



Respostas mutagênicas em eritrócitos de *Kinosternon scorpioides* de vida livre e de cativeiro na Amazônia Brasileira

Mutagenic biomarkers in erythrocytes of free-ranging and captive *Kinosternon scorpioides* from the Brazilian Amazon

Carlos Alailson Licar-Rodrigues^{*1} , Almerinda Macieira Medeiros² , Elizângela Pinheiro Pereira¹ , Katherine Saldanha Noleto³ , Raimunda Nonata Fortes Carvalho-Neta^{3,1} , Germán Augusto Murrieta Morey⁴ , Alana Lislea de Sousa¹ 

1 Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), São Luís, Maranhão, Brasil 

2 Instituto Federal do Maranhão (IFMA), Barreirinhas, Maranhão, Brasil 

3 Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís, Maranhão, Brasil 

4 Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP), San Juan Bautista, Iquitos, Loreto-Peru 

*autor correspondente: carlos_licar@hotmail.com

Recebido: 25 de fevereiro de 2025. Aceito: 10 de julho de 2025. Publicado: 28 de julho de 2025. Editor: Luiz Augusto B. Brito

Resumo: Este estudo teve como objetivo investigar a ocorrência de micronúcleos (MN) e anormalidades nucleares eritrocitárias (ANEs) em populações naturais e de cativeiro de *Kinosternon scorpioides* e comparar suas frequências com o tipo de ambiente, sexo e período sazonal em uma área de proteção ambiental no estado do Maranhão, Amazônia. O sangue foi coletado de 112 espécimes de regiões com influência antrópica direta e áreas indireta e de controle para produzir esfregaços de sangue para posterior análise citológica em microscópio óptico. Encontramos MN (N=91) e ANEs como núcleos binucleados (N=14), entalhados (N=81), lobulados (N=35), segmentados (N=16) e deslocados (N=253) em animais in situ. Nenhuma anormalidade foi registrada nos eritrócitos dos espécimes em cativeiro. A média (\pm desvio padrão) de MN ($1,13 \pm 0,47$) diferiu daquelas dos outros quelônios do ambiente natural, e os núcleos deslocados e binucleados se manifestaram em frequências maiores (51,6%) e menores (2,8%), respectivamente. A frequência de núcleos lobulados foi significativamente diferente entre as áreas ($p < 0,05$); núcleos segmentados ($p < 0,05$) e deslocados ($p < 0,05$) apresentaram frequências maiores durante os períodos seco e chuvoso. O sexo não afetou essas anormalidades. Nenhum MN significativo foi encontrado; no entanto, eritrócitos com núcleos lobulados, segmentados e deslocados foram documentados em animais de diferentes ambientes e períodos sazonais. Nossa pesquisa fornece dados pioneiros sobre MN e anomalias nucleares nos eritrócitos de *K. scorpioides* e demonstra as diferenças e relações significativas entre eles. A ocorrência de anormalidades em animais silvestres confirma a necessidade de manutenção de áreas protegidas e a continuidade das ações de conservação voltadas para os quelônios amazônicos. Isso contribui para a redução do impacto em Unidades de Conservação que utilizam a biodiversidade de forma sustentável no Brasil.

Palavras-chave: biomarcadores; estressores ambientais; micronúcleos; quelônios.

Abstract: This study aimed to investigate the occurrence of micronuclei (MN) and erythrocyte nuclear abnormalities (ENAs) in natural and captive *Kinosternon scorpioides* populations and compare their frequencies with the environment type, sex, and seasonal period in an environmental protection area in the state of Maranhão, Amazon. Blood was collected from 112 specimens from regions with direct anthropogenic influence and indirect and control areas to produce blood smears for subsequent cytological



analysis under an optical microscope. We found MN (N=91) and ENAs such as binucleated nuclei (N=14), notched (N=81), lobulated (N=35), segmented (N=16), and displaced (N=253) in animals *in situ*. No abnormalities were recorded in the erythrocytes of the captive specimens. The mean (\pm standard deviation) MN (1.13 ± 0.47) differed from those of the other chelonians from the natural environment, and the displaced and binucleated nuclei manifested themselves at higher (51.6%) and lower (2.8%) frequencies, respectively. Lobulated nuclei frequency was significantly different between the areas ($p < 0.05$); segmented nuclei ($p < 0.05$) and displaced ($p < 0.05$) had higher frequencies during the dry and rainy periods. Sex did not affect these abnormalities. No significant MN were found; however, erythrocytes with lobulated, segmented, and displaced nuclei were documented in animals from different environments and seasonal periods. Our study provides pioneering data on MN and nuclear anomalies in the erythrocytes of *K. scorpioides* and confirms the significant differences and relationships between them. The occurrence of abnormalities in wild animals demonstrates the need to maintain protected areas and the continuity of conservation actions aimed at Amazonian turtles. This contributes to reducing the impact on conservation units that employ the sustainable use of biodiversity in Brazil.

Key-words: biomarkers; environmental stressors; micronuclei; turtle.

1. Introdução

Kinosternon scorpioides (Linnaeus, 1766) é uma espécie semiaquática de ampla distribuição que pode ser afetada por variações sazonais e pela disponibilidade de alimento. A espécie é conhecida como "jurará" ou "muçuã" no Brasil, possui ampla área reprodutiva e pode ser encontrada em lagos, lagoas, rios e no solo^(1,2). Estudos sobre os aspectos morfofisiológicos, reprodutivos, comportamentais, ecológicos, ambientais e fisiológicos desta e de outras espécies de tartarugas já apresentaram resultados claros e animadores. Tais informações são essenciais para a compreensão da biologia deste táxon e podem servir de norte para políticas ambientais voltadas à conservação e recuperação de ecossistemas e às populações naturais de tartarugas amazônicas.

Manter populações viáveis de tartarugas em ecossistemas requer esforços de proteção, manejo e monitoramento, que envolvem indivíduos, medidas práticas, técnicas eficazes de manejo conservacionista e biomonitoramento populacional, que devem ser aplicados com o apoio da comunidade⁽³⁾. Pressões antrópicas, como caça excessiva, queimadas e desmatamento em áreas protegidas, impactam *K. scorpioides* e outras tartarugas⁽⁴⁾. Na região amazônica, diversos espécimes de *K. scorpioides* têm sido submetidos à degradação. Nesse cenário, compreender o impacto dos estressores ambientais é relevante e permite uma compreensão qualitativa de sua saúde e do meio ambiente. Apesar das sutis alterações em seu DNA, elas precisam ser mais bem elucidadas, pois a exposição a agentes mutagênicos pode causar danos irreversíveis ao material genético, colocando sua saúde em risco⁽⁵⁾.

Assim, biomarcadores biológicos representam instrumentos cruciais que sinalizam alterações moleculares, bioquímicas, fisiológicas, celulares ou outras nos tecidos e/ou órgãos de um organismo, indicando exposição direta ou indireta aos efeitos nocivos de poluentes ambientais^(6,7,8). O teste do micronúcleo (MN), uma técnica de baixo custo, simples e de fácil aplicação, é crucial para avaliar os efeitos mutagênicos em células sanguíneas, e tem sido frequentemente utilizado em estudos ambientais para analisar alterações estruturais e estabilidade do DNA na fauna aquática⁽⁹⁾.

Os MNs são elementos citoplasmáticos contendo cromatina que surgem durante a divisão celular, quando fragmentos cromossômicos acêtricos são deixados para trás, dificultando sua conexão com o

núcleo principal das células-filhas. Sua formação resulta de alterações genéticas que se manifestam como anormalidades cromossômicas ou do fuso mitótico. Esse processo irreversível é transmitido às gerações futuras, reduzindo a diversidade genética das populações e prejudicando os animais que residem nas regiões afetadas⁽¹⁰⁾. Nesse contexto, a avaliação dos MNs é essencial na pesquisa de biomonitoramento, pois fornece dados confiáveis sobre a qualidade ambiental.

