

LIANA ROSA

**BIOLOGIA REPRODUTIVA DA TARTARUGA MARINHA *Chelonia mydas*
NO LITORAL PARANAENSE**

Monografia apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas, curso de graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Emygdio Leite de Araújo Monteiro Filho.

Curitiba, 2005.

AGRADECIMENTOS

Agradeço sempre a esta Energia maior que rege o mundo a quem chamo de DEUS, pela vida e pelo valor que dou a ela.

Ao professor, orientador e exemplo: Emygdio L. de A. Monteiro Filho, pela idéia e apoio na realização deste trabalho.

À Flávia Maria Guebert pela ajuda inestimável, determinação e amizade.

Ao Instituto de Pesquisas Cananéia por apoiar este trabalho e ser uma instituição na qual acredito e invisto.

À Universidade Federal do Paraná, por ajudar na minha formação profissional e pessoal. Especialmente o pessoal do Laboratório de Vertebrados, pelas constantes ajudas.

Ao pessoal do CEM e de Pontal do Sul por acreditarem e apoiarem este trabalho

Ao Zão pelo interesse, apoio e confecção das fotos.

Ao Nino, Dona Rosa e Eliane do laboratório de Histotecnologia da UFPR pela confecção das lâminas histológicas.

Aos amigos, queridos, que completam a minha história e sem os quais não faria nada.

À minha família, em especial meu irmão Leandro por acreditar em mim, apoiar-me e ser uma pessoa especial.

Aos meus pais por me ajudarem a ser quem sou e tornarem possível a realização de meus sonhos.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	II
LISTA FIGURAS	IV
LISTA TABELAS	V
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	3
2.1. Área de estudo.....	3
2.2. Procedimentos.....	5
3. RESULTADOS	7
4. DISCUSSÃO	17
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
6. ANEXO	30

LISTA DE FIGURAS

BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

FIGURA 1	- Imagem de satélite da área de estudo que compreende o litoral do Estado do Paraná.....	4
FIGURA 2	- Distribuição em classes de tamanho de 27 indivíduos de <i>Chelonia mydas</i> coletados no litoral do Estado do Paraná de abril de 2004 a maio de 2005.....	7
FIGURA 3	- Relação entre as medidas de comprimento e largura de carapaça dos 27 indivíduos de <i>Chelonia mydas</i> coletados no litoral do Estado do Paraná.....	8
FIGURA 4	- Correlação entre as medidas de Comprimento de carapaça e Comprimento de gônada de 24 indivíduos de <i>Chelonia mydas</i> coletados no litoral paranaense que apresentaram tecido gonadal fixado adequado para o estudo.....	10
FIGURA 5	- Corte histológico de gônada masculina de <i>Chelonia mydas</i> visualizado em aumento de 40 vezes e corado com H/E com um dos túbulos seminíferos (A) evidenciado.....	11
FIGURA 6	- : Detalhe de corte histológico de gônada masculina de <i>Chelonia mydas</i> visualizado em aumento de 200 vezes e corado com H/E com túbulos seminíferos (A) evidenciados.....	11
FIGURA 7	- Corte histológico de gônada feminina de <i>Chelonia mydas</i> com presença de ovócitos com citoplasma aumentado visualizado em aumento de 100 vezes e corado com H/E. Presença de ovócitos (A) granulosos, (B) com vesículas centrais e (C) vesículas periféricas. Tecido renal (D) aparente....	12
FIGURA 8	- Corte histológico de gônada feminina de <i>Chelonia mydas</i> com presença de ovócitos com vesículas periféricas no citoplasma visualizado em aumento de 200 vezes e corado com H/E.....	13
FIGURA 9	- Corte histológico de gônada feminina de <i>Chelonia mydas</i> com presença de ovócitos com grânulos citoplasmáticos visualizado em aumento de 400 vezes e corado com H/E.....	13
FIGURA 10	- Relação entre Medida de comprimento de carapaça em centímetros (Cc) e Estágio de desenvolvimento gonadal estabelecido para a amostra de 6 fêmeas de <i>Chelonia mydas</i> coletadas no litoral paranaense.....	15

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	- Dados de 27 indivíduos de <i>Chelonia mydas</i> coletadas no litoral paranaense contendo: Comprimento de carapaça (Cc), textura gonadal, Comprimento gonadal (Cg) e sexo dos exemplares.....	9
TABELA 2	- Dados de 6 fêmeas de <i>Chelonia mydas</i> coletadas no litoral paranaense contendo: nº da amostra, Comprimento de carapaça (Cc), descrição do estágio de desenvolvimento e classificação referente á fase de desenvolvimento.....	14

1. INTRODUÇÃO

No mundo são conhecidas sete espécies de tartarugas marinhas. Particularmente no Brasil, cinco espécies estão presentes ao longo do litoral, são elas: *Caretta caretta*, *Chelonia mydas*, *Dermochelys coriacea*, *Eretmochelys imbricata* e *Lepidochelys olivacea*.

Dentre as espécies que ocorrem no país, a tartaruga verde, como é conhecida a espécie *Chelonia mydas*, é a que apresenta maior distribuição, sendo encontrada em todo litoral brasileiro (Sanches, 1999). Vive próxima a regiões costeiras e ilhas possuindo hábito bentônico, normalmente em profundidades de até vinte metros (Márquez, 1990). A média do comprimento da carapaça é de 120 centímetros e 230 quilogramas para indivíduos adultos (Lutz, 1997). Quando filhote, até cerca de 20 centímetros de comprimento, é caracterizada como onívora, especializando o hábito alimentar até basicamente a herbivoria quando adulta (Bjorndal, 1988).

Os principais sítios reprodutivos desta espécie estão situados em ilhas oceânicas, ocorrendo eventualmente desovas no continente. No Brasil, os principais sítios são o Arquipélago de Fernando de Noronha (PE), Atol das Rocas (RN) e Ilha da Trindade (ES), sendo este último o maior no Atlântico Sul (Marcovaldi & Marcovaldi, 1999).

Há cerca de 25 anos o Projeto Tamar do IBAMA desenvolve trabalhos com tartarugas marinhas ao longo da costa brasileira, grande parte realizados em áreas de reprodução, envolvendo principalmente tópicos sobre a conservação. Os trabalhos priorizam registros de captura acidental e aspectos da biologia reprodutiva, mais especificamente análises de desovas (Marcovaldi & Marcovaldi, 1987 ; Marcovaldi *et al.*, 1998).

Estudos sobre a biologia reprodutiva são realizados em todo mundo, mas trabalhos envolvendo estudo gonadal são pouco comuns. Trabalhos pioneiros nesta área tiveram seus resultados publicados na década de oitenta com a espécie *Caretta caretta*. O método utilizado foi principalmente a laparoscopia que analisa características externas da gônada, como cor e textura. Estudos envolvendo análise histológica de gônadas também são recentes e envolveram basicamente filhotes recém eclodidos e adultos (*cf.* Lutz & Musick, 2003).

Particularmente na região do Estado do Paraná, somente três trabalhos foram realizados. D'Amato (1991 a, b) registrou as espécies que ocorrem no estado e fez referência especial à ocorrência da espécie *Lepidochelys olivacea*, pouco comum para o sul do Brasil. Posteriormente, Guebert (2004) analisou a ecologia alimentar e mortalidade de *Chelonia mydas* no litoral do estado.

Considerando a ampla distribuição das tartarugas marinhas ao longo do litoral brasileiro e a profunda carência de informações sobre a sua biologia reprodutiva, particularmente em áreas de alimentação, este estudo visa a determinação da razão sexual da população e o estágio de desenvolvimento através de análise histológica das gônadas da tartaruga marinha *Chelonia mydas* no litoral do Estado do Paraná.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Área de estudo

O litoral paranaense (Figura 1) abriga boa parcela do que resta da Floresta Atlântica Brasileira, a terceira Floresta Tropical mais ameaçada do mundo. A biodiversidade local é assegurada pela variedade do meio físico. Essa diversidade reflete-se também nos ecossistemas. A região apresenta áreas de formações pioneiras como manguezais, marismas e restingas. Com uma extensão de 98 km é constituído por uma planície costeira com cordões litorâneos, recebendo direta e indiretamente a influência do Oceano Atlântico (IPARDES, 1989).

