT**

Abstract

The rapid population growth and the increase in demand for consumer goods contribute significantly to biodiversity contempt. An example of this is the tanneries business, which have a great economic impact, being responsible for job offers and income generation in several countries. However, it is known that tannery effluent (TE) generates large amounts of waste, potentially toxic, to the environment. Therefore, we aim to evaluate the behavioral, mutagenic effects, and possible uptake of Zn, Ca, Mg, Fe, and Cr in juveniles of *Podocnemis expansa* turtles. For this, four experimental groups were established: control, TE (1.4%), TE 3.1 (%), and TE (6.5%). The animals were exposed for 21 days. Turtles exposed to the tannery wastewater, in all experimental groups, had swimming and respiratory deficits, and difficulty in straightening. We did not observe a dilution-response effect. In addition, from the micronucleus analysis, we found the appearance of several erythrocyte abnormalities, such as micronucleus, notched nuclei, and non-nucleated erythrocytes, which appeared more frequently in animals exposed to the wastewater dilution experimental groups. Besides, we observed that animals exposed to the tannery wastewater accumulated zinc, calcium, iron, magnesium, and chromium in their livers. Therefore, our study provides pioneering evidence that the exposure of *P. expansa* juveniles to TE induces behavioral and mutagenic effects in these animals.

Keywords: Chelonian; environment; water pollution; ecotoxicology; agribusiness effluents.

1. INTRODUÇÃO

O vasto ritmo de crescimento populacional e aumento na demanda por diferentes bens de consumo têm contribuído significativamente para a redução da diversidade biológica (Crist. et al., 2017). Tal crescimento aumentou diretamente a produção industrial, que vem gerando grandes quantidades de resíduos, os quais são descartados diligentemente no meio ambiente (Segura et al., 2009). Um exemplo disso são as indústrias de curtume. Esse setor possui alto impacto econômico, uma vez que é responsável pela criação de emprego e geração de renda em diversos países do mundo, tais como Brasil, China e Paquistão (China & Ndaró, 2015; Sabumon, 2016). Em contrapartida, o processamento da pele bovina gera grandes quantidades de resíduos potencialmente tóxicos (Souza et al., 2016), os quais são descartados (em 1 milhão de ton/ano), em muitos casos, diretamente no ambiente no ambiente (Brazilian Leather 2018).

As leis de fiscalização das indústrias de curtume são pouco aplicadas, o que implica em um descarte desenfreado de efluentes não tratados em diferentes locais (Islam et al., 2011). Assim, a descarga de efluente de curtume em cursos d'água permanece um sério problema ambiental. Com isso, diversos trabalhos vêm relatando os efeitos em diversos modelos animais que são expostos a esse poluente. Guimarães et al. (2016) demonstraram efeitos semelhantes à ansiedade em filhotes de camundongos Swiss machos. Além disso, alterações neurocomportamentais, genotóxicas, citotóxicas, reprodutivas e mutagênicas já foram evidenciadas em peixes, girinos, algas e mamíferos (Tagliari et al., 2004; Tigini et al., 2011; Almeida et al., 2016; Silva et al., 2016; Montalvão et al., 2017; Vajpai et al., 2020), demonstrando a toxicidade desse poluente em diferentes níveis de exposição.

Contudo, vale ressaltar a carência de estudos toxicológicos envolvendo répteis. Existem declínios nas populações de répteis aquáticos que habitam áreas poluídas, cujos fatores da redução populacional estão intimamente relacionados às ações antrópicas que incluem principalmente o descarte de materiais altamente tóxicos no ambiente (Gibbons et al., 2000). Além disso, são notórias as dificuldades em se utilizar répteis em ambientes de laboratório para

uso em estudos ecotoxicológicos e avaliações de risco, haja visto as restrições de manutenção desse grupo animal em laboratórios de pesquisa, tanto financeiras, quanto em manejo e manipulação por profissionais experientes e capacitados para tal finalidade (Talent et al., 2009), o que justifica ainda mais a ausência de estudos com esses animais. Com isso, avaliar os riscos ecológicos e toxicológicos de répteis torna-se inquestionável devido à falta de informações de toxicidade disponíveis, principalmente quando o efeito dos poluentes é pouco compreendido (Weir et al., 2015).

A espécie *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) é um quelônio de água doce da família Podocnemididae que ocorre na Colômbia, Venezuela, Guianas, Brasil, Peru, Equador e Bolívia (Vogt et al., 2015). Trata-se de um cágado, embora seja popularmente conhecida como uma tartaruga, cujas fêmeas são maiores que os machos e a nidação ocorre uma única vez em temporadas reprodutivas (Rueda-Almonacid et al., 2007). Esses animais são de extrema relevância em seus habitats, uma vez que a redução de suas populações pode alterar a rede trófica dos rios, impactando o ciclo de nutrientes e alterando a qualidade da água (Lara et al., 2012). Além disso, esses animais estão fortemente sujeitos à exposição à diferentes poluentes onde vivem, seja pelo contato dérmico ou pela via de exposição oral, ao ingerirem a água contaminada (Eggins et al., 2015).

Ainda, pode-se mencionar que o Rio Amazonas é fortemente impactado por poluição advinda de mercúrio e aerossóis (Roulet et al., 2000; Cox & Hutingford, 2008) e até mesmo pelo próprio efluente de curtume, no qual ocorre a captação de cromo nos sedimentos do fundo do rio, que são lixiviados para outras áreas não poluídas (Souza et al., 2019). O Rio Amazonas é lotado em seus arredores de empresas de curtume que frequentemente, lançam seus efluentes sob o leito do rio (Guia Técnico Ambiental de Curtumes, 2015), o que suscita ainda mais preocupação ambiental e torna necessário o desenvolvimento de estudos que venham a conservar a biodiversidade dependente dessa região.

Existem estudos que documentem os efeitos comportamentais de diversos poluentes em animais do gênero *Podocnemis* sp. e outros quelônios. Testes de locomoção, alimentação, memória e endireitamento já foram realizados utilizando poluentes diversificados, tais como (Miller et al., 2020; Neuman-Lee & Janzen, 2011; Burger, 1998; Davis & Burghardt, 2007). No entanto, esses estudos não levam em consideração concentrações ambientais dos poluentes, o que distancia seus delineamentos a uma condição realista de poluição ambiental.

Nesse sentido, objetivamos avaliar os efeitos comportamentais e mutagênicos de juvenis de *P. expansa* expostas à efluente de curtume, em diluições ambientalmente relevantes. Sabendo-se que parâmetros hematológicos e de comportamento são bons biomarcadores de saúde em répteis (Stacy et al., 2011), pressupomos que esse efluente induz a formação de anormalidades eritrocitárias e altera o comportamento natatório e de endireitamento dos animais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais e delineamento experimental

Ao todo, utilizamos 48 juvenis de *P. expansa*, provenientes de uma área de reprodução monitorada pelo Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis, administrado pelo Ministério do Meio Ambiente. Os animais foram capturados e, consecutivamente, levados ao Laboratório de Pesquisas Biológicas do IF Goiano (município de Urutaí, Goiás, Brasil). Em seguida, foram colocados em aquários com temperatura controlada ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e 12h de ciclo claro/escuro. Os filhotes permaneceram em aquário por 18 semanas para aclimação e, logo após, foram utilizados no experimento.

Nesse caso, os animais (com biomassa e tamanho igualitários) foram distribuídos em quatro grupos experimentais (n=12 tartarugas/grupo). Os animais do grupo controle foram mantidos em aquários de 41 cm de comprimento x 34 cm de largura x 17.5 cm de altura contendo apenas água desclorada, isenta de poluentes. Já os demais grupos foram expostos à efluente de curtume (fornecidos por uma empresa de processamento de couro localizada em Inhumas-GO)

diluído em 2L nas seguintes proporções: 1,4% (grupo EC 1,4), 3,1% (grupo EC 3,1) e 6,5% (grupo EC 6,5). Os animais foram mantidos em sistema de troca de água semi-estático, com trocas a cada 48h. Durante as trocas, os animais ficavam expostos ao Sol para auxiliar o controle de temperatura corporal das mesmas. A alimentação dos animais foi fornecida *ad libitum*, na qual a ração era colocada na água três vezes ao dia e os modelos experimentais ficaram expostos por 21 dias consecutivos (exposição aguda).