Nesse sentido, estudos nessa área são importantes, pois as tartarugas são excelentes indicadores da qualidade ambiental e de potenciais perigos para a saúde humana e à biodiversidade, devido a sua ampla distribuição e sensibilidade a poluentes. Em muitos casos, sua fisiologia, comportamento e ecologia são influenciados por fatores ambientais globais⁽¹¹⁾.

Portanto, este estudo teve como objetivo investigar a presença de MN e anormalidades nucleares eritrocitárias (ANEs) em populações de *K. scorpioides* de vida livre e de cativeiro e comparar suas frequências com o tipo de ambiente, sexo e sazonalidade em uma Área de Proteção Ambiental (APA) localizada no estado do Maranhão, que faz parte da Amazônia.

2. Material e métodos

2.1 Área de estudo

A Área de Proteção Ambiental da Baixada Maranhense está localizada no estado do Maranhão, que faz parte da Amazônia e foi incluída na lista Ramsar em 29 de fevereiro de 2000⁽¹²⁾. Está entre os mais importantes sítios Ramsar brasileiros e foi inserida no Plano Estratégico Nacional de Áreas Protegidas – PNAP⁽¹³⁾.

Com base no nível de interferência humana e nos efeitos ambientais diretos e indiretos, evidenciados pela presença ou ausência de desmatamentos, queimadas, devastação de manguezais e campos, caça predatória e lixo urbano, bem como pela distribuição dos espécimes por região e diferentes ambientes, agrupamos os pontos de coleta em três categorias: A1 (área urbanizada, influência antrópica direta), A2 (área com vegetação, influência indireta) e A3 (criadouro científico da UEMA, grupo controle).

A categoria A2 é marcada pela presença abundante de árvores, arbustos e outras espécies vegetais nativas que ocupam o local, as quais protegem o solo contra a erosão e contribuem para a preservação do equilíbrio ecológico. A área é rica em biodiversidade, apresentando diversas espécies vegetais e animais, características da região amazônica brasileira. A flora local impacta diretamente o clima, o ciclo hidrológico, a qualidade do ar e o habitat de animais e outros organismos vivos. Esta região apresenta mínima ou nenhuma interferência humana.

Em contraste, a atividade humana é intensa na categoria A1, impactando consideravelmente os recursos naturais. Há uma infraestrutura desenvolvida com mudanças no uso do solo, poluição e efeitos ambientais perceptíveis de atividades industriais, comerciais e residenciais que se desenvolveram em seu entorno. A densidade populacional é alta, alterando assim a paisagem natural, onde a vegetação nativa é substituída por áreas urbanas e outras construções que afetam diretamente o ambiente natural original. As atividades econômicas e sociais nesta região são acentuadas e constantes. Geralmente, ela é caracterizada por forte interferência no ambiente natural, ações humanas e mudanças na paisagem.

Os animais do grupo controle foram mantidos no criadouro científico da UEMA sob a autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA-MA), nº 1899339/2008 (Figura 1). O criadouro tem uma área de 159,92 m² e é composto por cinco baías com paredes de tela de ferro galvanizado, incluindo o teto. Cada baia ocupa uma área de 13,94 m², formando uma parte da área total construída de aproximadamente 91 m². Além disso, possui uma área livre de 68 m², um tanque de alvenaria revestido de cerâmica, uma rampa para acesso dos animais, água disponível e um sistema de drenagem. O criadouro contém árvores, cascalho, areia e um grande espaço aberto com ventilação natural, proporcionando um ambiente semelhante ao habitat natural da espécie. Em dias alternados, os animais adultos foram manuseados para renovar a água nos tanques, receberam alimentação e monitoramento da sua saúde. Eles foram identificados individualmente e alimentados diariamente, preferencialmente pela manhã. Durante a limpeza da área, o uso de produtos de limpeza foi evitado e todos os animais foram removidos de suas baías para esse fim.

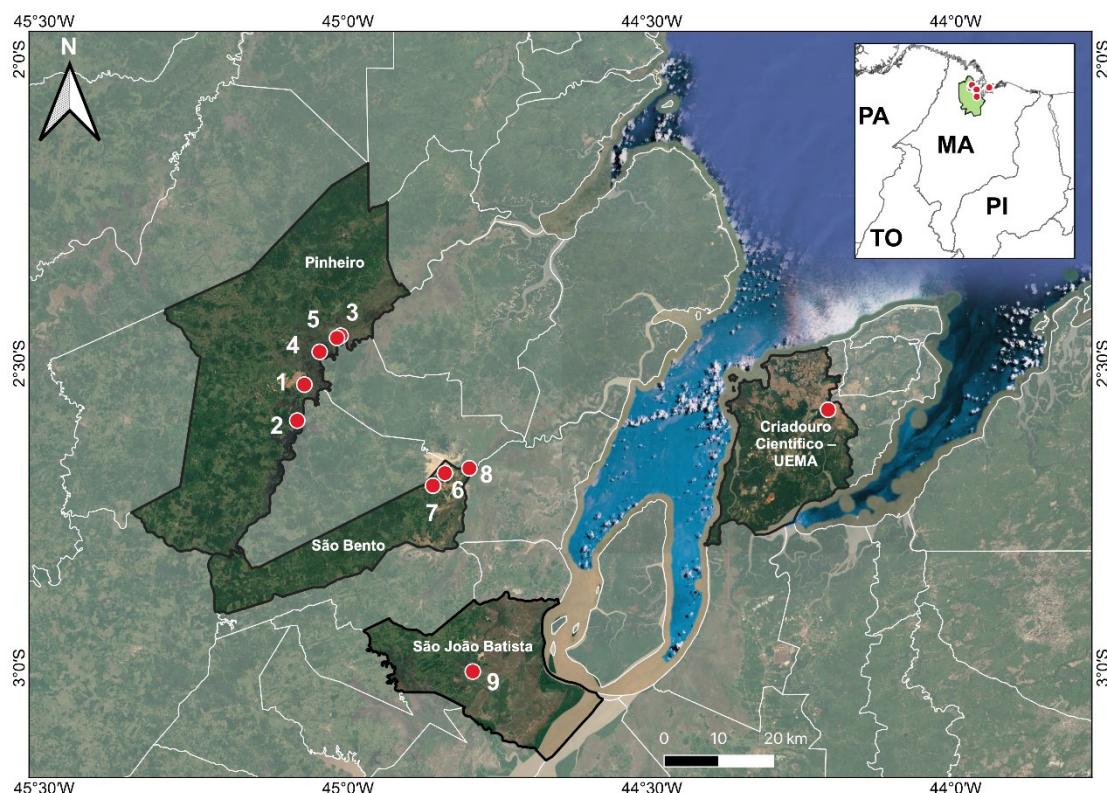


Figura 1. Localização dos pontos amostrais agrupados em áreas urbanizadas (1, 3 e 7) e com vegetação (2, 4, 5, 6, 8 e 9) em Pinheiro (MA), São Bento (MA) e São João Batista (MA) na Baixada Maranhense, além do criadouro científico da UEMA, São Luís, Maranhão, Brasil. (Pará - PA; Maranhão - MA; Piauí - PI e Tocantins - TO).

Os nove pontos de coleta estão em regiões estratégicas cobertas pela APA. Isso foi pensado para melhor amplitude de dados, bem como mapeamento de regiões antropizadas ou não antropizadas, como os municípios de Pinheiro, Maranhão (P1 – Maria Santa 2°32'5"S 45°4'19"W; P2 – alto Rio Pericumã 2°35'38"S 45°5'1"W; P3 – Comporta 2°27'16"S 45°0'44"W; P4 – baixo Rio Pericumã 2°28'51"S 45°2'48"W; P5 – médio Rio Pericumã 2°27'29"S 45°1'5"W); São Bento, Maranhão (P6 – Campo do Chagas 2°40'49"S 44°50'26"O; P7 – Campo do Alegre 2°42'3"S 44°51'37"O; P8 – Defunto 2°40'20"S 44°48'1"O); São João Batista, Maranhão (P9 – Pução do Meio 3°0'22"S 44°47'41"O).