Duas baías caracterizam o litoral paranaense recebendo o nome de cidades que as margeiam. As Baías de Paranaguá (25°30' S e 48°40' W) e de Guaratuba (25°50' S e 48°40' W) dividem a costa paranaense em três setores: Praia Deserta, Praia de Leste e Praia do Sul. A Praia Deserta se situa ao norte de Paranaguá, desde a Ponta Inácio Dias até a Foz do Rio Ararapira, nos limites com o Estado de São Paulo. A Praia de Leste compreende as praias que se estendem de Pontal do Sul até balneário de Caiobá. A Praia do Sul abrange as praias situadas ao sul da Baía de Guaratuba até a Ilha do Saí, nos limites com o Estado de Santa Catarina (Maack, 1981).

A Baía de Paranaguá (25°30' S e 48°40' W), uma das mais vastas do Brasil (677km²) penetra 50 km pelo interior do continente e possui uma largura máxima de 10 km. Subdivide-se em outras baías menores: de Antonina, das Laranjeiras, dos Pinheiros e de Guaraqueçaba. Há em seu interior várias ilhas tais como Ilha do Mel, Ilha das Peças, Ilha da Cotinga, Ilha Rasa da Cotinga, Ilha das Cobras, Ilha das Pedras entre outras. A Baía de Guaratuba (25°50' S e 48°40' W) encontra-se mais ao sul, estendendo-se 15 km terra adentro e com uma largura máxima de 5 km. Suas principais ilhas são: Ilha Pescaria, Ilha Capinzal, Ilha Mato, Ilha dos Ratos e outras. Aparecem ainda como acidentes importantes do litoral a Ilha do Superagui (25°20' S e 48°10' W), separada do continente pela Baía dos Pinheiros e pelo Canal do Varadouro e a Restinga de Ararapira, situada na parte do norte da Praia Deserta (Wons, 1982).

O Complexo Estuarino da Baía de Paranaguá (CEP) apresenta área de manguezal correspondendo a 80% da existente em todo o litoral do estado (Noernberg, 2001). Os manguezais são áreas sujeitas aos fluxos e refluxos das marés, localizadas nas áreas protegidas das baías. Apresentam vegetação altamente especializada, observam-se principalmente três espécies: *Rhizophora mangle*, *Laguncularia racemosa* e *Aricenia tormentosa* (IPARDES, 1989).



Figura 1: Imagem de satélite da área de estudo que compreende o litoral do Estado do Paraná.

2.2. Procedimentos

A coleta de dados em campo foi realizada no período de abril de 2004 a maio de 2005. As praias amostradas, entre os balneários de Pontal do Sul e Praia de Leste (cerca de 20 km) no município de Pontal do Paraná, foram monitoradas quinzenalmente. Alguns animais foram diretamente encaminhados ao Centro de Estudos do Mar (CEM/UFPR) por diferentes fontes, principalmente pescadores artesanais. No CEM/UFPR as tartarugas marinhas encontradas foram armazenadas em "freezer". Durante a estadia em Pontal do Sul ocorreram necropsias, tomadas de dados e coleta das gônadas. Em todas as tartarugas marinhas encontradas foi realizada necropsia levando-se em consideração que muitos animais coletados estavam em avançado estágio de decomposição sem presença de tecidos internos.

Os dados coletados, inicialmente, foram o peso dos animais e as medidas básicas de tamanho: Comprimento Total do Corpo, Comprimento Total de Carapaça e Largura da Carapaça. Após estes procedimentos, os animais foram abertos a partir da parte ventral (plastrão). Retirou-se musculatura, estruturas ósseas e alguns órgãos. As gônadas foram retiradas e fixadas em ALFAC (álcool, formol e ácido acético) ou eventualmente em formol a 10% e conservadas em álcool a 80%. Após a fixação das gônadas foram tomados os dados morfométricos de comprimento, em centímetros, e textura. Tomou-se como padrão para a análise de comprimento a gônada direita. A classificação da textura dividiu-se em granulosa ou lisa (*cf.* Lutz e Musick, 2003).

Do material gonadal fixado foram retirados cortes de, no máximo, 5 milímetros. Os cortes seguiram padrão transversal medial com relação à gônada. Os fragmentos foram levados ao laboratório de Histotecnologia (Setor de Ciências Biológicas – UFPR) onde foi feita a preparação de lâmina histológica permanente. A coloração utilizada foi Hematoxilina e Eosina (H/E) e Tricrômico de Masson (anexo).

A análise feita em microscópio ótico visou a detectar o sexo e estágio de desenvolvimento gonadal de machos e fêmeas (presença de células germinativas, ovogênese e espermatogênese). Na análise do material foram adotados os critérios de desenvolvimento proposto por Garcia e Garcia (1991)

que dividem as fases do desenvolvimento ontogenético em gametogênese, fertilização e processos de desenvolvimento do embrião para vertebrados em geral. Na gametogênese têm-se três fases: de proliferação, crescimento e maturação. Os eventos que ocorrem na gametogênese são específicos para machos e fêmeas.

Na proliferação em fêmeas as ovogônias dividem-se mitoticamente e aumentam seu número. Estas células, quando cessam a proliferação, aumentam de volume e preparam-se para divisão meiótica que origina ovócitos primários caracterizando a fase de crescimento. Na maturação ocorre a vitelogênese preparando o ovo para a fertilização.

Em machos ocorre a proliferação na qual espermatócitos são produzidos por mitose. Na fase de crescimento os espermatócitos situam-se no lúmen dos túbulos seminíferos e produzem espermátides. Os processos que geram espermatozóides a partir da espermátide caracterizam a fase de maturação.

CrITÉRIOS adotados por Lutz (2003) foram considerados para caracterizar gônadas femininas e masculinas. Os indivíduos caracterizados como fêmeas apresentaram gônada condensada com células germinativas bem aparentes (presença de ovócito maior que células adjacentes). Os testículos foram caracterizados por um tecido menos condensado com muitos ductos aparentes e células com tamanho homogêneo. Os ductos são os túbulos seminíferos e as células que formam o ducto são basicamente as da linhagem espermática.

Os ovários podem apresentar ovócitos em diferentes estágios de desenvolvimento, sendo caracterizados mais desenvolvidos os que apresentam vesículas ou grânulos citoplasmáticos. As vesículas e grânulos citoplasmáticos caracterizam a reserva de nutrientes na célula, podendo ser o início da vitelogênese. Vitelo é um termo morfológico que serve para indicar as diferentes substâncias nutritivas presentes no ovo (Garcia e Garcia, 1991).

Os resultados obtidos a partir da análise gonadal foram utilizados para determinação da razão sexual da população, bem como caracterização do estágio de desenvolvimento. Dados morfométricos e de maturação gonadal foram sobrepostos aos dados de comprimento de carapaça dos animais procurando estabelecer uma possível relação. Para aferir uma possível variação da proporção sexual de 1:1 foi utilizado o teste χ^2 .

3. RESULTADOS

Durante o período amostrado foram coletadas 27 tartarugas marinhas da espécie *Chelonia mydas* encontradas mortas na região de estudo e que apresentaram tecidos (gônadas) em boas condições de estudo ou em estágios iniciais de decomposição. Algumas amostras foram obtidas de animais que chegaram vivos ao Centro de Estudos do Mar (UFPR) para a tentativa de reabilitação, mas não sobreviveram. Porém, a maioria das amostras é proveniente de animais encalhados mortos nas praias sofrendo ação externa (maré, animais necrófagos, microrganismos, entre outros).