2.2. Determinação das diluições do efluente de curtume

Para definir as concentrações de diluições do efluente de curtume no qual os animais foram expostos, levamos em consideração o sistema de operação e a quantidade de couro processado diariamente pela indústria, os quais podem estar sendo descartados incorretamente no ambiente natural. Para determinar a taxa de geração de águas residuais, adotamos o horário de trabalho diário de 8 h e uma taxa média de processamento de 1 tonelada de pele/dia (dados fornecidos pela empresa). Esse valor gerou aproximadamente 32 m³ de efluente, conforme Pacheco (2005). Assim, a vazão de efluente considerada para efetuarmos as diluições em nosso trabalho foi de 4 m³/h.

Para o cálculo de diluição, utilizamos a equação contida na Resolução n° 230, de 2011 do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA, Brasil, onde: $DERB = [EO/(EO + EW)]$), onde “DERB” refere-se à diluição do efluente no corpo d’água receptor (taxa de diluição); “EO” à saída do efluente e “EW” para a saída do curso de água. Considerando o fluxo constante de efluente durante todo o ano (4 m³/h), o fluxo do curso de água nos meses mais chuvosos (dezembro, janeiro, fevereiro e março) (274,37 m³/h) e os meses mais secos (julho, agosto, setembro e outubro) (57,51 m³/h), os valores 0,014 (1,4%) e 0,065 (6,5%), respectivamente, foram derivados. Assim, a diluição de 0,031 (ou 3,1%) foi obtida a partir da mediana das vazões mensais registradas ao longo do ano (121,1 m³/h).

2.3. Caracterização físico-química do efluente de curtume

A caracterização do efluente de curtume foi realizada em conformidade com os padrões da *American Public Health Association* (APHA, 1997). Além disso, foi realizada a análise de coliformes totais na água, segundo procedimentos metodológicos da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) (Brasil, 2006). Já a análise dos compostos orgânicos foi realizada por meio da técnica de espectrometria de massas com ionização por *eletrospray*, conforme metodologia descrita em Guimarães et al. (2016).

2.4. Biomarcadores de toxicidade

A toxicidade do efluente de curtume foi avaliada por meio de biomarcadores comportamentais, mutagênicos e de captação dos poluentes. Na análise comportamental, investigamos o potencial do efluente em ocasionar problemas natatórios nos animais, dificuldade em respirar, bem como déficit no endireitamento e alterações na capacidade de interações sociais. Todos os testes foram realizados em uma sala com isolamento acústico, contendo câmeras infravermelho acopladas a um computador externo, onde os vídeos eram armazenados para posteriormente serem analisados.

2.4.1. Testes comportamentais

2.4.1.1. Capacidade natatória

No 20º dia de exposição, os efeitos dos tratamentos sobre a capacidade de natação de *P. expansa* foram avaliados. Para isso, utilizamos um aquário que continha 4 L de água (dimensões: 19,5 cm de comprimento x 14 cm de largura x 20 cm de altura), dividido em 9 quadrantes de 6,3 cm de comprimento x 6,7 cm de altura (Fig. 1). Folhas de papel cartão amarelas revestidas com plástico impermeável revestiram as paredes dos aquários para diminuir a influência do meio

externo sobre o comportamento do animal. A escolha da cor do papel cartão refere-se ao fato de que cores escuras de papeis poderiam dificultar a visibilidade do animal no momento da análise. A água do aquário no momento dos testes continha as diluições correspondentes à cada tratamento, sendo trocada entre um animal e o próximo. Após ser colocado no centro do aparato, cada animal foi filmado por 30 minutos ininterruptos. Foram avaliados o total de cruzamentos dos quadrantes e o tempo total gasto para percorrer os quadrantes. Os vídeos comportamentais foram analisados com o auxílio do software PlusMZ.

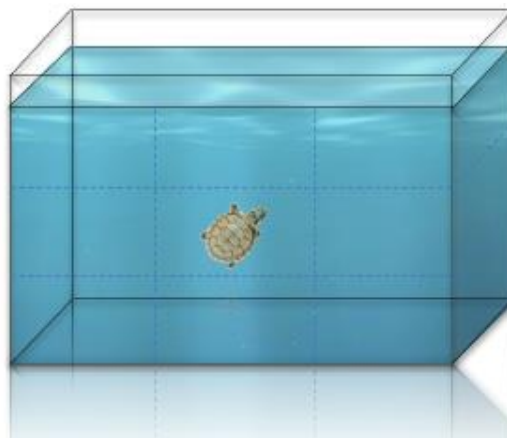


Figura 1- Desenho esquemático do aquário utilizado no teste de natação.

2.4.1.2. Endireitamento

Esse teste avaliou se a exposição ao efluente de curtume poderia minimizar ou alterar o comportamento inato de endireitamento das tartarugas, bem como simular um ataque predatório ocasionado por ave, caracterizado por Joanna Burger (1998). Para tal, utilizamos um recipiente plástico (dimensões: 28 cm de comprimento x 17 cm de largura x 12,5 cm de altura) que continha areia média autoclavada e peneirada (simulando a areia da praia), a qual serviu de substrato para que o animal pudesse realizar as tentativas de endireitamento. Cada tartaruga foi solta de forma retilínea sob o centro da caixa a uma altura de 15 cm, com a região ventral voltada para cima. Foram avaliadas a latência para endireitamento, tentativas de endireitamento e o tempo gasto nas tentativas. Todos os vídeos comportamentais também foram analisados com o auxílio do software PlusMZ.

2.4.2. Análise mutagênica

O ensaio de micronúcleo foi realizado para averiguar se o efluente de curtume poderia ocasionar danos mutagênicos em eritrócitos circulantes periféricos, o qual foi conduzido baseado na metodologia de Zapata et al. (2016). Para isso, além dos grupos experimentais definidos, adicionamos um grupo controle positivo (n= 6 animais), que ficaram expostos pelo mesmo tempo em que os animais expostos ao efluente de curtume, no qual os animais foram expostos à ciclofosfamida (5×10^{-4} µg/L), conforme também utilizado por Mesak et al., (2019). A eutanásia dos animais ocorreu conforme os critérios estabelecidos pela *American Society of Ichthyologists and Herpetologists* (ASIH 2004). Posteriormente, foram coletados aproximadamente 20 µL de sangue por animal e colocados em lâminas para esfregaço sanguíneo. As lâminas foram fixadas em metanol (100% (v/v)) por 5 min e, posteriormente, coradas com Panótico Rápido® (New Prov). A contabilidade dos eritrócitos foi feita em microscópio óptico Nikon Eclipse E100 com lentes em imersão, conforme procedimentos adotados por Montalvão et al. (2017). Foram contabilizados 2000 eritrócitos por lâmina (n=12 lâminas/grupo, uma lâmina por animal) e apenas eritrócitos que não sobrepunham outras células e que estavam com a membrana nuclear sem danos. A análise das lâminas foi feita aleatoriamente e a cegas, por um único observador previamente treinado. No final, foram registradas as frequências de micronúcleo e de outras anormalidades nucleares/eritrocitárias evidenciadas.

2.4.3. Quantificação de metais pesados

Com a finalidade de avaliar se os constituintes do poluente foram captados no fígado das tartarugas, realizamos as quantificações de cromo (Cr), zinco (Zn), ferro (Fe), magnésio (Mg) e cálcio (Ca). Inicialmente, o órgão teve sua biomassa determinada para padronizar o peso de todas as amostras (500 mg) e, sequencialmente, os fragmentos foram submetidos à digestão química. Zinco, ferro, magnésio e cálcio foram submetidos à digestão ácida através de uma solução de

ácido perclórico (70% HClO_4 : 75% ácido nítrico (HNO_3), na qual as amostras foram levadas à chapa de aquecimento a 100°C , até que as amostras fossem totalmente digeridas. Subsequentemente, foram inseridos 5 mL de HNO_3 para dissolver os resíduos da amostra e completar o volume final para 5%. Cromo foi digerido em meio alcalino, em solução 0,28 M Na_2CO_3 e 0,5 M de NaOH (proporção de 1:1). As amostras da quantificação de cromo foram levadas à chapa de aquecimento à 90°C e depois de ter todo o conteúdo dos frascos evaporados, foi adicionado 20 mL de água purificada e aproximadamente 2 mL de H_2SO_4 foi adicionado para corrigir o pH das amostras. As soluções foram analisadas através de ICP-MS.