2.2 Parâmetros ambientais da água e do solo

As variáveis abióticas da água do lago e do campo próximos aos locais de captura dos animais foram medidas entre 8 e 10 horas da manhã. O pH, a temperatura (T) e o oxigênio dissolvido (OD) foram medidos utilizando um medidor multiparâmetro (Akso, AK88®), imerso em água a 4 m de profundidade. A água do lago foi dividida em três colunas d'água (três réplicas amostrais) e os valores médios foram calculados. Esses parâmetros são importantes do ponto de vista ecotoxicológico, pois oferecem uma avaliação segura da qualidade dos corpos d'água, além de serem comumente utilizados em análises integradas a outros biomarcadores de interesse ambiental.

Amostras de solo foram coletadas para análise química completa, considerando os elementos K, Ca, Mg, Al, complexo H+Al, saturação por bases (SB), capacidade de troca catiônica (CTC) e micronutrientes como Fe, Mn, Cu, S, Zn e matéria orgânica (MO). Cinco amostras simples foram coletadas em zigue-zague em cada ponto para uma única composição de amostra composta. Para tanto, uma sonda foi posicionada a 20 cm de profundidade ⁽¹⁴⁾. Porções individuais foram misturadas para obter um composto homogêneo e 600 g foram removidos para obter a amostra final representativa dos pontos de coleta. Posteriormente, as amostras foram armazenadas em sacos plásticos fechados, etiquetados e enviadas ao laboratório para análise.

2.3 Testes para MN e ANEs em *K. scorpioides*

O protocolo de pesquisa para análises biológicas foi submetido ao Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), aprovado sob o parecer n.º 10/2021, e seguiu todos os princípios de bem-estar animal recomendados. Para a captura dos animais, o estudo foi licenciado através do Sistema de Informação e Autorização para a Biodiversidade (SISBIO), registro n.º 85805-1. Os animais foram capturados individualmente com armadilhas de funil circulares artesanais em agosto e outubro de 2021; abril, junho, outubro e dezembro de 2022; e março de 2023. Foram capturados 112 animais, incluindo 89 de vida livre e 23 em cativeiro, dos quais 50 eram machos e 62 fêmeas.

O teste de MN foi conduzido de acordo com o protocolo proposto por Grisolia *et al.* ⁽¹⁵⁾ com algumas modificações. Diversas anomalias estão associadas ao núcleo eritrocitário de *K. scorpioides*, incluindo núcleos lobulados, entalhados, segmentados, binucleados e deslocados, além de MN. Antes da coleta de sangue, todas as precauções necessárias foram tomadas para evitar estresse nos animais e contaminação da amostra. O sangue foi então coletado por punção do seio venoso occipital com seringa e agulha hipodérmica (0.7x25 mm²), após relaxamento da musculatura do animal. O uso de anestésicos foi evitado, pois poderia interferir nos resultados dos biomarcadores.

Duas lâminas foram produzidas por animal para 224 esfregaços sanguíneos. Em cada um deles, foi utilizada uma alíquota de aproximadamente 30 µL de sangue, que foi posteriormente seco à temperatura ambiente (entre 25 °C e 32 °C) por 24 h, seguido de fixação em metanol 10% gelado por 20 min e coloração com solução de Giemsa 10% diluída em tampão fosfato 0,2 M (KH₂PO₄). As lâminas foram lavadas em água corrente e secas à temperatura ambiente, com leituras realizadas em microscópio óptico pela técnica de visualização em zigue-zague com aumento de 100x. Um esforço amostral de 30 min foi utilizado para cada lâmina, examinando 1.000 eritrócitos por lâmina, totalizando 2.000 por tartaruga ⁽¹⁶⁾.

2.4 Análise dos dados

Os dados foram submetidos aos testes de *Shapiro-Wilk* e *Levene* para verificar a normalidade e a homocedasticidade da variância, respectivamente. Foi realizada análise de variância (ANOVA *one-way*) para avaliar as diferenças entre os ambientes, período sazonal e sexo, bem como estatísticas resumidas das médias e desvio padrão; quando encontrada diferença significativa, foram submetidas ao teste de *Tukey* utilizando o programa estatístico Past 4.08 (Paleontological Statistics Software) considerando um nível de significância de 5% ($p<0,05$).

3. Resultados

3.1 Parâmetros ambientais da água e do solo da Baixada Maranhense

As concentrações de OD nas águas em A1 e A2 (tabela 1), quando relacionadas aos dois períodos de coleta (seco e chuvoso), foram baixas e não atenderam aos valores permitidos pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) ^(17,18).

Nas amostras de solo, os teores médios de K e Ca foram elevados em A1 no período de seca, enquanto Mg, SB, Al, H+Al e CTC foram elevados em A2 no mesmo período (Tabela 2). Os teores médios de Fe, Mn, Cu e Zn foram elevados em A2 no período de seca. O teor médio de S também foi elevado em A1 durante esse período (Tabela 2).

Estudos granulométricos revelaram que A1 apresentou o maior teor médio de areia ($453,67 \pm 206,00$ g/kg) no período chuvoso, e A2 altos teores de silte/argila em ambos os períodos climáticos (Tabela 3).

Tabela 1. Estatísticas resumidas das variáveis físico-químicas da água dos diferentes ambientes de captura (A1 e A2) de *Kinosternon scorpioides* na Baixada Maranhense nos meses de agosto e outubro de 2021; abril, junho, outubro e dezembro de 2022; e março de 2023 nos períodos seco e chuvoso na Baixada Maranhense. DP = Desvio-padrão; pH = Potencial hidrogeniônico; OD = Oxigênio dissolvido.

Variáveis abióticas	A1		A2	
	seco	chuvisco	seco	chuvisco
OD (mg/L)	Mínimo	2.60	2.50	0.80
	Máximo	6.00	4.30	6.90
	Média ± DP	$4.24 \pm 1.41^*$	$3.40 \pm 1.27^*$	$3.71 \pm 1.86^*$
pH	Mínimo	5.60	6.00	3.70
	Máximo	7.70	6.30	7.20
	Média ± DP	6.28 ± 0.82	6.15 ± 0.21	$5.79 \pm 0.94^*$
Temperatura (°C)	Mínimo	28.95	28.20	27.30
	Máximo	30.40	29.00	30.80
	Média ± DP	29.60 ± 0.64	28.60 ± 0.57	28.87 ± 1.26

*Para valores em desacordo com o Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA ^(17,18) (valores de referência para água: OD>5,0 mg/L; pH 6,0 a 9,0; Temperatura <40 °C).

Tabela 2. Concentrações de elementos químicos e micronutrientes presentes no solo correspondentes aos diferentes ambientes de captura (A1 e A2) de *Kinosternon scorpioides* na Baixada Maranhense em agosto e outubro de 2021; abril, junho, outubro e dezembro de 2022; e março de 2023 nos períodos seco e chuvoso.

Variáveis abióticas	A1		A2	
	seco	chuvisco	seco	chuvisco
Elementos (cmol/dm³)*				
K	Mínimo	0.21	–	0.04
	Máximo	0.87	–	0.81
	Média ± DP	0.48±0.35 ^a	–	0.47±0.29 ^a
Ca	Mínimo	1.19	–	1.17
	Máximo	6.66	–	5.93
	Média ± DP	3.89±2.74 ^b	–	3.86±1.58 ^b
Mg	Mínimo	2.82	–	1.90
	Máximo	6.50	–	7.59
	Média ± DP	4.76±1.85 ^c	–	5.62±2.00 ^c
Al	Mínimo	0.17	–	2.33
	Máximo	1.69	–	26.58
	Média ± DP	0.80±0.79	–	6.79±9.71
H+Al	Mínimo	3.59	–	13.09
	Máximo	12.88	–	35.94
	Média ± DP	7.94±4.67 ^d	–	19.99±8.04 ^d
SB	Mínimo	4.22	–	3.30
	Máximo	14.00	–	12.90
	Média ± DP	9.12±4.89 ^e	–	9.91±3.50 ^e
CTC	Mínimo	7.82	–	21.90
	Máximo	22.01	–	47.90
	Média ± DP	17.07±8.02 ^f	–	29.94±1.26 ^f
Micronutrientes (mg/dm³)				
Fe	Mínimo	270.23	–	274.75
	Máximo	993.47	–	1131.20
	Média ± DP	587.47±369.70	–	622.15±363.61
Mn	Mínimo	7.68	–	30.04
	Máximo	35.65	–	134.67
	Média ± DP	23.72±14.43	–	72.55±37.92
Cu	Mínimo	0.27	–	0.48
	Máximo	0.83	–	1.18
	Média ± DP	0.63±0.31	–	0.80±0.25
S	Mínimo	102.75	–	102.75
	Máximo	188.80	–	199.37
	Média ± DP	158.07±48.01	–	136.80±40.44
Zn	Mínimo	1.14	–	2.32
	Máximo	3.87	–	7.92
	Média ± DP	2.48±1.37	–	5.29±2.21