Os indivíduos da amostra apresentaram comprimento de carapaça variando entre 32 e 66.5 centímetros (Tabela 1), com média aproximada de 41.09 (± 7.89) centímetros. Foram definidas oito classes de tamanho com intervalo de cinco centímetros cada. A figura 2 representa o número de indivíduos distribuídos nas classes de tamanho.

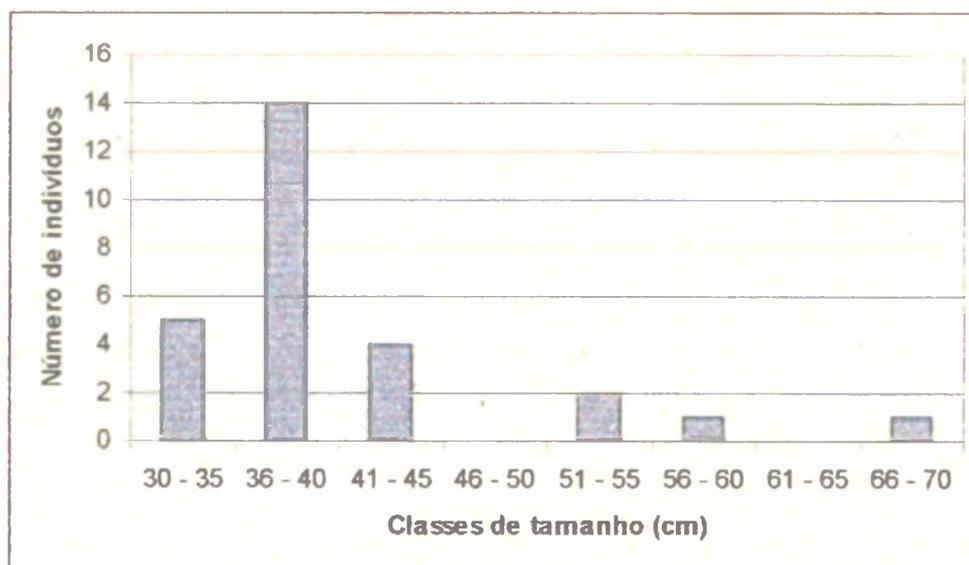


Figura 2: Distribuição em classes de tamanho de 27 indivíduos de *Chelonia mydas* coletados no litoral do Estado do Paraná de abril de 2004 a maio de 2005.

Todos os indivíduos foram considerados juvenis segundo o tamanho máximo de comprimento e largura de carapaça definidos nos estudos de Carr & Ogren (1960) e Hirth & Carr (1970). Nestes estudos, os dados das medidas

de comprimento e largura de carapaça foram correlacionados ($r= 0.9757$) traçando-se o tamanho mínimo de maturidade sexual de 70 centímetros. (Figura 3).

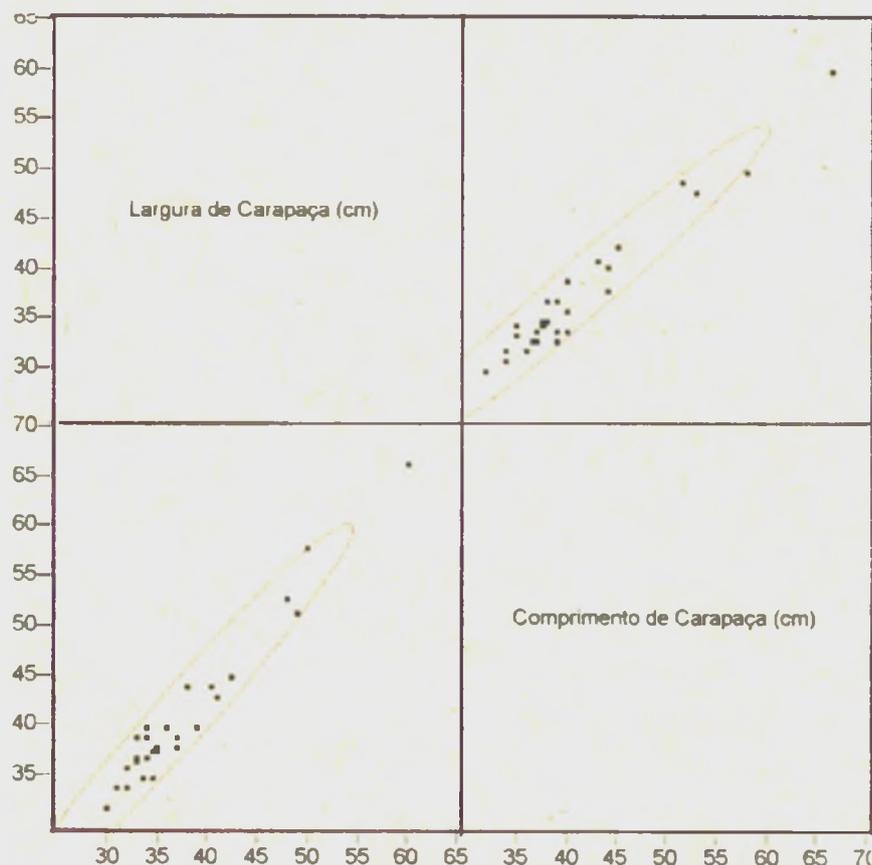


Figura 3: Relação entre as medidas de comprimento e largura de carapaça dos 27 indivíduos de *Chelonia mydas* coletados no litoral do Estado do Paraná.

As gônadas, após a retirada e fixação, foram medidas para correlacionar com estágio de desenvolvimento e a textura foi analisada. Os resultados desta análise estão na Tabela 1. A fixação de 3 gônadas impossibilitou a coleta da medida de comprimento das mesmas. Esses indivíduos foram excluídos de análises posteriores.

Dentre os 27 indivíduos de *Chelonia mydas* coletados, 15 foram considerados machos e 12, fêmeas (Tabela 1). A amostra apresenta proporção sexual de 1 macho para cada 0.8 fêmea ($\chi^2 = 0.34$; g.l.=1; $0,75 > P > 0,50$)

A média de comprimento de carapaça foi de 40.92cm (± 6.31) para fêmeas e 41.23 cm (± 8.71) para machos.

Os dados de textura de gônadas apresentaram categorias diferentes da proposta inicial que se baseava em granulosa ou lisa. Três gônadas não se enquadraram nos padrões propostos apresentando textura pouco granulosa. Desta forma, uma nova categoria foi estabelecida.

Sete tartarugas apresentaram gônadas granulosas, 16 lisas e 3 pouco granulosas, dentre as 27 gônadas analisadas (Tabela 1). A correspondência entre textura gonadal granulosa para fêmeas e lisa para machos foi válida sob alguns aspectos. As 7 gônadas com textura granulosa eram femininas. Entre as 17 gônadas com textura lisa, 5 eram femininas e 11 masculinas. As 3 gônadas com textura pouco granulosa eram masculinas.

Tabela 1: Dados de 27 indivíduos de *Chelonia mydas* coletadas no litoral paranaense contendo: Comprimento de carapaça (Cc), textura gonadal, Comprimento gonadal (Cg) e sexo dos exemplares.