2.5. Análises estatísticas

Inicialmente, todos os dados obtidos foram submetidos aos testes de normalidade de Shapiro-Wilk, bem como aos testes de Levene e Bartlett, para avaliação da igualdade de variância residual. Os dados que apresentaram distribuição normal foram submetidos à análise de variância simples (one-way ANOVA), com pós-teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Os dados não-paramétricos foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis, a 5% de probabilidade. As múltiplas comparações foram realizadas através do pós-teste de Dunn's, ao nível de 5% de probabilidade, em caso de resultados significativos.

Testes par a par foram analisados através do teste t de Student (para comparar os dados paramétricos) e o teste de Mann-Whitney foi aplicado aos não paramétricos. Todos os ensaios foram gravados em vídeo e posteriormente analisados por um observador treinado, a cegas. Todas as análises e elaborações gráficas foram realizadas no software GraphPad Prism (versão 7.0).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados da quantificação de elementos orgânicos e inorgânicos sugere que a toxicidade do efluente de curtume tenha relação entre a captação de seus poluentes e os efeitos observados.

A análise inorgânica do EC bruto e suas diluições na água os quais os animais foram expostos, apresentaram alta concentração de elementos químicos cuja toxicidade já é conhecida, como Ba, Pb, Cu, Hg, Ni, As, Cr e Ag, porém, sem a presença de coliformes totais (Tabela 1). Além disso, a análise de compostos orgânicos evidenciou a presença de estruturas moleculares complexas pouco identificadas em análises rotineiras, bem como a presença de hidrocarbonetos aromáticos e policíclicos (Tabela 2), o que confirma o potencial toxicológico desse poluente.

Tabela 1. Resultados das análises químicas inorgânicas e microbiológica da água, do efluente de curtume e de suas respectivas diluições.

Elementos químicos	Água	EC (100%)	EC (1,4%)	EC (3,1%)	EC (6,5%)
Al (mg/L)	0,2	2,9	0,23	2,87	2,90
Cl (mg/L)	4,99	9147	96,41	919,19	2290,49
Ba (mg/L)	0,1	2,4	0,12	0,33	0,68
Cd (mg/L)	<0,0005	1,8	0,02	0,18	0,45
Pb (mg/L)	<0,01	0,6	0,02	0,07	0,16
Cu (mg/L)	<0,001	2,4	0,02	0,24	0,60
Hg(mg/L)	<0,0001	0,0009	0,00	0,00	0,00
Ni (mg/L)	0,02	1,8	0,04	0,20	0,47
Mg (mg/L)	160,32	184,00	158,90	146,13	124,84
Na (mg/L)	5,9	158	7,42	21,11	43,93
Zn (mg/L)	2,5	16,4	2,64	3,89	5,98
As (mg/L)	0,005	1,4	0,02	0,14	0,35
Cr (mg/L)	<0,01	479	4,80	47,91	119,76
Sn (mg/L)	<0,01	7,200	0,08	0,73	1,81
Ag (mg/L)	<0,01	0,400	0,01	0,05	0,11
Si (mg/L)	0,2	2,900	0,23	0,47	0,88
Análise microbiológica					
Coliformes totais (UFC/mL)	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

Legenda: EC: efluente de curtume. EC/água: relação entre as concentrações de água com aquelas identificadas no efluente de curtume. Os valores são expressos como o número de vezes em que as concentrações dos elementos químicos do EC são maiores do que aquelas identificadas na água. (*): indica um valor estimado, pois considerou-se como concentrações dos respectivos elementos químicos os limites de quantificação da técnica analítica utilizada no presente estudo. Logo, a relação EC/água pode ser ainda maior.

Tabela 1- Informações gerais da análise de componentes orgânicos do efluente de curtume bruto.

ESI (+)				
<i>m/z</i>	Error (ppm) ^b	RDB ^c	Fórmula Molecular	Nome
157.0832	4.64	3.5	C ₄ H ₈ N ₆ O	1,1-Dimethyl-3-(2H-tetrazol-5-yl)urea
236.1070	8.3	10.5	C ₁₆ H ₁₃ NO	Methyl-2-phenyl -3-formylindole
304.2999	9.4	3.5	C ₂₁ H ₃₇ N	2-Hexyl-3,5-dipentylpyridine
359.2369	3.9	11.5	C ₂₆ H ₃₀ O	2,6-di(4-isopropylbenzylidene)cyclohexan-1-one
475.3166	1.8	7.5	C ₂₇ H ₄₂ N ₂ O ₅	N-[(E)-[(3E,17β)-17-Hydroxy-17-methylandrosta-4-en-3-ylidene]amino]oxyacetyl]valine
881.7494	0.2	12.5	C ₅₉ H ₉₆ N ₂ O ₃	N ² -[(3β)-Cholest-5-en-3-yl]-N-{11-[(7α,17β)-3,17-dihydroxyestra-1,3,5(10)-trien-7-yl]undecyl}-N-methylglycinamide
ESI (-)				
164.0928	1.1	0.5	C ₆ H ₁₅ NO ₄	(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methane
232.0800	4.4	4.5	C ₅ H ₁₁ N ₇ O ₄	N-[Bis(2-carbamoylhydrazino)methylene]glycine
283.1875	1.1	-0.5	C ₁₁ H ₂₈ N ₂ O ₆	2-[(3-Aminopropyl)amino]-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol-2-(hydroxymethyl)-1,3propanediol (1:1)
511.3488	-0.9	0.5	C ₂₅ H ₅₂ O ₁₀	22-Hydroperoxy-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxidotriacontan-1-ol
579.3341	3	17.5	C ₃₆ H ₄₄ N ₄ O ₃	N-[5-[(2-Ethyl-1-piperidinyl)carbonyl]-2-(6-oxo-7,11-diazatricyclo[7.3.1.0 ^{2,7}]trideca-2,4-dien-11-yl)phenyl]-4-(2-methyl-2-propanyl)benzamide

^a"m/z" representa a massa dividida pelo número de carga e o eixo horizontal no espectro de massa é expresso em unidades de m / z.

^b"Error (ppm)" representa o erro de massa de uma tarefa, ao comparar uma m / z teórica e uma m / z observada experimentalmente.

^cRDB - ring/double bond equivalente. Os íons foram detectados como [M - H] - protonado [H + H] + e aducto [M + Na] + e [M].

Durante a exposição à EC, os animais não apresentaram sinais clínicos de indicação de toxicidade sistêmica (e.g.: fraqueza, dificuldade em respirar, dificuldade de locomoção, perda de pigmentação da carapaça ou plastrão e dificuldade em recolher a cabeça). Entretanto, houve redução da biomassa corporal das tartarugas expostas à diluição mais alta do efluente de curtume (EC 6,5%), em relação ao demais grupos experimentais (Figura 2). Sabe-se que a quantidade de poluente ingerido e bioacumulado por animais em sistemas subaquáticos podem ditar as preferências dietéticas destes (Bergeron et al., 2009), o que pode ser um possível fator responsável pela diminuição da biomassa dos animais desse grupo. Além disso, a falta de suplementação de vitaminas e minerais ocasiona deficiência metabólica e bioquímica em quelônios (McWilliams, 2006) e esses déficits podem ter sido corroborados devido ao contato dos animais ao poluente, característica essa que não foi evidenciada nas tartarugas do grupo controle. A concentração de efluente utilizada correlacionou-se negativamente com o peso dos animais, demonstrando que o aumento da concentração diminuiu significativamente a biomassa corpórea do animal (Burger, 1977).

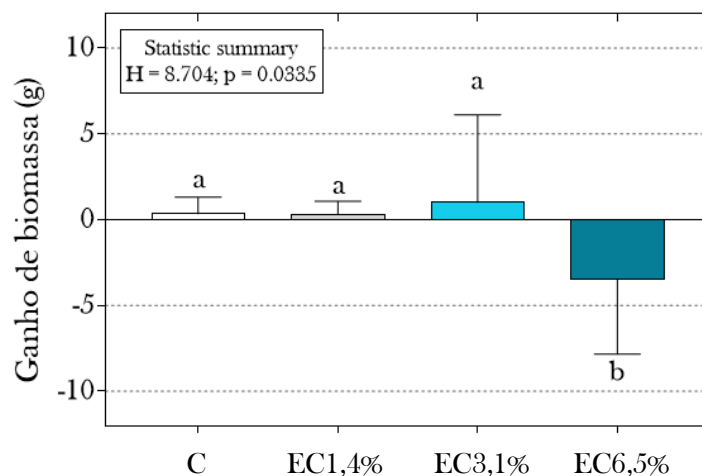


Figura 2- Delta da biomassa dos animais, considerando o início e fim do período de exposição. As barras simbolizam média + desvio padrão dos dados. O sumário estatístico é apresentado no campo superior esquerdo da figura. Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativa entre os grupos experimentais (n=12 animais/grupo). C: grupo controle; EC1,4: efluente de curtume diluído em água a 1,4%; EC3,1: efluente de curtume diluído em água a 3,1%; EC6,5: efluente de curtume diluído em água a 6,5.