Classes de interpretação do conteúdo do solo para K: muito baixo (0–30), ^a baixo (31–60), médio (61–120), alto (121–235) e muito alto (>235). Ca: baixo <1,5, ^b médio 1,5–4,0, alto >4,0. Mg: baixo <0,5, médio 0,5–1,0, ^c alto >1,0. H+Al: baixo <2,5, médio 2,5–5,0, ^d alto >5,0. BS: baixo <2,0, médio 2,0–5,0, ^e alto >5,0. CTC: baixo <4,5, médio 4,5–1,0, ^f alto >10. Diferentes letras minúsculas indicam a concentração dos elementos químicos nos solos nos pontos de coleta ($p<0,05$), conforme definido por Prezotti e Guaçoni ⁽¹⁹⁾. SB - Saturação por Bases; CTC - Capacidade de Troca Catiônica.

Tabela 3. Granulometria do solo dos habitats (A1 e A2) dos espécimes amostrados de *Kinosternon scorpioides*, obtidos durante as coletas entre os meses de agosto e outubro de 2021; abril, junho, outubro e dezembro de 2022; e março de 2023 nos períodos seco e chuvoso na Baixada Maranhense.

Granulometria (g/kg)	A1		A2		
	seco	chuvisco	seco	chuvisco	
Areia	Mínimo	248.00	–	110.00	170.00
	Máximo	660.00	–	540.00	236.00
	Média ± DP	453.67±206.00	–	275.33±148.93	197.33±34.43
Silte	Mínimo	140.00	–	110.00	234.00
	Máximo	222.00	–	505.00	384.00
	Média ± DP	176.33±41.79	–	249.67±155.87	306.00±75.18
Argila	Mínimo	200.00	–	330.00	380.00
	Máximo	530.00	–	750.00	580.00
	Média ± DP	370.00±165.23	–	475.00±174.79	496.67±104.08

O nível médio de MO em A2 (29,16 g/kg) foi maior do que em A1 (15,95 g/kg). Os números em A2 aumentaram a CTC (21,94 para 47,93 cmol_c/dm³). Em A1, variaram de 7,82 a 21,38 cmol_c/dm³.

3.2 MN e ANE em *K. scorpioides*

Os resultados dos testes de MN revelaram que 26,7% (60/224) dos esfregaços sanguíneos apresentaram alguma alteração na morfologia nuclear dos eritrócitos, além de MN. Desses amostras, 33,3% (20/60) e 95% (57/60) apresentaram MN e alguma forma de ANE, respectivamente. Mais eritrócitos com MN foram encontrados nos animais de A2 (N=71) do que naqueles de A1 (N=20). As ANEs identificadas foram eritrócitos com núcleos binucleados (BI), entalhados (NE), lobulados (NL), segmentados (NS) e deslocados (ND; Figura 2). Não identificamos MN ou outras ANEs nas amostras dos 46 animais em cativeiro. Os valores na Tabela 4 referem-se aos encontrados nos animais das áreas A1 e A2.

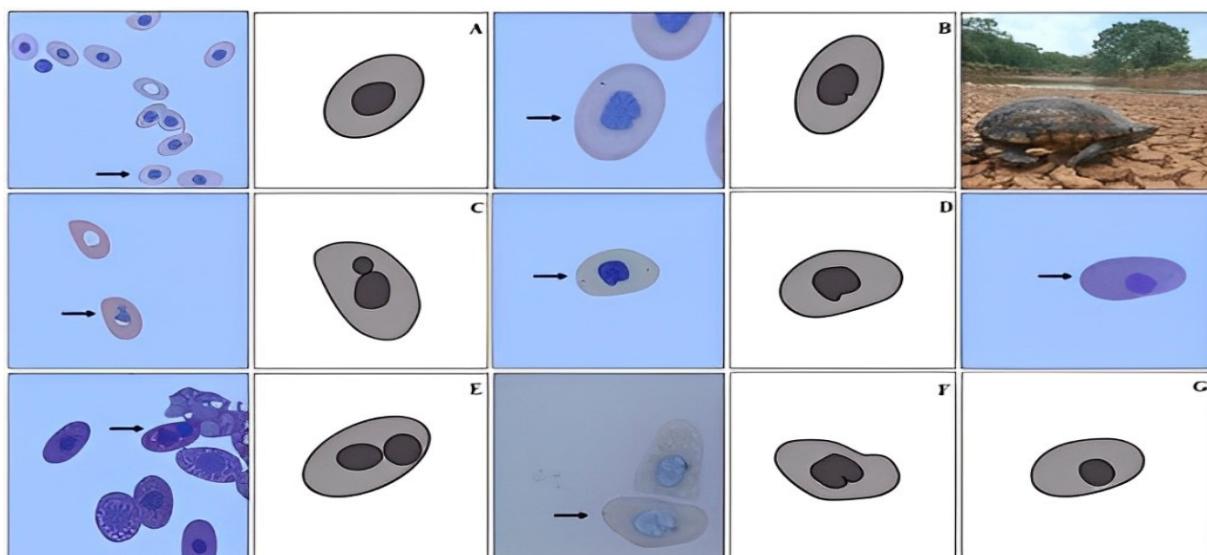


Figura 2. Eritrócitos de *Kinosternon scorpioides*. Apresentação das anormalidades do micronúcleo (MN) e do núcleo eritrocitário (ANEs) de espécimes capturados nas áreas A1 e A2 na Baixada Maranhense, com o uso da coloração de Giemsa a 10% e visualização em aumento de 100x. As setas pretas indicam: A – Eritrócitos normais; B – Eritrócitos com micronúcleo; C – Eritrócitos binucleados; D – Núcleo entalhado; E – Núcleo lobulado; F – Núcleo segmentado e G – Núcleo deslocado.

Entre os 490 eritrócitos contados, a ocorrência de ND (N=253; 51,63%) foi mais frequente do que a de BI (N=14; 2,85%; Tabela 4). Eritrócitos com anormalidades de NS, NL e ND foram os mais recorrentes na maioria das amostras.

Tabela 4. Análise quantitativa dos tipos de anomalias nucleares eritrocitárias (ANEs) registradas em amostras de *Kinosternon scorpioides* capturadas em A1 e A2 na Baixada Maranhense, Maranhão, Brasil.

Abreviação	Variável	Nº. de eritrócitos	Frequência (%)
MN	Micronúcleos	91	18.57
BI	Binucleado	14	2.85
NE	Núcleo entalhado	81	16.53
NL	Núcleo lobulado	35	7.14
NS	Núcleo segmentado	16	3.26
ND	Núcleo deslocado	253	51.63
Total		490	100

A comparação das médias das variáveis correspondentes a MN e ANE de acordo com o ambiente, sexo e período sazonal indicou que o número de ND foi maior nos animais de A1 ($4,66 \pm 0,81$). No entanto, o número de NL foi significativamente diferente entre os animais de A1 e A2 ($p < 0,05$; Tabela 5). Quando as médias das variáveis foram verificadas de acordo com o período sazonal, os números de NS e ND em eritrócitos de *K. scorpioides* foram significativamente maiores na estação seca ($5,27 \pm 0,90$, $p < 0,05$; Tabela 5). Portanto, as condições ambientais e climáticas afetam diretamente a ocorrência de anomalias eritrocitárias. O sexo não interferiu na formação dessas anormalidades, e as maiores médias detectadas mostraram valores semelhantes entre machos ($4,30 \pm 0,76$) e fêmeas ($4,36 \pm 0,79$) com ND em eritrócitos. A média e o desvio padrão dos MN detectados em espécimes adultos de *K. scorpioides* ($1,13 \pm 0,47$) diferiram daqueles encontrados em outros quelônios (Tabela 6).