Nº	Cc	Textura gônada	Cg	Sexo
1	58,0 cm	Lisa	5,4 cm	Macho
2	40,0 cm	Lisa	-	Macho
3	51,5 cm	Granulosa	5,0 cm	Fêmea
4	45,0 cm	Lisa	5,6 cm	Fêmea
5	36,0 cm	Lisa	5,5 cm	Macho
6	39,0 cm	Granulosa	-	Fêmea
7	37,0 cm	Lisa	4,9 cm	Macho
8	39,0 cm	Lisa	4,6 cm	Macho
9	32,0 cm	Granulosa	5,1 cm	Fêmea
10	66,5 cm	pouco granulosa	4,2 cm	Macho
11	38,0 cm	Lisa	4,8 cm	Macho
12	34,0 cm	Lisa	2,6 cm	Fêmea
13	37,5 cm	Lisa	5,4 cm	Macho
14	39,0 cm	Granulosa	4,4 cm	Fêmea
15	36,5 cm	Lisa	4,2 cm	Macho
16	37,0 cm	Lisa	5,2 cm	Macho
17	43,0 cm	Lisa	4,6 cm	Fêmea
18	40,0 cm	pouco granulosa	5,1 cm	Macho
19	37,5 cm	Lisa	4,4 cm	Fêmea
20	38,0 cm	Granulosa	4,5 cm	Fêmea
21	35,0 cm	Lisa	6,6 cm	Fêmea
22	40,0 cm	Lisa	6,5 cm	Macho
23	44,0 cm	Lisa	6,9 cm	Macho
24	35,0 cm	pouco granulosa	4,9 cm	Macho
25	44,0 cm	Granulosa	5,5 cm	Fêmea
26	53,0 cm	Granulosa	6,8 cm	Fêmea
27	34,0 cm	Lisa	-	Macho

A correlação entre as medidas de comprimento de carapaça e comprimento de gônadas de 24 indivíduos de *Chelonia mydas* ($r = 0.1449$) foi pequena (Figura 4).

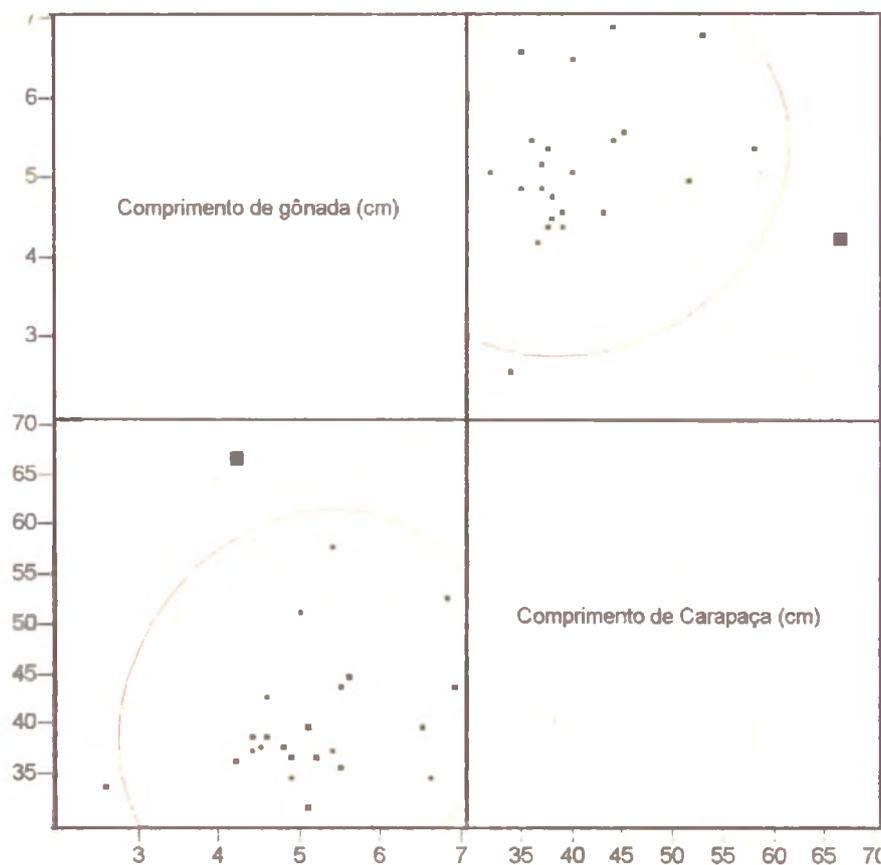


Figura 4: Correlação entre as medidas de Comprimento de carapaça e Comprimento de gônada de 24 indivíduos de *Chelonia mydas* coletados no litoral paranaense que apresentaram tecido gonadal fixado adequado para o estudo.

A gametogênese dos 27 indivíduos de *Chelonia mydas* encontra-se na fase de proliferação e crescimento. O número de células germinativas aumenta e estas começam a adquirir características próprias.

Em relação aos 15 machos analisados, não foram encontrados espermatozóides. Porém, os ductos espermáticos são bem evidentes contendo muitas células da linhagem espermática em desenvolvimento (Figura 5 e 6).

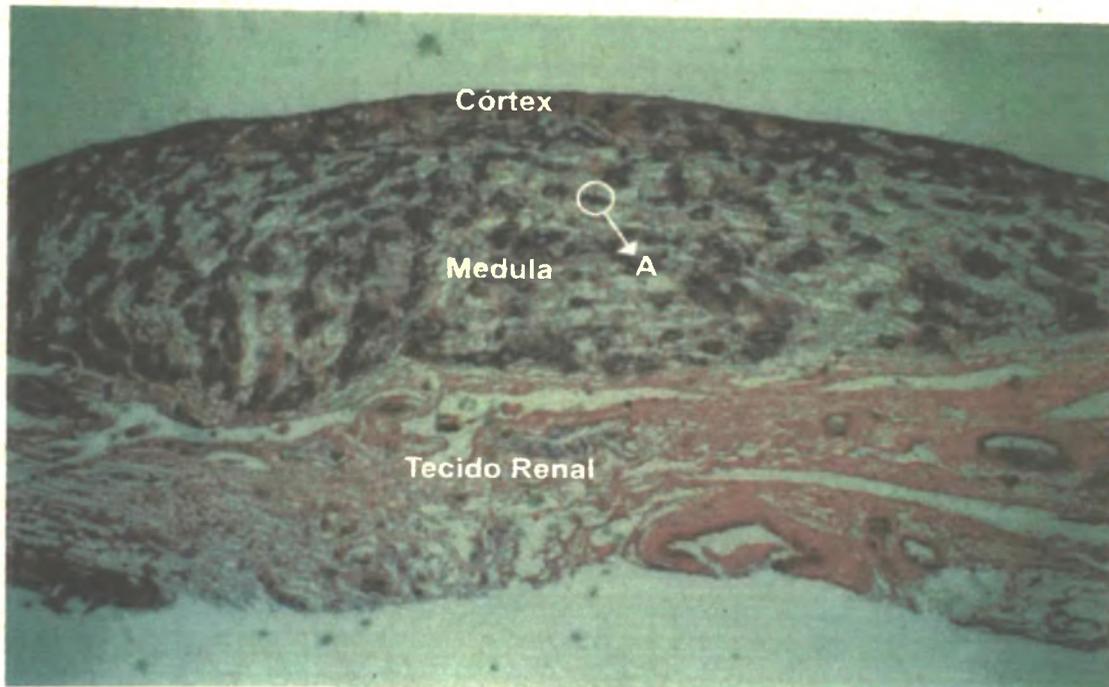


Figura 5: Corte histológico de gônada masculina de *Chelonia mydas* visualizado em aumento de 40 vezes e corado com H/E com um dos túbulos seminíferos (A) evidenciado.