Em relação aos testes comportamentais, observamos que os animais pertencentes ao grupo EC 6,5% apresentaram maior frequência de tentativas de endireitamento (figura 3A); entretanto, a latência (figura 3B) e o total de tentativas (figura 3C) foi menor nesse grupo. Polich et al., (2018) evidenciou que tartarugas filhotes *Chrysemys picta* expostas à corticosterona endireitaram-se mais rapidamente em relação ao grupo controle, o que contrasta com nossos dados. Além disso, os animais expostos à EC percorreram menos quadrantes no teste de natação, em relação aos animais do grupo controle e os mesmos dados foram observados no índice de respiração (razão entre a locomoção/tempo respirando) (Figura 3D). Outra característica observada é que todos os grupos expostos ao efluente de curtume percorreram menor quantidade de quadrantes em relação ao grupo controle (figura 3E).

As tartarugas possuem tendência natural em endireitarem-se. Contudo, observamos que os animais da EC 6,5% executaram maiores tentativas de endireitamento e tal característica não foi veemente observada nos demais grupos, o que pode significar um comportamento semelhante a estresse ocasionado nos animais devido à alta concentração do poluente (Burger, 1998). O índice de respiração demonstrou que tartarugas expostas ao EC tiveram menores índices do que os animais do grupo controle. Há diversas consequências que podem ser acarretadas às tartarugas em decorrência da ausência de uma boa natação. Áreas que são comumente marcadas por fatores antrópicos, tais como áreas de exploração, processamento e descarte de substâncias químicas nos afluentes de águas sobrepõem importantes habitats de tartarugas marinhas e de água doce. Além disso, variações em seu comportamento devido à presença de químicos e contaminantes na água coloca em risco as populações e a sobrevivência desses animais em seu meio natural, haja visto que a natação das tartarugas é um aspecto importante no que diz respeito à sua alimentação e escape de possíveis predadores naturais (Milton et al., 2003). Outro fator importante que deve ser mencionado é que os achados em

nosso estudo sugerem que as tartarugas sofreram exaustão no nado, possivelmente ocasionado pela presença do poluente no organismo desses animais (Selcer, 2006).

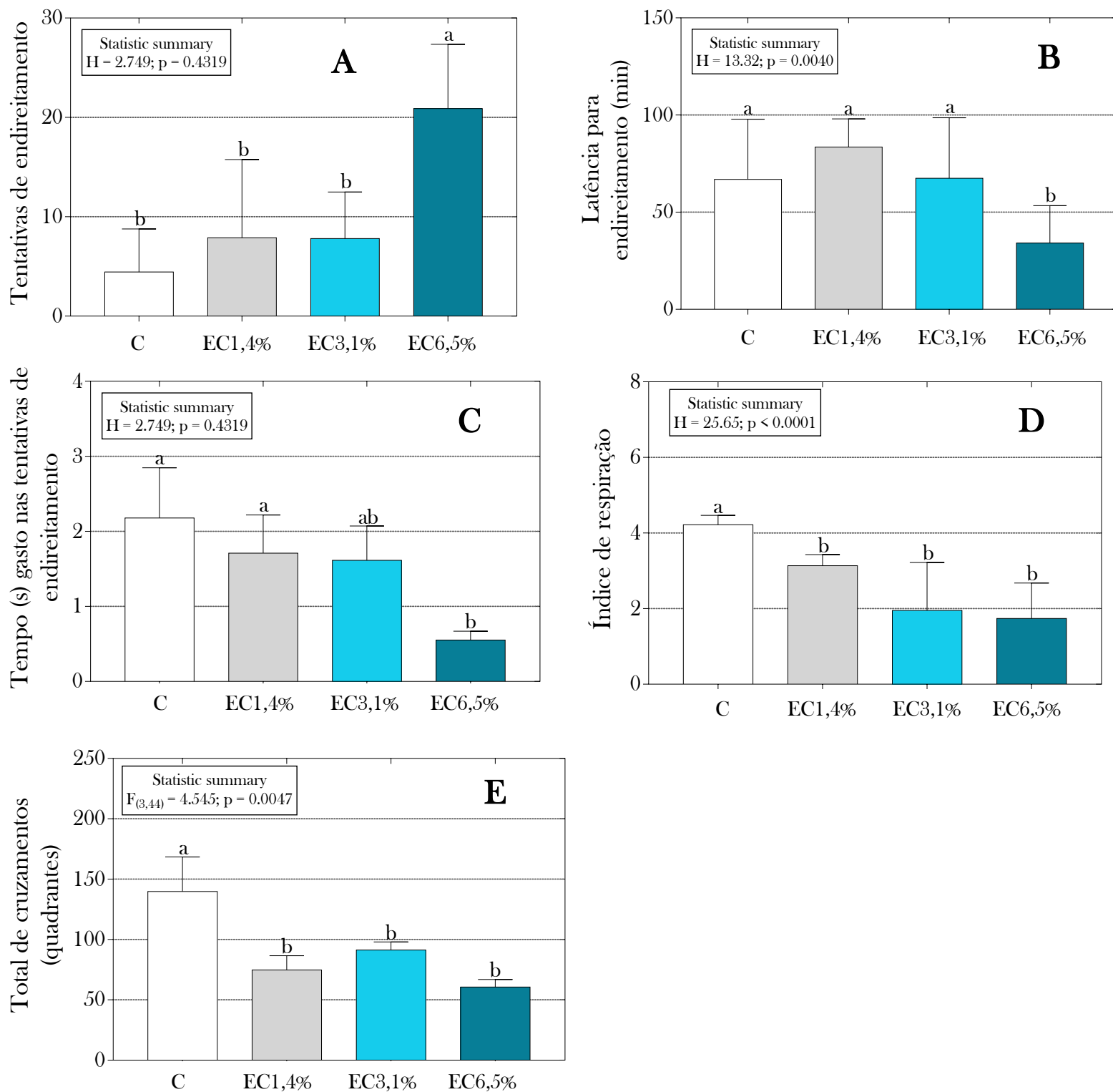


Figura 3- (A) Frequência de tentativas de endireitamento; (B) Latência para endireitamento; (C) Total de Tentativas de endireitamento; (D) Índice de Respiração E; (E) Total de cruzamentos percorridos por *P. expansa* expostas ou não ao EC, respectivamente. O sumário estatístico é apresentado no campo superior esquerdo da figura. Letras minúsculas distintas indicam diferenças

significativa entre os grupos experimentais (n=12 animais/grupo). C: grupo controle; EC1,4: efluente de curtume diluído em água a 1,4%; EC3,1: efluente de curtume diluído em água a 3,1%; EC6,5: efluente de curtume diluído em água a 6,5%.

Quanto à análise de mutagenicidade, foram evidenciadas diferenças significativas em todos os grupos expostos ao efluente de curtume, em relação ao grupo controle, sem efeito diluição-resposta (Figura 4). Os animais expostos apresentaram efeito mutagênico equitativo ao grupo controle positivo. Observamos a presença de bebbled nucleus (núcleo com broto), notched nucleus (núcleos chanfrados), moved nucleus (núcleo deslocado), bem como eritrócitos anucleados, multilobulados e micronúcleo (Figura 5).

Tais alterações geralmente relacionam-se a processos carcinogênicos que podem impactar as populações de *P. expansa*, uma vez que essas anormalidades estão relacionadas ao crescimento, desenvolvimento, sobrevivência e reprodução dos indivíduos acometidos por elas. A presença do micronúcleo está relacionada a falhas no processo de divisão celular, resultando em efeito aneugênicos (Degen et al., 1997). Resultados similares foram encontrados por Araújo et al., (2019), os utilizaram *P. expansa* para expor a nanopartículas de óxido de zinco e Mesak et al., (2018), que utilizou o mesmo modelo para exposição à ciclofosfamida. Ambos observaram as anormalidades evidenciadas em nosso trabalho, além do aparecimento de outras anormalidades que não foram observados no nosso trabalho e efeitos citotóxicos relacionados à morfologia do eritrócito. Tais estudos servem para reforçar a importância da mutagenicidade como biomarcador e nossos dados demonstram o potencial mutagênico desse poluente sobre filhotes de tartarugas *P. expansa*.