Tabela 5. Estatísticas resumidas das frequências de micronúcleos e anormalidades nucleares eritrocitárias (ANEs) em machos e fêmeas de *Kinosternon scorpioides* ($N=60$) da Baixada Maranhense (A1 e A2), em diferentes períodos (seco e chuvoso), nos meses de agosto e outubro de 2021; abril, junho, outubro e dezembro de 2022 e março de 2023.

Variável	Ambiente		Sexo		Período				
	A1	A2	macho	fêmea	seco	chuvisco			
	Média \pm DP	p-valor	Média \pm DP	p-valor	Média \pm DP	p-valor			
MN	1.06 \pm 0.44	1.51 \pm 0.56	0.4164	1.50 \pm 0.57	1.54 \pm 0.57	0.9088	0.97 \pm 0.58	1.13 \pm 0.47	0.8600
NE	1.44 \pm 0.41	1.35 \pm 0.33	0.8628	1.37 \pm 0.34	1.30 \pm 0.33	0.5844	1.57 \pm 0.41	1.52 \pm 0.44	0.1338
NL	0.63 \pm 0.18	0.58 \pm 0.15	0.02839*	0.59 \pm 0.15	0.59 \pm 0.15	0.7112	0.63 \pm 0.18	0.68 \pm 0.19	0.9860
NS	0.21 \pm 0.08	0.26 \pm 0.08	0.9590	0.27 \pm 0.08	0.27 \pm 0.08	0.6536	0.34 \pm 0.11	0.22 \pm 0.09	0.02949*
BI	0.23 \pm 0.08	0.23 \pm 0.06	0.3521	0.22 \pm 0.06	0.23 \pm 0.06	0.2660	0.21 \pm 0.08	0.25 \pm 0.08	0.1176
ND	2.74 \pm 0.49	4.66 \pm 0.81	0.05789	4.30 \pm 0.76	4.36 \pm 0.79	0.6065	5.27 \pm 0.90	2.63 \pm 0.52	0.0008336*

Abreviações: **MN**: Micronúcleo; **NE**: Núcleo entalhado; **NL**: Núcleo lobulado; **NS**: Núcleo segmentado; **BI**: Binucleado; **ND**: Núcleo deslocado; 1 ANOVA one-way/*Diferença significativa ($p < 0,05$).

Tabela 6. Comparação entre médias e desvio padrão (DP) de MN encontrados em eritrócitos de *Kinosternon scorpioides* com aqueles de outras espécies de quelônios em ambientes marinho e de água doce no Brasil.

Espécies		Média	DP	Estágio de vida	Referência
<i>Kinosternon scorpioides</i>		1.13	0.47	Adulto	Presente estudo
<i>Trachemis callirostris</i>	Água doce	1.25	0.91	Adulto	Zapata et al. (20)
<i>Phrynops hilarii</i>		0.62	0.18	Juvenil/Adulto	Latorre et al. (21)
<i>Podocnemis expansa</i>		0.60	0.60	Filhote	Frossard et al. (22)
<i>Chelonia mydas</i>		0.78	0.58	Filhote	Frossard et al. (22)
<i>Chelonia mydas</i>		3.56	1.59	Juvenil	Silva et al. (23)
<i>Lepidochelys olivacea</i>	Marinho	10.0	3.60	Adulto	Herrera and Baena (24)
<i>Caretta caretta</i>		15.82	15.16	Juvenil/Adulto	Casini et al. (25)

Fonte: Frossard et al. (22). Intervalo de Confiança (IC) de 95%.

4. Discussão

A frequência estimada de MN em *K. scorpioides* coincidiu com a de outras tartarugas, como *Trachemys callirostris*, que apresentou 79 MN em eritrócitos. Além dos MN, nossos achados revelaram outras anomalias nos eritrócitos de *K. scorpioides*, contradizendo os resultados da maioria dos estudos que se concentraram apenas na análise de MN, particularmente em mamíferos aquáticos^(26,27). Estudos anteriores demonstraram que o teste de MN detecta efetivamente alterações em eritrócitos de répteis e aves, fornecendo informações biológicas pertinentes, além de atuar como um sinal de efeitos nocivos em animais aquáticos. Nesse cenário, os resultados deste estudo são particularmente importantes, visto que não há evidências disponíveis de MN ou outras anomalias eritrocitárias na espécie em estudo.

Nossos resultados não revelaram MN em *K. scorpioides* de cativeiro. Um fator associado à ocorrência dessas anormalidades é o número reduzido de animais na área⁽²⁸⁾. Além disso, fatores de estresse que alteram o núcleo celular são incomuns em animais de cativeiro. Em relação à proporção de animais em cativeiro e de vida livre, Zapatta et al.⁽²⁰⁾ e Latorre et al.⁽²¹⁾ relataram proporções semelhantes as deste estudo (20 e 32 animais, respectivamente). Estudos anteriores relataram números reduzidos e ausência de MN em *Macrolemys temminckii* e *Kinosternon subrubrum*⁽²⁹⁾ em cativeiro e em vida livre.

O número médio de MN em animais de A2 foi maior do que A1, embora a diferença não tenha sido estatisticamente significativa. Esses achados confirmam os resultados relatados por Castaño et al.⁽³³⁾ para espécimes coletados em regiões com vegetação ($3,33 \pm 0,62$) e são semelhantes aos relatados por Zapata et al.⁽²⁰⁾, que identificaram uma média maior ($8,04 \pm 7,08$) em *T. callirostris* capturados em rios e submetidos a fatores de estresse. A escassez de MN em indivíduos de vida livre pode ser atribuída à sua capacidade de adaptação às condições e mudanças ambientais regionais⁽³⁰⁾.

Embora os animais deste estudo tenham sido capturados em áreas urbanas e com vegetação em uma APA no Maranhão, que apresentou níveis variados de interferência humana, nossos relatos indicaram uma baixa incidência de MN, sugerindo que impactos ambientais diretos ainda não se manifestaram nessas regiões. Esses dados são semelhantes aos apresentados por Moron et al.⁽³¹⁾ sobre *Podocnemis expansa* em uma APA no Tocantins, Brasil. Em estudos anteriores conduzidos com *P. hilarii* e *Caretta caretta*⁽²⁸⁾, Casini et al.⁽²⁵⁾ demonstraram que os MN apresentaram respostas significativas do ponto de vista ambiental e indicaram possíveis efeitos sobre essas espécies. A mudança na origem dessa anomalia indica a qualidade do ambiente, pois é comum em animais de regiões afetadas por problemas e desequilíbrios ambientais, que comprometem sua sobrevivência⁽³²⁾.

Matson et al.⁽⁶⁾ relataram que efluentes industriais atuam como tensores ambientais nos ecossistemas impactados. Eles identificaram os valores absolutos de MN em *Emys orbicularis* e *C. mydas* (N=23 e 1.254, respectivamente) quando submetidos aos impactos negativos de atividades agrícolas em áreas urbanas. Esses valores excederam os relatados em nosso estudo para A1 (N=20). Além disso, Castaño et al.⁽³³⁾ sugeriram que as altas taxas de anomalias nucleares em animais de regiões urbanas e com vegetação podem estar ligadas a atividades humanas e agrícolas que têm efeitos consideráveis sobre esses animais.

Os resultados do teste de MN não revelaram diferença significativa entre os sexos, confirmando que se trata de um elemento que não influencia as alterações nucleares. Estudos semelhantes confirmaram essa mesma tendência, como o realizado por Borges et al.⁽³⁴⁾, que analisaram a saúde de *Podocnemis*

unifilis mantidos em uma reserva de desenvolvimento sustentável no estado do Amazonas, Brasil, e identificaram eritrócitos com NS e NL. Ao examinarmos diferentes ambientes e épocas do ano, observamos diferenças notáveis nas anormalidades nucleares de eritrócitos com NL em *K. scorpioides*. Isso diferencia os dados relatados por Borges *et al.*⁽³⁴⁾ aos deste estudo.