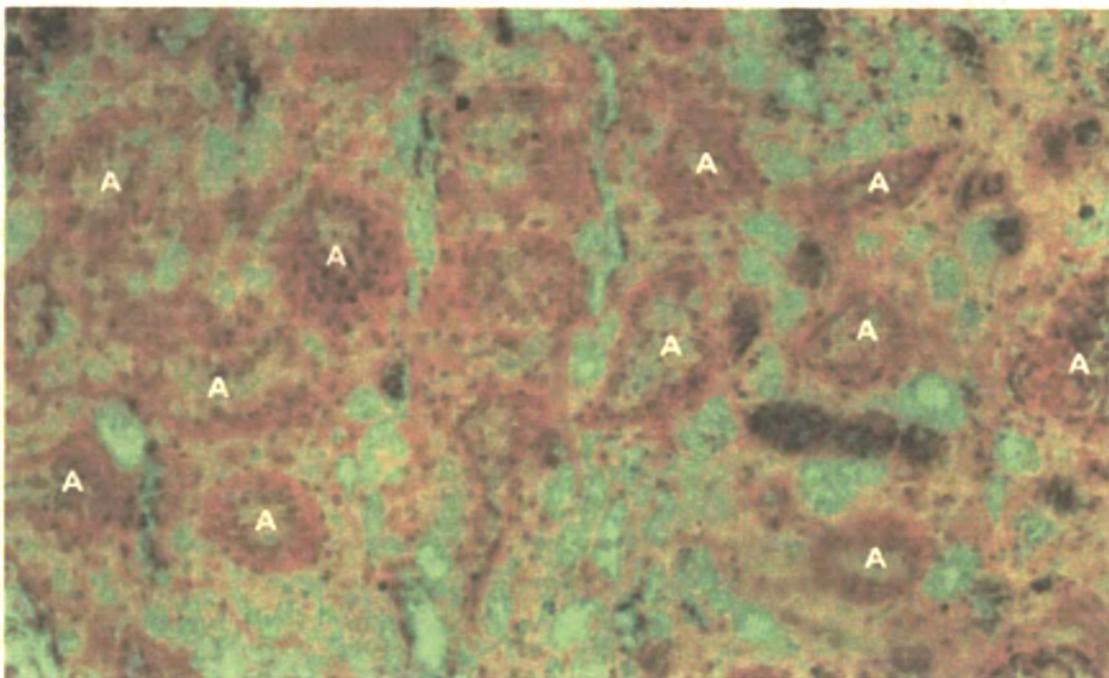


Figura 6: Detalhe de corte histológico de gônada masculina de *Chelonia mydas* visualizado em aumento de 200 vezes e corado com H/E com túbulos seminíferos (A) evidenciados.

Nas 12 fêmeas analisadas, todas apresentaram ovócitos com citoplasma aumentado de tamanho o que indica uma fase de crescimento (Figura 7). O predomínio na amostra foi de ovócitos granulares, levando-se em consideração que pode ser reflexo da decomposição inicial do tecido. Seis amostras de gônadas femininas apresentaram degeneração dos tecidos evidente não sendo consideradas para análise de maturação sexual. As 6 amostras que apresentaram boa preservação dos tecidos na análise histológica indicam que as vesículas e grânulos presentes nos ovócitos são reflexo do desenvolvimento dos mesmos (Figuras 8 e 9).

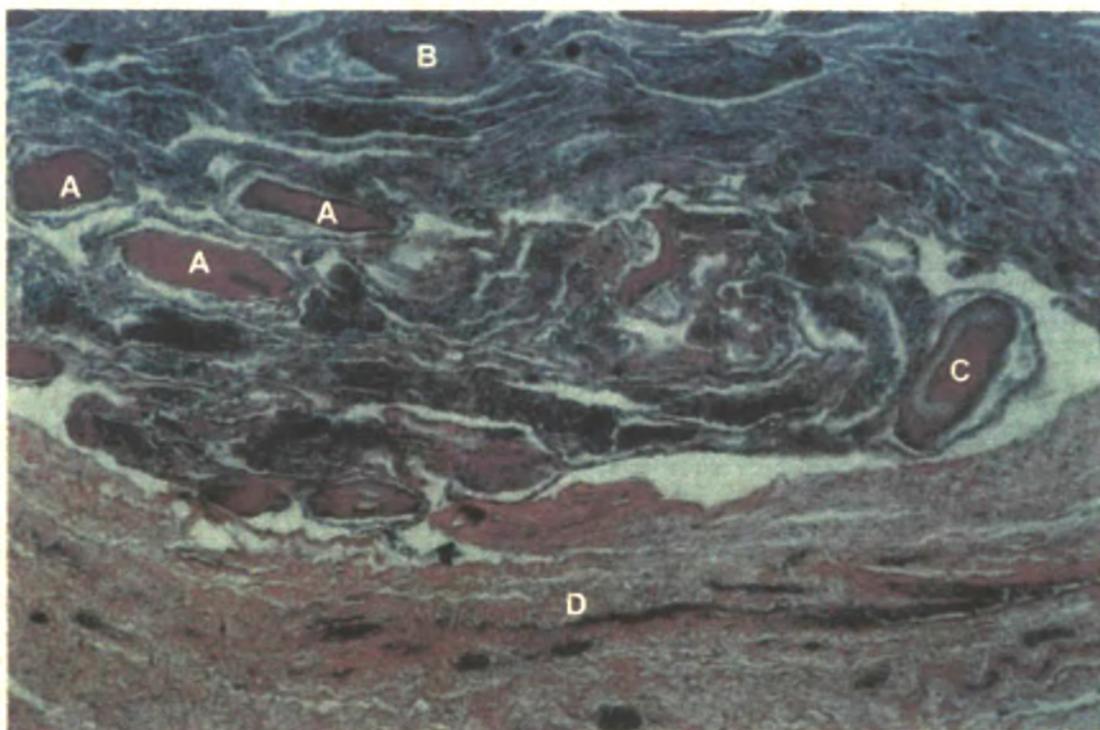


Figura 7: Corte histológico de gônada feminina de *Chelonia mydas* com presença de ovócitos com citoplasma aumentado visualizado em aumento de 100 vezes e corado com H/E. Presença de ovócitos (A) granulosos, (B) com vesículas centrais e (C) vesículas periféricas. Tecido renal (D) aparente.

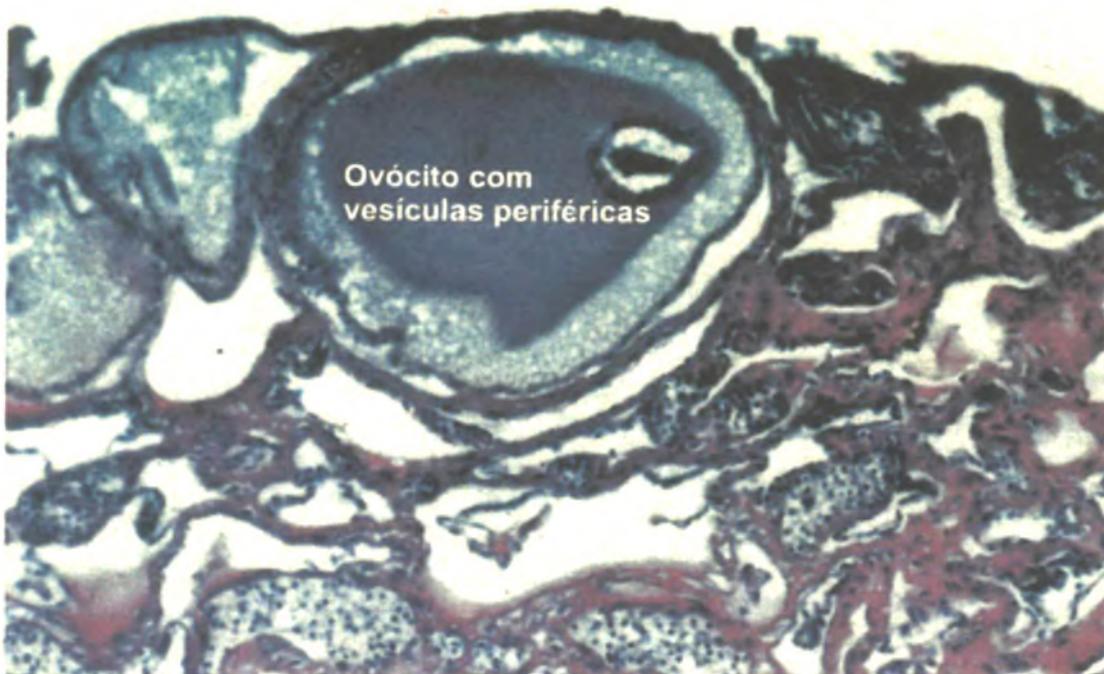


Figura 8: Corte histológico de gônada feminina de *Chelonia mydas* com presença de ovócitos com vesículas periféricas no citoplasma visualizado em aumento de 200 vezes e corado com H/E.