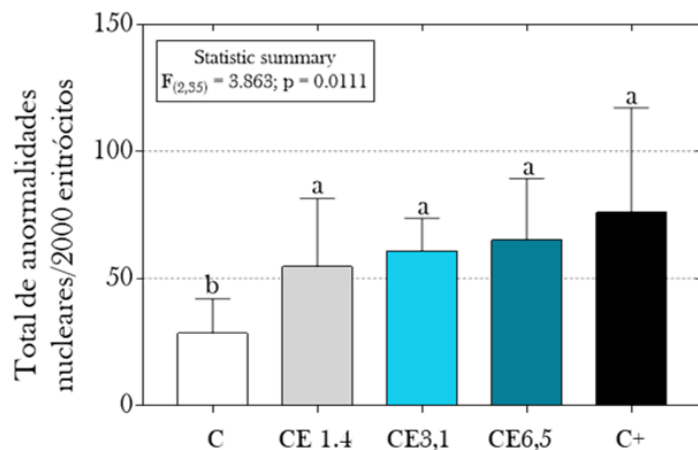


Figura 4- Total de anormalidades nucleares evidenciadas em *P. expansa* expostas ou não ao efluente de curtume. Grupo Controle Positivo teve exposição à Ciclofosfamida (n=6 animais). O sumário estatístico é apresentado no campo superior esquerdo da figura. Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativa entre os grupos experimentais (n=12 animais/grupo). C: grupo controle; EC1,4: efluente de curtume diluído em água a 1,4%; EC3,1: efluente de curtume diluído em água a 3,1%; EC6,5: efluente de curtume diluído em água a 6,5%; C+: controle positivo.

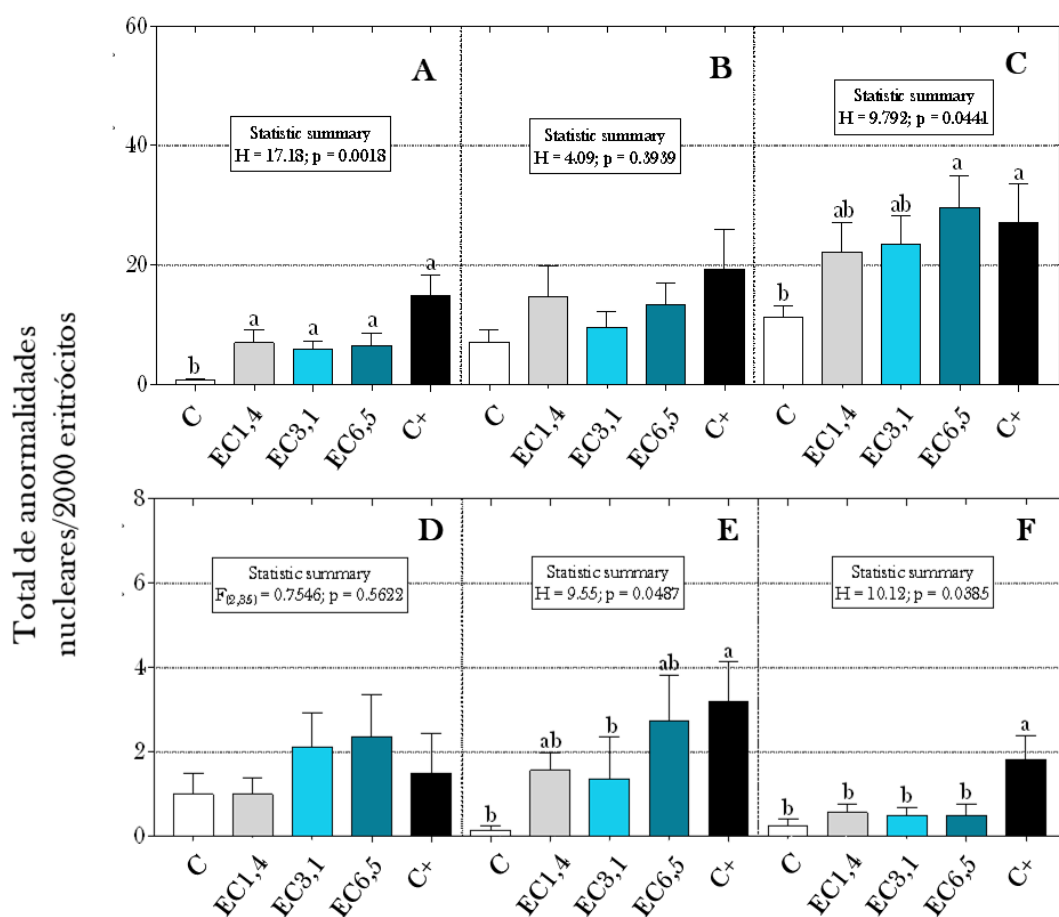


Figura 5- Frequência de: (A) células tipo broto; (B) células tipo chanfro; (C) núcleo deslocado; (D) células anucleadas; (E) células multilobuladas e; (F) micronúcleos. O sumário estatístico é apresentado no campo superior esquerdo da figura. Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativa entre os grupos experimentais (n=12 animais/grupo). C: grupo controle; EC1,4: efluente de curtume diluído em água a 1,4%; EC3,1: efluente de curtume diluído em água a 3,1%; EC6,5: efluente de curtume diluído em água a 6,5%; C+: controle positivo.

A quantificação de Cr no fígado demonstrou que houve maior captação desse metal pelos animais expostos à EC 6,5% ($F(3,38) = 12.92$; $p < 0.0001$), o qual diferiu significativamente dos demais grupos experimentais. Os mesmos dados foram observados na quantificação de Zn ($F(3,38) = 11.84$; $p < 0.0001$) e Ca ($H = 8.359$; $p = 0.0391$), em que o grupo EC 6,5% diferiu significativamente dos outros grupos. A quantificação de Fe ($H = 12.22$; $p = 0.0067$) e Mg ($H = 8.504$; $p = 0.0367$) também apresentou similaridade nos resultados, uma vez que os grupos expostos ao EC diferiram estatisticamente do grupo controle (figura 6).