A descrição de anomalias nucleares em nosso estudo revelou um alto número de eritrócitos com ND, o que parece ser frequente em *K. scorpioides* de vida livre capturados em áreas urbanas. Isso sugere que, em contraste com tartarugas de regiões com grande vegetação, aquelas que habitam áreas urbanas são mais propensas a apresentar essa anomalia. Além disso, a alta frequência observada em *K. scorpioides* pode estar relacionada às condições ambientais, particularmente durante a estação seca no Maranhão.

Embora estudos anteriores sugiram que essa anomalia seja rara, evidências em aves indicam a ocorrência frequente de ND quando expostas a poluentes. Esses eritrócitos exibem diferentes rotações e deslocamentos do núcleo no citoplasma^(35,36), o que também foi confirmado em *K. scorpioides*. Araújo *et al.*⁽³⁷⁾ relataram anomalias notáveis em células de *P. expansa* afetadas por fatores de estresse e neonatos expostos a nanopartículas de óxido de zinco. Essas informações ressaltam a importância de estudos adicionais para detectar poluentes no sangue de tartarugas, a fim de melhor caracterizar seus efeitos sobre as populações de quelônios, particularmente *K. scorpioides*.

Os NEs foram a terceira anomalia mais frequente nessa espécie. Segundo Carrasco *et al.*⁽³⁸⁾, essa foi a segunda maior taxa de anomalias em peixes de áreas poluídas. Isso também foi relatado por Quero *et al.*⁽³⁹⁾ ao estudar aves, onde 74% dos espécimes de uma área protegida na Argentina foram representados pelos NEs, que são vistos como um biomarcador específico de dano genético em passeriformes, uma vez que são comuns em ambientes impactados.

Nosso estudo revelou um número reduzido de eritrócitos binucleados em *K. scorpioides*. Esse tipo de eritrócito possui dois núcleos na célula, que podem estar separados ou associados, com dimensões e cores semelhantes⁽⁴⁰⁾. Diversos elementos abióticos podem afetar a existência ou ausência de anormalidades nucleares em eritrócitos de répteis. Em nosso estudo, pequenas alterações na temperatura da água foram observadas nos pontos de captura dos animais. Çavas e Ergene-Gözükara⁽⁴¹⁾ constataram que o aquecimento da água causou danos ao DNA em *Mugil cephalus*, o que foi confirmado pela presença de MN e núcleos binucleados.

Uma avaliação conjunta de diversas metodologias utilizadas em biomonitoramento ambiental, combinada com biomarcadores mutagênicos, fornece conclusões sólidas e confiáveis sobre a saúde animal e o meio ambiente. Isso pode auxiliar na seleção de medidas a serem tomadas em áreas afetadas por atividades humanas. Devido à influência desses parâmetros no metabolismo, crescimento, disponibilidade de nutrientes e toxicidade, a pesquisa em biomonitoramento ambiental deve utilizar animais aquáticos como biomonitoradores⁽⁴²⁾.

Nesse contexto, regiões afetadas pelo crescimento populacional descontrolado apresentam recursos ambientais comprometidos por fontes antrópicas, como resíduos domésticos e industriais, que prejudicam o solo, a fauna, a flora e os recursos hídricos⁽⁴³⁾. Além disso, o mesmo autor registrou a influência desses fatores em um ambiente aquático localizado em uma região urbanizada, o que teve impacto significativo na qualidade da água e na vida animal. Neste estudo, os níveis de OD detectados no ambiente natural não estavam em conformidade com os padrões ambientais, diferentemente do

que observamos para o pH. Do ponto de vista ambiental, esses parâmetros são indicadores cruciais, pois, quando presentes em baixas concentrações na água, a sobrevivência de diversas espécies pode se tornar impossível ⁽⁴⁴⁾.

Além dos corpos d'água, o solo também é eficaz na detecção de poluentes ^(44,45). Eles podem reter elementos-traço, como xenobióticos, que impactam a vida aquática. Para monitorar áreas impactadas, seus elementos químicos devem ser analisados. Apesar da baixa presença de Al, Pb, Fe, Cu, Mn e Zn na natureza, eles são tóxicos por serem reativos e mutagênicos, causando estresse oxidativo e danos irreparáveis ao DNA quando em baixas concentrações ^(46,47).

Registrarmos altas concentrações de Ca e Mg em áreas urbanas, bem como de H+Al em regiões com vegetação. A ausência desses componentes pode indicar solo contaminado, pois, quando combinados, impedem que essas substâncias causem danos tóxicos às plantas, que servem de alimento para diversos animais. O transporte superficial de elementos químicos no solo, facilitado pela chuva, permite o acesso aos corpos d'água e, consequentemente, a poluição, além de causar desequilíbrios ecossistêmicos.

Altos níveis nas regiões verdes indicam que o solo ainda não foi afetado por poluentes e que está bem preservado. Segundo Silva *et al.* ⁽²³⁾, a alta CTC do solo permite a retenção de nutrientes e poluentes iônicos, reduzindo assim a poluição das águas e afetando negativamente a saúde animal.

Neste estudo, os níveis de MO no solo foram elevados. Santos e Zanello ⁽⁴⁸⁾ também relataram altos níveis de MO em solos do Maranhão, confirmado que seu possível acúmulo resulta em alta CTC, como encontrado neste estudo. O Cu é comumente encontrado em solos argilosos devido à sua facilidade de lixiviação de nutrientes. Eles são componentes vitais para a reprodução de tartarugas, particularmente produção de ovos, transporte de oxigênio, geração de energia e atividade enzimática ⁽⁴⁹⁾.

Em contraste, as deficiências de Zn foram mais frequentes em solos argilosos em áreas urbanas. Prezotti e Garçoni ⁽¹⁹⁾ argumentaram que altas doses de fertilizantes, particularmente fosfatos, poderiam reduzir consideravelmente a presença de Zn em Acrisols. Altos níveis de Cu e Zn são essenciais para as funções enzimáticas dos organismos vivos. No entanto, em baixas concentrações, podem prejudicar a saúde animal.

Os altos níveis de Fe e Na documentados em áreas urbanas podem indicar a presença de poluentes. Embora sejam naturalmente encontrados no solo, ainda podem ser introduzidos diretamente por meio de atividades humanas e industriais. Lima *et al.* ⁽⁴⁴⁾ observaram altas concentrações de Fe em solos de uma região com vegetação no estado de Minas Gerais, Brasil. No entanto, a ausência de parâmetros legais para a detecção e análise desses elementos em ecossistemas dificulta a implementação de ações que preservem e mitiguem seus efeitos diretos sobre esses recursos.

5. Conclusão

Nosso estudo fornece dados pioneiros sobre alterações nucleares e MN nos eritrócitos de *K. scorpioides*, demonstrando diferenças e relações significativas entre espécimes capturados em diferentes ambientes e estações climáticas. Documentamos a ausência dessas anormalidades em indivíduos cavigens, diferentemente daqueles de vida livre, sem diferenças nas respostas mutagênicas entre os sexos. É importante enfatizar que um tamanho amostral adequado, uma delimitação geográfica clara e o uso de biomarcadores citológicos confiáveis, como os utilizados neste estudo, são essenciais para a obtenção de dados precisos, representativos e robustos, auxiliando na conservação e na compreensão da saúde

e biologia das tartarugas amazônicas em diferentes ambientes e estações do ano. Embora anomalias nucleares tenham sido detectadas nos espécimes de vida livre, elas não sinalizam necessariamente impactos ambientais graves. No entanto, indicam a necessidade de biomonitoramento contínuo das áreas protegidas e da manutenção de medidas de conservação voltadas para as tartarugas amazônicas, a fim de reduzir os efeitos em áreas protegidas que praticam o uso sustentável da biodiversidade no Brasil.