Figura 9: Corte histológico de gônada feminina de *Chelonia mydas* com presença de ovócitos com grânulos citoplasmáticos visualizado em aumento de 400 vezes e corado com H/E.

Da análise das 6 amostras de tecido gonadal pode-se estabelecer quatro estágios de desenvolvimento dos ovócitos. A definição dos estágios foi estabelecida pela característica da maioria dos ovócitos encontrados nos cortes histológicos analisados (Tabela 2)

O estágio inicial (Ho) caracteriza-se pela homogeneidade do citoplasma. Nesta fase as células têm seu citoplasma aumentado, mas a síntese de material de reserva não é evidente. A segunda fase (Vc) caracteriza-se pela presença de vesículas no citoplasma. Porém, a distribuição não é uniforme e os grânulos não são evidentes. A próxima fase de desenvolvimento (Vp) apresenta ovócitos com vesículas no córtex do citoplasma, e grânulos aparentes. O último estágio de desenvolvimento (Gr) encontrado na amostra é caracterizado por ovócitos granulados e com maior aumento de citoplasma. Isso indica uma produção grande de material de reserva podendo ser caracterizada como vitelogênese inicial.

Tabela 2: Dados de 6 fêmeas de *Chelonia mydas* coletadas no litoral paranaense contendo: nº da amostra, Comprimento de carapaça (Cc), descrição do estágio de desenvolvimento e classificação referente á fase de desenvolvimento.

Amostra	Cc	Estágio de Desenvolvimento	Fase
4	45.0 cm	Vesículas periféricas, presença inicial de grânulos.	Vp
9	32.0 cm	Ovócitos homogêneos, presença inicial de vesículas.	Ho
19	37.5 cm	Ovócitos vesiculares, presença inicial de grânulos.	Vc
21	35.0 cm	Ovócitos homogêneos, presença inicial de vesículas.	Vc
25	44.0 cm	Ovócitos vesiculares, presença inicial de grânulos.	Vc
26	53.0 cm	Até ovócito granuloso.	Gr

Os dados de comprimento de carapaça (Cc) foram relacionados com a fase de desenvolvimento estabelecida para cada fêmea (Figura 10)

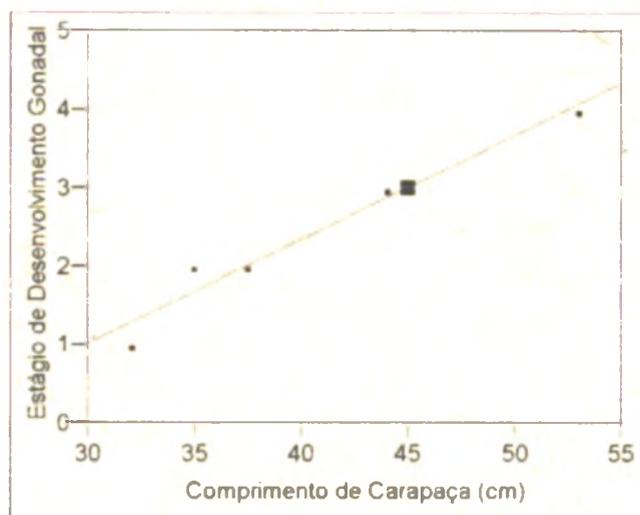


Figura 10: Relação entre Medida de comprimento de carapaça em centímetros (Cc) e Estágio de desenvolvimento gonadal estabelecido para a amostra de 6 fêmeas de *Chelonia mydas* coletadas no litoral paranaense.

A análise mostrou uma relação evidente entre comprimento de carapaça e a fase de desenvolvimento gonadal do indivíduo ($r^2 = 0.9542$; $F = 105.19$; $p = 0.0005$). A relação nos mostra que a gônada se desenvolve concomitante com o crescimento do animal.

A amostra de tecido gonadal da fêmea com menor medida de comprimento de carapaça (32 cm) foi a que apresentou ovócitos com citoplasma mais homogêneo, contendo poucas vesículas e grânulos. A amostra da fêmea com maior comprimento de carapaça (53 cm) apresentou tanto ovócitos homogêneos quanto com vesículas e granulosos, o que indica a presença de diferentes fases de desenvolvimento de ovócitos dentro da gônada.

Muitas lâminas histológicas apresentam tecido renal aparente, fato evidenciado nas fotomicrografias (Fig. 7 e 5). Isto se deve ao fato de que a gônada está justaposta ao rim dorsalmente. Os sistemas renal e gonadal evolutivamente desenvolveram-se unidos, tendo evidências nas estruturas atuais.

Durante a necropsia e retirada da gônada, parte do tecido renal foi retirado juntamente com o intuito de não danificar a estrutura gonadal. Deve-se levar em consideração, também, que alguns tecidos apresentavam degeneração inicial, diminuindo a resistência do tecido e, conseqüentemente dificultando a retirada sem danificar o mesmo.

4. DISCUSSÃO

Estudos na área de biologia reprodutiva de tartarugas marinhas estão restritos a poucas populações, geralmente realizados em áreas de reprodução com fêmeas adultas e filhotes recém eclodidos (cf. Lutz & Musick, 2003). Isto se deve à facilidade na coleta dos dados. As fêmeas, quando sobem à praia para desovar, tornam-se vulneráveis e os ninhos contêm número grande de filhotes que quase não apresentam defesas (Mendonça, 1981). Os estudos também se concentram no campo da conservação. Particularmente no Brasil, a tendência é mantida. Não existem dados publicados com populações juvenis nem qualquer estudo relacionado à biologia reprodutiva em áreas de alimentação.

A carência de informações sobre a biologia reprodutiva das tartarugas marinhas juvenis no Brasil demonstra a necessidade de se desenvolver estudos mais aprofundados sobre este tópico. Limpus & Walter (1980) citam a falta de estudos em áreas de alimentação. Mendonça (1981) acredita que trabalhos envolvendo tartarugas marinhas em estágios imaturos são negligenciados indevidamente, uma vez que podem contribuir para a compreensão de características referentes ao crescimento dos animais e estágios de maturação na natureza, bem como da utilização de áreas de alimentação. Cientes do comportamento de migração devido às áreas de alimentação e nidificação encontrarem-se a longas distâncias (Pough, 1993), é viável um estudo para identificar os níveis de maturação e razão sexual da população do litoral paranaense. Para que os esforços de conservação sejam mais eficazes, é necessário pesquisar o indivíduo juvenil em sua área de alimentação, garantindo que atinja a fase adulta.

As tartarugas marinhas amostradas neste estudo foram todas consideradas juvenis quando comparadas a estudos de Carr & Ogren (1960) e Hirth & Carr (1970). Durante o período de amostragem foram coletados alguns exemplares sub adultos de *Chelonia mydas* de ambos os sexos e em diferentes estágios de desenvolvimento. A amostragem total (incluindo os indivíduos não considerados nas análises de desenvolvimento) indica que a região abriga uma população predominantemente juvenil.

Sabe-se que a população de tartarugas juvenis tem crescido em algumas localidades em decorrência de alguns trabalhos de conservação em áreas de reprodução. Estes trabalhos fizeram com que o número de desovas aumentasse e garantiu a maior sobrevivência possível de ovos e filhotes (Bellini, 1993). Deve-se levar em consideração que a mortalidade diminuiu devido esforços de conscientização em comunidades costeiras que consumiam os produtos que se originam de tartarugas marinhas e por ser considerado crime no país o consumo destes produtos (Bellini, 1993).