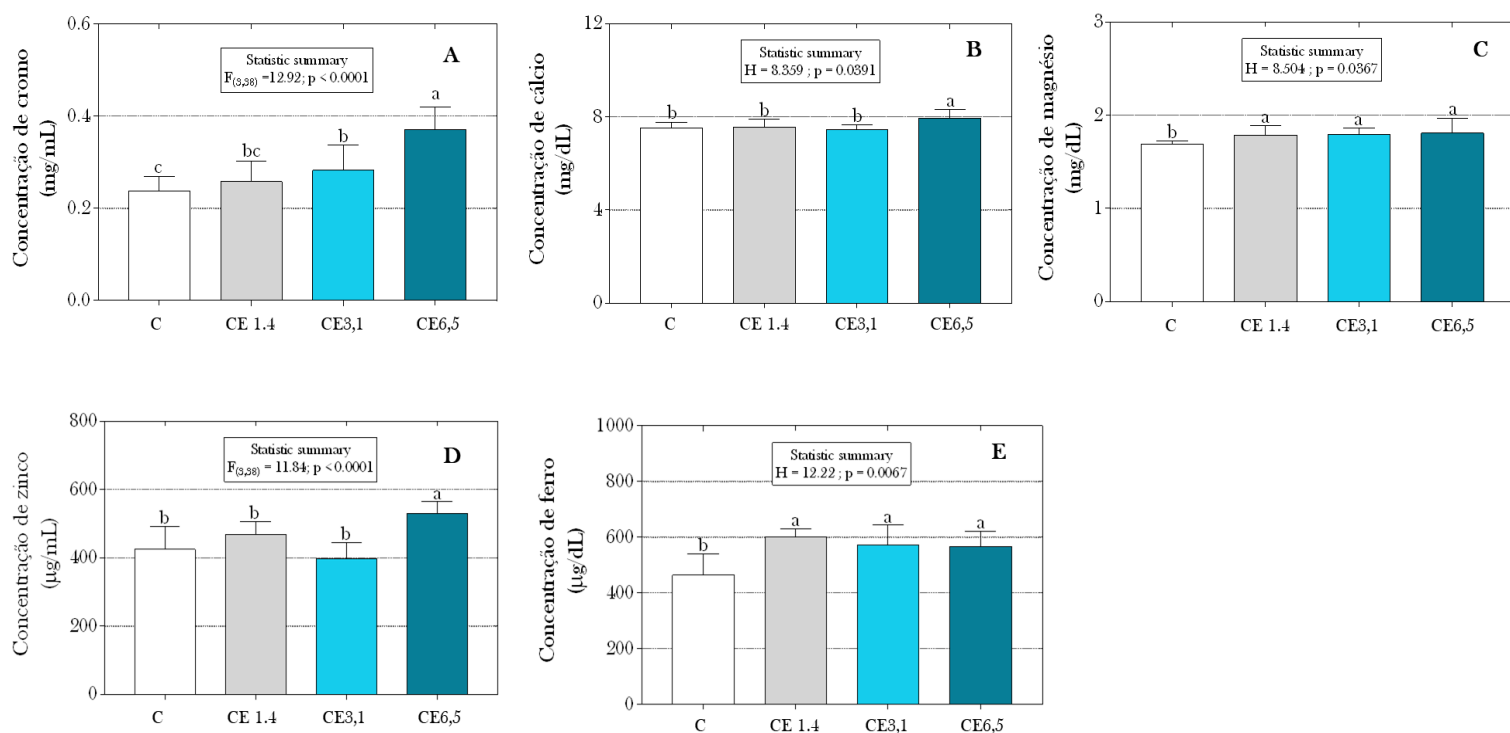


Figura 6- Concentração de: (A) cromo; (B) cálcio; (C) magnésio; (D) zinco e; (E) ferro presentes nos fragmentos de fígados de *P. expansa* expostas ou não ao efluente de curtume. O sumário estatístico é apresentado no campo superior esquerdo da figura. Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativa entre os grupos experimentais (n=12 animais/grupo). C: grupo controle; EC1,4: efluente de curtume diluído em água a 1,4%; EC3,1: efluente de curtume diluído em água a 3,1%; EC6,5: efluente de curtume diluído em água a 6,5%.

De uma forma geral, o acúmulo de Fe, Ca, Mg, Zn e Cr no fígado (e em outros órgãos de tartarugas, como os rins, por exemplo), se dá principalmente devido à ligação de metais pesados com a metalotioneína (MT) (Kägi e Koijma, 1987), proteína que geralmente liga-se à metais pesados e relaciona-se com a desintoxicação por substâncias tóxicas, metais pesados e homeostase de elementos essenciais. Como observado em nosso estudo, essas substâncias acumularam-se em grandes

quantidades no fígado dos animais expostos ao efluente de curtume. O zinco (Zn) é um importante elemento associado a estruturas e funções de proteínas e altos níveis de Zn intracelular são mantidos através de um controle homeostático. Ele se liga a uma rede diversificada de proteínas e tal fator pode afetar diversos processos biológicos, tais como divisão e diferenciação celular (Grungreiff et al., 2016). O fígado é o principal órgão responsável pelo metabolismo de zinco e o seu excesso no organismo pode ocasionar perda de apetite, náuseas e até mesmo a morte (Mangray et al., 2015). Em nosso estudo, encontramos grandes quantidades de zinco no fígado dos animais expostos à concentração mais alta do poluente, o que pode ajudar a justificar a perda de peso evidenciada nos animais desse grupo.

O ferro (Fe) desempenha um papel importante no organismo, uma vez que baixos níveis dessa substância pode ocasionar anemia, diarreia e até mesmo a desidratação. Além disso, o ferro é essencial para a produção de energia e transporte de oxigênio. Os organismos devem regular as concentrações de ferro para evitar efeitos tóxicos devido às suas propriedades redox que podem levar à produção de radicais livres de oxigênio responsáveis pela oxidação de lipídeos, proteínas e DNA (Gaetke e Chow, 2003). As tartarugas do nosso estudo que foram expostas ao efluente de curtume apresentaram grande concentração de ferro hepático e tais níveis podem estar relacionados à processos como a peroxidação lipídica, conforme relatado por Valdivia et al., (2007).

O cálcio (Ca) é um dos minerais mais importante para a saúde das tartarugas, estando presente em grande quantidade na constituição da carapaça e plastrão desses animais. Além disso, está envolvido em diversos outros processos do organismo, tais como regulação cardíaca, coagulação sanguínea, transmissão de impulsos nervosos e processos de ossificação (Almeida, 2007). Grandes quantidades de cálcio foram encontradas no fígado dos animais pertencentes ao grupo EC 6,5%. Vale ressaltar que a grande quantidade de cálcio no sangue pode resultar em hipercalcemia e tal distúrbio é fortemente relacionado ao aparecimento de neoplasias no corpo e principalmente no sangue (Andrigueto et al, 2002). Essa característica pode ajudar a justificar o surgimento das anormalidades eritrocitárias evidenciadas na análise de mutagenicidade.

O magnésio (Mg) é importante para a formação dos ossos e ainda contribui para o funcionamento adequado dos nervos e músculos. O metabolismo do cálcio é associado ao magnésio que, por sua vez, também é importante para a atuação de muitas enzimas dependentes dele. Nesse estudo, os animais exibiram altos níveis de magnésio hepático, o que representa uma característica natural incomum do organismo (Jahnen-Dechent & Ketteler, 2012). Tal fator pode ocasionar fraqueza muscular e comprometimento na respiração, o que pode estar associado ao comportamento ansioso para respirar observado pelas tartarugas no teste de natação.

O cromo (Cr) auxilia na perda de peso porque potencializa a ação da insulina. O aumento da insulina ajuda a reduzir a sensação de fome, haja visto que a sensação de fome é causada quando o nível desse hormônio está baixo no organismo. Ademais, o Cr também evita a produção excessiva de enzimas que estimulam a produção de colesterol no fígado (Mertz, 1969; Sun et al., 2000). Assim como o zinco, a concentração de cromo no fígado das tartarugas do grupo EC 6,5% também foi alta em relação aos demais grupos experimentais, o que pode estar relacionado ao déficit metabólico observado nos animais desse grupo em relação à sua biomassa corporal reduzida.

Os dados encontrados em nosso estudo sugerem a necessidade de execução de fiscalizações em indústrias de curtume e da diminuição dos fatores antrópicos no meio ambiente. *Podocnemis expansa* é utilizada desde o século XXI para alimentação e fabricação de objetos de adorno e utensílios domésticos. Embora seja tratada como um animal cujo risco de extinção é baixo, as condições ambientais causadoras de estresse e o antropismo podem levar essa espécie à extinção à curto prazo, conforme demonstrado em nosso trabalho. Logo, mais estudos devem ser realizados utilizando *P. expansa* e demais répteis como sistema modelo, para que as lacunas de conhecimento dos efeitos de poluentes sobre a saúde desses animais possam ser efetivamente desvendadas.

4. Conclusão

Em tese, nossos dados apontam a toxicidade do efluente de curtume para a saúde de *Podocnemis expansa*, mesmo em baixas concentrações, o que corrobora com a nossa hipótese inicial.

O efluente demonstrou seu potencial mutagênico e de alteração comportamental, bem como sua capacidade de acumulação nos órgãos desses animais e sua capacidade em ocasionar danos aos mesmos. Os resultados aqui obtidos, embora significantes, representam apenas uma pequena parte do impacto ocasionado por esse poluente sobre os répteis.

5. Conflitos de interesse e questões éticas

Os autores declaram não haver conflito de interesses. A pesquisa foi aprovada pelo Sistema de Autorização e Informação sobre Biodiversidade (SISBIO / IBAMA), sob o n. 61531/2017. Todo o experimento foi realizado de forma minuciosamente cuidadosa para evitar que os animais sofressem qualquer tipo de estresse, dor ou desconforto, minimizando todo o tipo de sofrimento possível.

6. Referências

A. Aich, B. Chattopadhyay, S.K. Mukhopadhyay. Immunolocalization of metallothionein in hepatocytes of guppy fish (*Poecilia reticulata*) exposed to tannery effluent: a biomarker study. *Chemosphere*, 169 (2017), pp. 460-466, 10.1016/j.chemosphere.2016.10.099. Feb. (Epub 2016 Nov 25)

A. Garcic. A highly sensitive, simple determination of serum iron using Chromazurol B. *Clin. Chim. Acta*. V.94, p.115-119, 1979.