Declaração de conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflitos de interesses.

Declaração de disponibilidade de dados

Maiores informações sobre os dados e metodologias serão disponibilizadas pelo autor correspondente mediante solicitação.

Contribuições do autor

Conceituação: Licar-Rodrigues, CA., Medeiros, AM., Carvalho-Neta, RNF., Sousa, AL. Análise formal: Licar-Rodrigues, CA., Carvalho-Neta, RNF., Morey, GAM., Sousa, AL. Investigação: Licar-Rodrigues, CA., Medeiros, AM., Pereira, EP., Noleto, KS. Metodologia: Licar-Rodrigues, CA., Medeiros, AM., Carvalho-Neta, RNF., Sousa, AL. Validação: Licar-Rodrigues, CA., Carvalho-Neta, RNF., Morey, GAM., Sousa, AL. Investigação: Licar-Rodrigues, CA., Medeiros, AM., Pereira, EP., Noleto, KS. Redação (rascunho original): Licar-Rodrigues, CA. Redação (revisão e edição): Licar-Rodrigues, CA., Carvalho-Neta, RNF., Morey, GAM., Sousa, AL. Aquisição de financiamento: Medeiros, AM., Carvalho-Neta, RNF., Sousa, AL.

Referências

1. Cabrera MR, Colantonio SE. 1997. Taxonomic revision of the South American subspecies of the turtle *Kinosternon scorpioides*. Journal Herpetology. 1997; 31:507-513. Disponível em: <https://doi.org/10.2307/1565602>
2. Medeiros AM, Rodrigues CAL, Pereira EP, Cunha FAG, Ferreira DIS, Chaves EP, Chaves LPFA, Lima BC, Pereira LA, Sousa AL. Reproductive biology and habitat characterization of the Scorpion Mud Turtle *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1776) in the Amazon-Cerrado ecotone region, northeastern Brasil. Brazilian Journal of Biology. 2024; 84(e285306):1-13. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.285306>
3. Júnior GS, Balestra RAM, Luz VLF. Breve histórico da conservação dos quelônios amazônicos no Brasil. In: Balestra RAM. Manejo conservacionista e monitoramento populacional de quelônios amazônicos. Brasília: Ibama, p. 11-14, 2016. Disponível em: <https://www.ibama.gov.br/sophia/cnia/livros/PANqueloniosamazonicos.pdf>
4. Pereira LA, Sousa AL, Cutrim MVJ, Moreira EG. Características ecológicas do habitat de *Kinosternon Scorpoides scorpioides* Linnaeus, 1766 (Reptilia, Chelonia, Kinosternidae) no município de São Bento – Baixada Maranhense (Maranhão, Brasil). Boletim do Laboratório de Hidrobiologia. 2007; 20:9-14. Disponível em: <https://cajapio.ufma.br/index.php/blabohidro/article/view/2026>
5. Valente D, Costa AIC, Carvalho LVB, Dos Santos MVC, Castro VS, Rodrigues DRF, De Falco A. Utilização de biomarcadores de genotoxicidade e expressão gênica na avaliação de trabalhadores de postos de combustíveis expostos a vapores de gasolina. Revista Brasileira de Saúde Ocupacional. 2017; 42(suplemento 1):1-21. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/2317-6369000124415>
6. Matson CW, Palatnikov G, Izlamzadeh A, Mc Donald TJ, Autenrieth RL, Donnelly KC, Bickham JW. 2005. Chromosomal damage in two Species of aquatic turtles (*Emys orbicularis* and *Mauremys caspica*) inhabiting contaminated sites in Azerbaijan. Ecotoxicology. 2005; 14, 1-13. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10646-005-0001-0>
7. Ryan PB, Burke TA, Hubal EAC, Cura JJ, McKone TE. Using Biomarkers to Inform Cumulative Risk Assessment. Environmental Health Perspectives. 2007; 115, 833-840. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1867975/>
8. Ramsdorff WA, Vicari T, Almeida MIM, Artoni RF, Cestari MM. 2012. Handling of *Astyanax* sp. for biomonitoring in Cangüiri Farm within a fountainhead (Iraí River Environment Preservation Area) through the use of genetic biomarkers. Environmental Monitoring and Assessment. 2012; 184, 5841-5849. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10661-012-2752-4>
9. Flores M, Yamaguchi MU. Teste do micronúcleo: uma triagem para avaliação genotóxica. Revista Saúde e Pesquisa. 2008; 1(3):337-340. Disponível em: <https://periodicos.unicesumar.edu.br/index.php/saudpesq/article/view/907>
10. Obiakor M, Okonkwo JC, Nnabude P, Ezeonyejiaku CD. Eco-ecotoxicology: micronucleus assay in fish erythrocytes as in situ aquatic pollution. Journal of Animal Science Advances. 2012; 2:123-133. Disponível em: <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:33690814>
11. Moll D, Moll EO. The ecology, exploitation and conservation of river turtles. New York: Oxford University Press, 2004; 393p. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/oso/9780195102291.001.0001>

12. Ministério do Meio Ambiente (MMA), Lista Ramsar – Sítios Ramsar no Brasil. 2000. Disponível em: <https://rsis.ramsar.org/ris/1020>
13. Brasil. Decreto nº. 5.758, de 13 de abril de 2006, que institui o Plano Nacional Estratégico de Áreas Protegidas, Brasília: Diário Oficial. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2006/Decreto/D5758.htm
14. Martinhão DGS, Lobato E. 2004. Cerrado – Correção do Solo e Adubação. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2004, 416p. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/555355/cerrado-correcao-do-solo-e-adubacao>
15. Grisolia CK, Rivero CLG, Starling FLRM, Silva ICR, Barbosa AC, Dorea JG. Profile of micronucleus frequencies and DNA damage in different species of fish in a eutrophic tropical lake. *Genetics and Molecular Biology*. 2009; 32:138–143. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1415-4757200900500009>
16. Fonseca LA. Biomarcadores de estresse e carcinogênese: um estudo em *Chelonia mydas*. Vitoria: Universidade Federal do Espírito Santo, 2014. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas. Disponível em: <https://repositorio.ufes.br/server/api/core/bitstreams/d92f0833-e498-4015-8182-207d119b1be2/content>
17. Brasil. Resolução CONAMA nº. 357, de 17 de março de 2005. Publicada no Diário Oficial nº. 53 em 18 de março de 2005. Disponível em: <https://www.siam.mg.gov.br/sla/download.pdf?idNorma=2747>
18. Brasil. Resolução CONAMA nº. 430, de 13 de maio de 2011. Publicada no Diário Oficial nº. 92 em 16 de maio de 2011. Disponível em: https://conama.mma.gov.br/?option=com_sisconama&view=processo&id=1835
19. Prezotti LC, Guarconi AM. 2013. Guia de interpretação de análise de solo e foliar. Vitória: Incaper, 2013, 104 p. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1042994/1/Doc206.pdf>
20. Zapata LM, Bock BC, Orozco LY, Palacio JA. Application of the micronucleus test and comet assay in *Trachemys callirostris* erythrocytes as a model for in situ genotoxic monitoring. *Ecotoxicology Environmental Safety*. 2016; 127:108–116. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.01.016>
21. Latorre MA, López González EC, Siroski PA, Poletta GL. Basal frequency of micronuclei and hematological parameters in the Side-necked Turtle, *Phrynnops hilarii* (Duméril & Bibron, 1835). *Acta Herpetologica*. 2015; 10:1-31-37. Disponível em: https://doi.org/10.13128/Acta_Herpetol-14988
22. Frossard A, Vieira LV, Carneiro MTWD, Gomes LC, Chippari-Gomes AR. 2020. Accumulation of trace metals in eggs and hatchlings of *Chelonia mydas*. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2020; 62:126654. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2020.126654>
23. Silva CC, Klein RD, Barcarolli IF, Niachini A. Metal contamination as a possible etiology of fibro papillomatosis in juvenile female green sea turtles *Chelonia mydas* from the Southern Atlantic Ocean. *Aquatic Toxicology*. 2016; 170:42–51. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.11.007>
24. Herrera, V. H. Q., Baena, J. P. 2017. Genotoxic Biomarkers in Erythrocytes of *Lepidochelys olivacea* (Cheloniidae) from Colombia. *Acta Biológica Colombiana* 22(3), 322-330. Disponível em: <https://doi.org/10.15446/abc.v22n3.58688>
25. Casini S, Caliani I, Giannetti M, Marsili L, Maltese S, Coppola D, Biachi N, Campani T, Ancora S, Caruso C, Furii G, Parga M, D'Agostino A, Fossi MC. First ecotoxicological assessment of *Caretta caretta* (Linnaeus, 1758) in the Mediterranean Sea using an integrated nondestructive protocol. *Science of The Total Environment*. 2018; 631–632, 1221-1233. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.111>
26. Udroiu I. The micronucleus test in piscine erythrocytes. *Aquatic Toxicology*. 2006; 79:201-20. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.06.013>
27. Carvalho-Neta RNF, Pinheiro-Sousa DB, De Macedo Sobrinho IC, Yarbrough Horton E, Almeida ZS, Tchaicka L, Sousa AL. Genotoxic and hematological parameters in *Collossoma macropomum* (Pisces, Serrasalmidae) as biomarkers for environmental impact assessment in a protected area in northeastern Brasil. *Environmental Science and Pollution Research International*. 2015; 4(1):1. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4748-4>
28. Poletta GL, Larriera A, Kleinsorge E, Mudry MD. Caiman latirostris (broad-snouted caiman) as sentinel organism for genotoxic monitoring: Basal values determination of micronucleus and comet assay. *Mutation Research*. 2008; 650:202–209. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.12.001>
29. Zúñiga-González G, Torres-Bugarián O, Zamora-Perez A, Gómez-Meda BC, Ramos Ibarra ML, Martínez-González S, González-Rodríguez A, Luna Aguirre J, Ramos-Mora A, Ontiveros-Lira D, Gallegos-Arreola MP. Differences in the number of micronuclei in erythrocytes among young and adult animals including humans: Spontaneous micronuclei in 43 species. *Mutation Research*. 2001; 494:161–167. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s1383-5718\(01\)00180-2](https://doi.org/10.1016/s1383-5718(01)00180-2)
30. Cafofo-Silva EG, Delariva RL, Affonso IP. Distribuição espaço temporal de *Scinax fuscovarius* (Lutz, 1925) (Anura, Hylidae) em Maringá – PR, Brasil. *Revista em Agronegócios e Meio Ambiente*. 2009; 2, 431-445. Disponível em: <https://periodicos.unicesumar.edu.br/index.php/rama/article/view/1142>