A região do litoral do Estado do Paraná, com baías bem recortadas, é de alta produtividade (IPARDES, 1989) e também local ideal para proteção de vários animais. Além disso, o número de indivíduos que conseguem chegar à fase adulta é muito reduzido e devido ao tamanho e resistência, a mortalidade nesta fase é comparativamente menor (Lutz e Musick, 2003).

Collazo *et al.* (1992) considera juvenis, tartarugas verdes de até 50 centímetros de comprimento de carapaça. Relata que a partir deste tamanho os indivíduos já começam a entrar em maturação sexual o que os descaracterizaria como juvenis. Já Zug & Glor (1998) consideram juvenis indivíduos de até 75 centímetros de carapaça através da análise esqueletocronológica. A dificuldade em se estabelecer um padrão vem da grande diferença de crescimento dos indivíduos. Mendonça (1981) encontrou em alguns estudos, uma diferença de crescimento variando de 0.96 a 19 centímetros ao ano para *Chelonia mydas*. Sabe-se que tartarugas marinhas não têm um crescimento contínuo uniforme sendo que filhotes crescem mais rapidamente e os adultos tendem a ter o crescimento estagnado (Frazer & Ehrhart, 1985). A diferença discrepante encontrada nos estudos de Mendonça pode ser relacionada a amostras de populações em diferentes estágios de desenvolvimento, mas reflete que o crescimento em tartarugas marinhas está longe de ser considerado padrão. Ross (1985) relata que a diferença na disponibilidade de alimento afeta diretamente populações de tartarugas verdes. É um fator extremamente limitante de crescimento e aumento reprodutivo e demográfico. Além disso, *Chelonia mydas* apresenta crescimento mais lento por sua dieta ser basicamente herbívora (Limpus & Walter, 1980), não podendo ser comparado ao crescimento de outras espécies.

A relação entre crescimento e idade é muito específica para cada população em cada área. A especificidade deve-se ao fato de cada população depender da área que a sustenta para crescer. Os trabalhos que relatam idades de maturação sexual, geralmente levam em consideração análises de tamanho de carapaça os quais são válidos local e temporalmente uma vez que o crescimento deve ser específico para cada população em função de características como disponibilidade de alimento e temperatura. Porém, a maturação sexual só pode ser definida através de estudos de desenvolvimento gonadal. Estes estudos fornecem dados consistentes de desenvolvimento, independente de um tamanho mínimo de comprimento de carapaça.

Muitos estudos de desenvolvimento gonadal vêm sendo realizados no mundo nas últimas duas décadas, a maioria baseada na técnica da laparoscopia. (cf. Lutz & Musick, 2003). Para *Chelonia mydas* do litoral paranaense a caracterização de 4 estágios de desenvolvimento gonadal foi estabelecida segundo critérios de Garcia & Garcia 1991, propostos para vertebrados em geral. Isto porque estudos específicos de histologia gonadal com tartarugas marinhas não foram suficientes para estabelecer um padrão para as espécies. A análise de desenvolvimento realizada neste estudo através da histologia gonadal foi uma das poucas no mundo. Os estudos histológicos realizados até então foram feitos em filhotes recém eclodidos e indivíduos adultos (Lutz & Musick, 2003) Análises de tartarugas marinhas juvenis em diferentes estágios de maturação foram realizados somente com tartarugas da espécie *Caretta caretta* utilizando a técnica da laparoscopia (Limpus, 1990). Nestes estudos foram estabelecidas fases de desenvolvimento segundo características gonadais externas como cor, textura e tamanho dos ovócitos. As fases dividem-se em: filhote, pré-puberdade, puberdade e adulta.

Deve-se levar em consideração que a textura e cor são características que podem mudar quando o indivíduo morre. Uma vez que a análise de desenvolvimento através da técnica de laparoscopia é realizada em indivíduos vivos os dados obtidos não devem ser comparados aos dados coletados de indivíduos mortos.

Os estágios de desenvolvimento gonadal foram estabelecidos para amostras de 6 fêmeas. Na pequena amostra foi encontrada uma relação de dependência entre o comprimento da carapaça e o estágio proposto no estudo

de desenvolvimento gonadal. A análise de regressão mostrou uma dependência de 98% sendo considerada extremamente alta. Isto implica que o crescimento da carapaça é um indicativo do desenvolvimento gonadal sendo os valores específicos para cada população. Estudos mais aprofundados com amostras maiores devem ser realizados para corroborar estes dados preliminares.

A relação entre o comprimento gonadal e comprimento de carapaça não foi verificada. O resultado mostra que o crescimento da gônada é independente do crescimento da carapaça. Isto significa que o tamanho da gônada na população de *Chelonia mydas* no litoral paranaense não está relacionada com o estágio de desenvolvimento proposto neste trabalho.

A determinação sexual ocorre através da temperatura de incubação dos ovos o que permitiu a implantação de numerosas técnicas de manejo que influenciam o número de nascimentos de machos e fêmeas. Muitos trabalhos de determinação de razão sexual se baseiam na medição da temperatura média de incubação nos ninhos. Os 3 trabalhos publicados no Brasil de análise da razão sexual de determinadas populações utilizaram este método (Marcovaldi *et al.*, 1997; Mrosovsky *et al.*, 1999; Godfrey *et al.*, 2000). Isto significa que pouco se sabe a respeito do status populacional de tartarugas marinhas juvenis e adultas.

Valadez *et al.* (2000) acreditam que a sexagem feita com filhotes pode apresentar dados que não correspondem á realidade. A razão sexual muda dependendo da distribuição temporal uma vez que o sexo é definido pela temperatura e esta muda dentro da estação reprodutiva. Isso significa que dependendo da época do ano a diferença no número de machos e fêmeas varia amplamente. Porém, descrições matemáticas de padrões de temperatura mostram que o equilíbrio no nascimento de machos e fêmeas é garantido dentro da estação reprodutiva (Godley *et al.*, 2002). Análises de sexagem em filhotes recém eclodidos tendem a dar uma proporção entre machos e fêmeas de 1:1 quando a amostragem é temporal. Mas poucos são os dados referentes a esta proporção em populações com indivíduos jovens e sub adultos (Bolten *et al.* 1992). Esta análise é essencial para garantir o desenvolvimento adequado e o suporte genético das futuras populações de tartarugas marinhas.

Segundo Bolten *et al.* (1992), o sexo de tartarugas marinhas da espécie *Chelonia mydas* imaturas não pode ser determinado externamente. Isso indica que não existe dimorfismo sexual em *Chelonia mydas* juvenis. Somente quando chegam a fase adulta é que o macho pode desenvolver uma cauda longa com cloaca terminal.

Godley (2002) encontrou um dimorfismo estatístico na população de *Chelonia mydas* na Ilha de Ascensão. Em sua amostra a média da medida de carapaça de machos era menor que a média de medida de carapaça das fêmeas. Porém, nada indica que as idades dos indivíduos sejam as mesmas. Bolten *et al.* (1992) não encontrou diferença significativa de crescimento entre machos e fêmeas indicando que talvez não exista um dimorfismo real. A diferença estatística encontrada no trabalho de Godley (2002) pode ser reflexo de uma amostra composta de indivíduos com idades diferentes e que, conseqüentemente, terão tamanhos distintos independente do sexo.

A amostra da população do litoral paranaense apresentou média de comprimento de carapaça maior para machos comparativamente com fêmeas. Entretanto, a diferença encontrada não representa necessariamente que haja dimorfismo, pois a população agora amostrada, possivelmente é composta por animais de idades diferentes.

Por não apresentar dimorfismo aparente, algumas técnicas foram desenvolvidas para identificar a sexagem das populações de tartarugas marinhas. Dentre as técnicas desenvolvidas estão a laparoscopia, a histologia e a análise sorológica. Segundo Lutz & Musick (2003), somente dois métodos de identificação sexual são considerados eficazes para tartarugas marinhas imaturas: análise histológica e sanguínea. Na análise histológica as células da linhagem germinativa são identificadas e os testes sanguíneos avaliam a dosagem do hormônio testosterona. A histologia é pouco utilizada apesar de ser uma das ferramentas seguras para identificar o sexo dos indivíduos.