A. Lorin, J. Neuman-Lee and Fredric. J. Janzen (2011) Atrazine Exposure Impacts Behavior and Survivorship of Neonatal Turtles. *Herpetologica*: March 2011, Vol. 67, No. 1, pp. 23-31.

American Public Health Association (APHA). Standard methods for the examination of water and wastewater (20 ed.), APHA, AWWA, WPCR, New York (1997), p. 1194

A.P.C. Araújo, V.S. Lima, J.E.A. Vieira, C. Mesak, G. Malafaia. 2019. First report on the mutagenicity and cytotoxicity of ZnO nanoparticles in reptiles. *Chemosphere*. 235:556-564. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.06.164.

A.T.B. Guimarães, R.O. Ferreira, W.A.M. Silva, A.L.S. Castro, G. Malafaia. Parental exposure to tannery effluent cause anxiety- and depression-like behaviors in mice offspring. *JSM Anxiety Depress.*, 1 (1) (2016), p. 1005

A.T. Guimarães, R.O. Ferreira, L.M. Rabelo, B.C. E Silva, J.M. de Souza, W.A. da Silva, I.P. de Menezes, A.S. Rodrigues, B.G. Vaz, D.R. de Oliveira Costa, I. Pereira, A.R. da Silva, G. Malafaia. The C57BL/6J mice offspring originated from a parental generation exposed to tannery effluents shows object recognition deficits. *Chemosphere*, 164 (2016), pp. 593-602, 10.1016/j.chemosphere.2016.08.144. Dec. (Epub 2016 Sep 13)

A.T.B. Guimarães, R. de Oliveira Ferreira, J.M. de Souza, W.A.M. da Silva, A.R. da Silva, A.S. de Lima Rodrigues, E. de Melo, D. Silva, R.M.E. Costa, A.L. da Silva Castro, G. Malafaia. Anxiety and memory deficits induced by tannery effluent in C57BL/6J female mice. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 23 (24) (2016), pp. 25323-25334, 10.1007/s11356-016-7746-2. Dec. (Epub 2016 Sep 30)

B. Zapata, E. Epstein, E.S. Banbinski. Review of calcium methodologies. *Na. Clin. Lab. Sc.* V.5, p. 1995-212, 1975.

Brasil, Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). Manual Prático de análise de água (2^a ed.), Fundação Nacional de Saúde, Brasília (2006). 146p

Brazilian Leather Exporting added value. Available in: <http://www.cicb.org.br/brazilian-leather/en/industry-data>. Accessed on 7 May 2018.

C.G. Almeida. Fontes e disponibilidade de cálcio e fósforo para a tartaruga-da-amazônia - *Podocnemis expansa* criada em cativeiro. Dissertação (mestrado). Jaboticabal - São Paulo. 2007.

C. Mesak, M.F. Montalvão, C.F.C. Paixão, G. Malafaia. Do Amazon turtles exposed to environmental concentrations of the antineoplastic drug cyclophosphamide present mutagenic damages? If so, would such damages be reversible?. *Environ Sci Pollut Res* 26, 6234–6243 (2019). <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04155-9>

Cox, P., Harris, P., Huntingford, C. et al. Increasing risk of Amazonian drought due to decreasing aerosol pollution. *Nature* 453, 212–215 (2008). <https://doi.org/10.1038/nature06960>

C.R. China, M.S. Ndaró. A study on leather sector investment status in Tanzania. *Afr. J. Sci. Res.*, 6 (4) (2015), pp. 19-22

D.F.D. Amaral, M.F. Montalvão, B.O. Mendes, J.M. de Souza, T.Q. Chagas, A.S.L. Rodrigues, G. Malafaia. Insights about the toxic effects of tannery effluent on *Lithobates catesbeianus* tadpoles. *Sci. Total Environ.*, 621 (2018), pp. 791-801, 10.1016/j.scitotenv.2017.11.310. Apr 15. (Epub 2017 Dec 18)

E. Crist, C. Mora, R. Engelman. (2017) The interaction of human population, food production, and biodiversity protection. *Science* 356(6335):260-264

E.A. de Sousa, C.C. Luz, D.P. de Carvalho, C.C. Dorea, I.B. de Holanda, Â.G. Manzatto, W.R. Bastos. Chromium distribution in an Amazonian river exposed to tannery effluent. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2016 Nov;23(21):22019-22026. doi: 10.1007/s11356-016-7443-1. Epub 2016 Aug 19. PMID: 27539473.

F.N. Estrela, L.M. Rabelo, B.G. Vaz, D.R. de Oliveira Costa, I. Pereira, A.S. de Lima Rodrigues, G. Malafaia. Short-term social memory deficits in adult female mice exposed to tannery effluent and possible mechanism of action. *Chemosphere*, 184 (2017 Oct), pp. 148-158, 10.1016/j.chemosphere.2017.05.174. (Epub 2017 May 31)

G.H. Degen, M.M. Gerber, S. Obrecht-Pflumio, G. Dirheimer. 1997. Induction of micronuclei with ochratoxin A in ovine seminal vesicle cell cultures. *Arch. Toxicol.* 71 365-371

Guia técnico ambiental de curtumes [recurso eletrônico] / Walter Alves Ferrari (in memoriam), José Wagner Faria Pacheco ; grupo de trabalho Hellen Cecília de Julli Ravacci ... [et al.] ; contribuições Alexandre Martin Martines ... [et al.]. - 2. ed. rev. atual. a partir da 1^a ed. publ. em 2005. - São Paulo : CETESB, 2015.

Hutchinson J, Simmonds M (1991) A review of the effects of pollution on marine turtles. Greenpeace, London.

J. Burger. 1977. Determinants of hatching success in diamondback terrapin, *Malaclemys terrapin*. *Am. Midl. Nat.* 94:446-464.

J. Burger (1998): effects of lead on behavior, growth, and survival of hatchling slider turtles, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A: Current Issues*, 55:7, 495-502

J.H.R. Kagi, Y. Kojima (Eds.), *Chemistry and biochemistry of metallothionein*, Birkhauser Verlag, Basel (1987), pp. 25-61

J.M. Andrigueto, L. Perly, I. Minardi. et al. *Nutrição Animal.: as bases e os fundamentos da nutrição animal: os alimentos*. 4 ed. São Paulo: Nobel, 2002. 305p.

J.M. Souza, A.T.B. Guimarães, W.A.M. Silva, C.C.O. Pereira, I.P.P. Menezes, G. Malafaia. Tannery effluent effects on vertebrates: lessons from experimental animals. *Int. J. Curr. Res.*, 8 (10) (2016), pp. 39902-39914

J.V. Rueda-Almonacid; J.L. Carr; R.A. Mittermeier; J.V. Rodriguez-Mahecha; R.B. Mast; R.C. Vogt; A.G.J. Rhodin; J. Ossa-Velasquez; J.N. Rueda; C.G. & Mittermeier. 2007. Las tortugas e los crocodilianos de los países andinos del Trópico. *Conservación Internacional*. 537p.

J.W. Gibbons, D.E. Scott, T.J. Ryan, K.A. Buhlmann, T.D. Tuberville, B.S. Metts, J.L. Greene, T. Mills, Y. Leiden, S. Poppy, C.T. Winne. The Global Decline of Reptiles, Déjà Vu Amphibians: reptile species are declining on a global scale. Six significant threats to reptile populations are habitat loss and degradation, introduced invasive species, environmental pollution, disease, unsustainable use, and global climate change. *Bioscience*, 50 (8) (2000), pp. 653-666

J.W.F. Pacheco. *Curtumes (Série P+L)*. CETESB, São Paulo (2005)

K. Grungreiff, K. Reinhold, H. Wedemeyer. The role of zinc in liver cirrhosis. *Annals of Hepatology*, v.15, n.1, p. 7-16, 2016.

Kit Biotécnica - Cálcio ASX. Ref.: 12.002.00. Biotecnica Ind. Com. Ltda. Varginha, MG, Brasil.

Kit Biotécnica - Ferro CRX. Ref.: 12.004.00. Biotecnica Ind. Com. Ltda. Varginha, MG, Brasil.

Kit Biotécnica - Magnésio Mono. Ref.: 12.007.00. Biotecnica Ind. Com. Ltda. Varginha, MG, Brasil.