31. Moron SE, Lima LBD, Vieira LPL, Morais PB, Andrade RLT. Monitoramento e caracterização da qualidade da água do rio Javaés. In: Pinheiro RT. 2019. Biodiversidade na região da ilha do Bananal, Tocantins: EDUFT, 2019, 150p.
32. Gabiatti S. Avaliação da genotoxicidade do rio Caçador, Seara – SC através da formação de micronúcleos em *Astyanax* sp, para análise da presença de contaminantes. In: Oliveira RJ. Águas e florestas: desafios para conservação e utilização. Guarujá: Cientifica Digital, 2021, 400p. Disponível em: <https://doi.org/10.37885/210504527>
33. Castanô GV, Cabagna MZ, Prieto Y, Manzano AS. Analysis of genotoxicity in erythrocytes of turtles (*Phrynops hilarii*) from anthropized and natural sites of entre ríos, Argentina. Journal of Basic & Applied Genetics. 2020; 31:15-22. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.35407/bag.2020.31.01.02>
34. Borges ÂO, Erickson J, Silva LA, Fantin C, Domingos-Moreira FXV. Mercury bioaccumulation, genotoxic and biochemical biomarkers reveal the health status of yellow-spotted Amazon River turtles (*Podocnemis unifilis*) in the environmental protection area in the Amazon. Acta Amazonica. 2022; 52:254-263. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1809-4392202201230>
35. Gonçalves VF. Anomalias nucleares eritrocitárias como ferramentas de biomonitoramento por aves no Cerrado. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 2022. Tese de Doutorado em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil, 84p. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/35157>
36. Souza JM, Montalvão AR, Silva AR, Rodrigues ASL, Malafaia CA. Pioneering study on cytotoxicity in Australian parakeets (*Melopsittacus undulatus*) exposed to tannery effluent. Chemosphere. 2017; 175:521– 533. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.02.087>
37. Araújo APC, Lima VS, Vieira JEAV, Mesak C, Malafaia G. First report on the mutagenicity and cytotoxicity of ZnO nanoparticles in reptiles. Chemosphere. 2019; 235:556-564. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.164>
38. Carrasco KR, Tilbury KL, Myers MS. Assessment of the Piscine Micronucleus Test as an in situ biological indicator of Chemical Contaminant Effects. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 1990; 47:2123–2136. Disponível em: <https://doi.org/10.1139/f90-237>
39. Quero AAM, Ferré D, Zarco A, Cuervo PF, Gorla NBM. Erythrocyte micronucleus cytome assay of 17 wild bird species from the central Monte desert, Argentina. Environmental Science and Pollution Research. 2016; 23:25224–25231. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7638-5>
40. Jindal R, Verma S. In vivo genotoxicity and cytotoxicity assessment of cadmium chloride in peripheral erythrocytes of *Labeo rohita* (Buchanan-Hamilton, 1822). Ecotoxicology and Environmental Safety. 2015; 118:1–10. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.04.005>
41. Çavas T, Ergene-Gözükara S. Teste de micronúcleo em células de peixes: um bioensaio para monitoramento in situ da poluição genotóxica no ambiente marinho. Environmental and Molecular Mutagenesis. 2005; 46:64-70. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/em.20130>
42. Moro GV, Torati LS, Luiz DB, Matos FT. 2013. Monitoramento e manejo da qualidade da água em pisciculturas. [recurso eletrônico]. In: Rodrigues APO, Lima AF, Alvez AL, Rosa DK, Torati LS, Santos VRV (Editores técnicos). Piscicultura de água doce: multiplicando conhecimentos. Brasília: Embrapa, 2013, 440p. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1083545/1/cap.5.pdf>
43. Gomes JNS. Qualidade da água do rio Pericumã e sua relação com ocupação urbana em Pinheiro – Ma. Belém: Universidade Federal do Pará, 2017. Dissertação de Mestrado em Recursos Hídricos, Universidade Federal do Pará, Brasil, 108p. Disponível em: <https://repositorio.ufpa.br/jspui/handle/2011/1075>
44. Lima MC, Giacomelli MB, Stupp V, Roberge FD, Barrera PB. Especiação de cobre e chumbo em sedimento do rio Tubarão (SC) pelo método Tessier. Química Nova. 2001; 24(6):734 – 742. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422001000600005>
45. Jesus HC, Costa EA, Mendonça ASF, Zandonade E. Distribuição de metais pesados em sedimentos do sistema estuarino da Ilha de Vitória – ES. Química Nova. 2004; 27(3):378 – 386. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000300004>
46. Essington ME. 2004. Soil and Water Chemistry: An integrative approach. Soil and Water Chemistry: An integrative approach. 2004; CRC Press:534. Disponível em: https://slunik.slu.se/kursfiler/MV0218/20103.1920/Essington_1st_edition.pdf
47. Lushchak VI. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. Aquatic Toxicology. 2011; 101(1):13 – 30. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006>
48. Santos ES, Zanello S. 2016. Análises físico-químicas das águas e de solos do rio canguri. Disponível em: <http://www.diaadiadecacao.pr.gov.br/portals/pde/arquivos/1701-8.pdf>
49. Souza NLN, Carneiro MTWD, Pimentel EF, Frossard A, Freire JB, Endringer DC, Ferreira Júnior PD. 2018. Trace elements influence the hatching success and emergence of *Caretta caretta* and *Chelonia mydas*. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. 2018; 5. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2018.06.007>