K.C. Tagliari, R. Cecchini, J.A.V. Rocha, V.M.F. Vargas. Mutagenicity of sediment and biomarkers of oxidative stress in fish from aquatic environments under the influence of tanneries. *Mutat. Res. Genetic Toxicol.*, 561 (1) (2004), pp. 101-117

K.M. Davis, G.M. Burghardt. Training and long-term memory of a novel food acquisition task in a turtle (*Pseudemys nelsoni*). *Behavioural Processes*. Volume 75, Issue 2, June 2007, Pages 225-230

K.M.N. Islam, K Misbahuzzaman, A.K. Majumder, M. Chakrabarty. Efficiency of different coagulants combination for the treatment of tannery effluents: A case study of Bangladesh. *Afr J Environ SciTechn.* 2011; 5: 409-419.

K.W. Selcer. Reptile ecotoxicology: studying the effects of contaminants on populations. S. Gardner, E. Oberdoerster (Eds.), *Toxicology of Reptiles*, CRC Taylor and Francis, Boca Raton, FL (2006), pp. 267-298

L. G. Talent, J. N. Dumont, J.A. Bantle, D. M. Janz, S.G. Talent. Evaluation of western fence lizards (*Sceloporus occidentalis*) and eastern fence lizards (*Sceloporus undulatus*) as laboratory reptile models for toxicological investigations. *Environmental Toxicology and Chemistry*. Volume 21, Issue 5. May 2002. Pages 899-905

L.M. Gaetke, C.K. Chow. Copper toxicity, oxidative stress and antioxidant nutrients. *Toxicol*, 189 (2003), pp. 147-163

M.F. Montalvão, J.M. Souza, A.T.B. Guimarães, I.P.P. Menezes, A.L.S. Castro, A.S.L. Rodrigues, G. Malafaia. The genotoxicity and cytotoxicity of tannery effluent in bullfrog (*Lithobates catesbeianus*). *Chemosphere*. Volume 183, September 2017, Pages 491-502. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.080> Epub 2017 May 16

M Roulet, M Lucotte, J.R.D Guimarães, I Rheault, Methylmercury in water, seston, and epiphyton of an Amazonian river and its floodplain, Tapajós River, Brazil, *Science of The Total*

Environment, Volume 261, Issues 1-3, 2000, Pages 43-59, ISSN 0048-9697, [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(00\)00594-5](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(00)00594-5).

N.I. Stacy, A.R. Alleman, K.A. Saylor. Diagnostic hematology of reptiles. *Clin. Lab. Med.*, 31 (2011), pp. 87-108

N. Lara, T.S. Marques, K.M. Montelo, A.G. Ataídes, L.M. Verdade, A. Malvácio, P.B. Camargo (2012) A trophic study of the sympatric Amazonian freshwater turtles *Podocnemis unifilis* and *Podocnemis expansa* (Testudines, Podocnemidae) using carbon and nitrogen stable isotope analyses. *Can J Zool* 90:1394-1401

N.O. Leary, A. Pembroke, P.F. & Dugan (1992). Single stable reagent (Arsenazo III) for optically robust measurement of calcium in serum and plasma. *Clinical chemistry*, 38(6), 904-908.

P.A. Segura, M. François, C. Gagnon, S. Sauvé. Review of the occurrence of anti-infectives in contaminated waste waters and natural and drinking water. *Environ. Health Perspect.*, 117 (2009), pp. 675-684

P.A. Valdivia, T. Zenteno-Savín, S.C. Gardner, A.A. Aguirre. Basic oxidative stress metabolites in eastern Pacific green turtles (*Chelonia mydas agassizii*). *Comp Biochem Physiol C*, 146 (2007), pp. 111-117

P.C. Sabumon. Perspectives on biological treatment of tannery effluent. *Adv. Recycl. Waste Manag. Open Access*, 1 (1) (2016), pp. 3-10

P.J. Burcar, A.J. Boyle, R.E. Mosher. Spectrophotometric Determination of Magnesium in Blood Serum Using Magon. *Clin. Chem.* V. 10, p.1028-1038, 1964.

R.C. Vogt, C.K. Fagundes, Y.S.L. Bataus, R.A.M. Balestra, F.R.W. Batista, V.M. Uhlig, A.L. Silveira, A. Bager, A.M. Batistella, F.L. Souza, G.M. Drummond, I.J. Reis, R. Bernhard, S.H. S.T. Mendonça, V.L.F. Luz. 2015. Avaliação do Risco de Extinção de *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) no Brasil. Processo de avaliação do risco de extinção da fauna brasileira. ICMBio. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/fauna-brasileira/estado-de-conservacao/7431-repteis-podocnemis-expansa-tartaruga-daamazonia2.html>

R.F. Oliveira, A.T.B. Guimarães, T.L. Rocha, A.S. de Lima Rodrigues, B. de Oliveira Mendes, C. Mesak, G. Malafaia. The potential reproductive toxicity of tannery effluent to the estrous cycle and ovarian follicular dynamics of female Swiss mice. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 25 (36) (2018), pp. 36355-36367, 10.1007/s11356-018-3527-4. Dec. (Epub 2018 Oct 27)

R.J. Cousins, J.P. Liuzzi, P.L.A Lichten. Mammalian zinc transport, trafficking, and signals. *J Biol Chem*, 281 (2006), pp. 24085-24089

S. Eggins, L. Schneider, F. Krikowa, R.C. Vogt, R. Da Silveira, W. Maher. (2015) Mercury concentrations in different tissues of turtle and Caiman species from the Rio Purus, Amazonas, Brazil. *Environ Toxicol Chem* 34:2771-2781.

S.F. Almeida, L.M. Rabelo, J.M. Souza, R.O. Ferreira, A.T.B. Guimarães, C.C.O. Pereira, A.S.L. Rodrigues, G. Malafaia. Behavioral changes in female Swiss mice exposed to tannery effluents. *Rev Ambient Água*, 11 (3) (2016), pp. 519-534

S. Mangray, J. Zweit, P. Puri. Zinc deficiency in cirrhosis: micronutrient for thought? *Digestive Diseases and Sciences*, v. 60, n. 10, p. 2868-70, 2015.

S. Miller, A. Derenne, S. Ellis-Felege, T. Rhen. Incubation temperature and satiety influence general locomotor and exploratory behaviors in the common snapping turtle (*Chelydra serpentina*). *Physiology & Behavior*. Volume 220, 1 June 2020, 112875

S. Milton, P. Lutz, G. Shigenaka, "Oil Toxicity and Impacts on Sea Turtles", In. Shigenaka, G. (ed.), *Oil and Sea Turtles: Biology, Planning, and Response*. National Oceanic and Atmospheric Administration, 116 p., 2003.

S.M. Weir, S. Yu, L.G. Talent, J.D. Maul, T.A. Anderson, C.J. Salice. Improving reptile ecological risk assessment: Oral and dermal toxicity of pesticides to a common lizard species (*Sceloporus occidentalis*). *Environmental Toxicology and Chemistry*. Volume 34, Issue 8. August 2015. Pages 1778-1786

S. Vajpai; P. E. Taylor; A. Adholeya; M. L. Ackland. Chromium tolerance and accumulation in *Aspergillus flavus* isolated from tannery effluent. *J. Basic Microbiol.* 2020, 60, 58-71. 10.1002/jobm.201900389

T. Makino (1991). A sensitive, direct colorimetric assay of serum zinc using nitro-PAPS and microwell plates. *Clinica chimica acta*, 197(3), 209-220.

V. Tigini, P. Giansanti, A. Mangiavillano, A. Pannocchia, G. Varese. Evaluation of toxicity, genotoxicity and environmental risk of simulated textile and tannery wastewaters with a battery of biotests. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 74 (4) (2011), pp. 866-873

W.A.M. Silva, B.O. Mendes, A.T.B. Guimarães, L.M. Rabelo, R.O. Ferreira, B.C. Silva, J.M. Souza, I.P.P. Menezes, A.S.L. Rodrigues, G. Malafaia. Dermal exposure to tannery effluent causes neurobehavioral changes in C57Bl/6J and Swiss mice. *Chemosphere*. Volume 160, October 2016, Pages 237-243

W. Mertz. Chromium occurrence and function in biological systems. *Physiol Rev.* 1969;49:163-239.

W. Jahnhen-Dechent, M. Ketteler. Magnesium basics. *Clin Kidney J*, 5(1):i3-i14, 2012.

Y. Sun, J. Ramirez, S.A. Woski, J.B. Vincent. The binding of trivalent chromium to low-molecular-weight chromium-binding substance (LMWCr) and the transfer of chromium from transferrin and chromium picolinate to LMWCr. *J Biol Inorg Chem* 2000;5: 129-36.