Diferentes pesquisadores trabalham com identificação sexual em tartarugas marinhas através de laparoscopia (Limpus, 1990; Valadez *et al.*, 2000; Godley *et al.*, 2002). Esta técnica consiste na identificação de ovários e testículos segundo a textura da gônada: granulosa e lisa, respectivamente. Uma incisão é feita na parte inferior do plastrão e um canalículo é introduzido na cavidade abdominal para visualização do tecido gonadal (Meylan & Meylan,

1994). A laparoscopia é considerada rápida e os resultados imediatos são vantajosos em relação a outras técnicas (Wood *et al.*, 1983). Porém é um método invasivo que pode trazer conseqüências fatais, principalmente para filhotes (Lutz & Musick, 2003).

Na análise realizada neste estudo a textura da gônada em indivíduos juvenis de *Chelonia mydas* só indicou o sexo de fêmeas, com ressalvas. Todas as sete gônadas caracterizadas com textura granulosa eram fêmeas, porém cinco fêmeas apresentaram gônadas lisas. Ainda nas análises, foi estabelecido um novo padrão dentro da amostra. Quatro gônadas apresentavam pouca granulosidade, formando um grupo específico. As gônadas caracterizadas como pouco granulosas comparativamente a outras coletadas, eram masculinas. As 16 gônadas caracterizadas lisas pertenciam a 11 machos e cinco fêmeas. Portanto, o estudo indicou uma margem de erro grande para identificação do sexo segundo textura da gônada. Este método é utilizado por muitos pesquisadores que trabalham geralmente com animais vivos, mas para esta população não se mostrou efetiva sob a maioria dos aspectos.

Os estudos que envolvem análise de testosterona sanguínea são os mais utilizados em populações juvenis e adultas. A desvantagem na utilização deste método é que indivíduos machos muito juvenis podem apresentar concentrações pequenas do hormônio o que dificulta a determinação sexual. Geralmente, os trabalhos que fazem análise de concentração de testosterona sanguínea utilizam outra técnica concomitante para corroborar os resultados. A dificuldade na captura dos indivíduos também pode ser um fator limitante para esta técnica.

A amostra apresentou um equilíbrio esperado significativo entre machos e fêmeas de 1:1, não sendo significativa a pequena diferença. Porém, número superior de machos da amostra não corroborou a maioria dos trabalhos de sexagem populacional realizados no mundo. Geralmente as fêmeas são mais abundantes, considerado um fator positivo para a população.

O número inferior de fêmeas em uma população pode ser conseqüência de um manejo populacional inadequado ou um efeito da amostragem restrita. Diez & van Dam (2003) apresentaram um estudo recente de determinação sexual utilizando a técnica de dosagem de testosterona sanguínea validada em alguns casos pela laparoscopia na população de tartarugas de pente

(*Eretmochelys imbricata*) em Porto Rico. Foi encontrado na amostra número maior de machos, sendo que o desequilíbrio não foi considerado significativo, mas os pesquisadores afirmaram que número maior de machos não é comum na maioria dos estudos atuais. Ressaltam que fatores locais podem estar envolvidos e que o dado não deixa de ser preocupante para o futuro desta população.

As diferentes técnicas de manejo empregadas em áreas de reprodução de tartarugas marinhas podem estar interferindo na caracterização populacional. A ampla manipulação de ninhos pode interferir na determinação sexual. Algumas técnicas, principalmente as que utilizam deslocamento de desovas precisam ser mais estudadas e suas implicações conhecidas. Estudos sobre as conseqüências do manejo que vem sendo realizado há anos em populações de tartarugas marinhas ainda não existem. Sabe-se que nas populações aparentemente têm aumentado o número de juvenis, mas nenhum estudo de proporção sexual foi feito até então. Os estudos restringem-se a avaliação do manejo, particularmente do número de eclosões em ninhos transferidos (Bellini *et al.*, 1991; Bellini, 1993; Gonchrosky *et al.*, 1995; Marcovaldi e D'Amato, 1998). Estes estudos mostram que o manejo afeta a eclosão, mortalidade, entre outros fatores. É de se esperar que a proporção sexual esteja sendo afetada também. Mas novos trabalhos precisam ser realizados para avaliar o status das populações.

Deve-se levar em consideração, também, a falta de padronização na coleta de dados (como peso e medidas) e técnicas de análise, como a utilização de diferentes modelos matemáticos para trabalhos realizados com tartarugas marinhas em todo o mundo. Green (1993) apontou as diferenças encontradas em técnicas de mensuração para coleta de dados, particularmente de *Chelonia mydas*, ressaltando a dificuldade em correlacionar dados de trabalhos distintos. Bjorndal & Bolten (1988) já haviam discorrido amplamente sobre a mesma falta de padronização na coleta de dados desenvolvendo um estudo com diferentes modelos matemáticos e estabelecendo o que apresenta melhores resultados na análise populacional para tartarugas marinhas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BELLINI, C. Comparação evolutiva do número de desovas por temporada reprodutiva, no Arquipélago de Fernando de Noronha (PE), entre 1984 e 1992. In: *45ª Reunião anual da sociedade brasileira para o progresso da ciência*, 1993. Recife. Anais, Ref.2-E.1, Recife: UFPE. Pág. 522.
- BELLINI, C. & ALMEIDA, A. de P.L.S. de. Análise comparativa da eclosão em ninhos de tartarugas marinhas transferidos e in situ, nas praias entre o Rio Doce e a Barra Seca, ES. In: *Congresso Brasileiro de Zoologia*, nº 18, 1991. Salvador. Resumos, [S.l.:s.n.], pag. 333.
- BJORNDAL, K. A. & BOLTEN, A. B., 1988. Growth rates of immature green turtles, Chelonia mydas, on feeding grounds in the Southern Bahamas, *Copeia*, nº 3, pag. 555-564.
- BJORNDAL, K. A.; BOLTEN A. B.; BENNETT R. A.; JACOBSON E. R.; WRONSKY T. J.; VALESKI J. J.; ELIAZAR P. J., 1998. Age and growth in sea turtles: limitations of skeletochronology for demographic studies, *Copeia*, nº 1, pag. 23-30.
- BOLTEN, A. B.; BJORNDAL, K. A.; OWENS, D. W.; GRUMBLES, S. 1992. Sex ratio and specific growth rates of immature green turtles, Chelonia mydas, in the Southern Bahamas. *Copeia*, nº 4, pag. 1098-1103.
- CARR A. & OGREN, L. 1960. The ecology and migration of sea turtles. The green turtle in the Caribbean Sea. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* nº 121, pag. 1- 48.
- COLLAZO J. A.; BOULON R. J.; TALLEVAST T. L. 1992. Abundance and Growth Patterns of Chelonia mydas in Culebra, Puerto Rico. *J. of Herp.* vol. 26, nº 3, pag. 293-300.

- D'AMATO, A.F. 1991 Ocorrência de tartarugas marinhas (Testudines: Cheloniidae, Dermochelyidae) no Estado do Paraná (Brasil). *Acta Biol. Leopold.*, [S.l.], vol.13, nº 2, pag.105-110.
- D'AMATO, A.F. 1992. Ocorrência de Lepidochelys olivacea (Testudines: Cheloniidae) para o Estado do Paraná - Brasil. *Acta Biol. Leopold.*, [S.l.], vol. 14, nº 1, pag. 95-97.
- DIEZ, C. E. & VAN DAM, R. P. 2003. Sex ratio of an immature Hawksbill Seaturtle aggregation at Mona Island, Puerto Rico. *J. of Herp.*, vol. 37, nº 3, pag. 533-537.
- FRAZER, N. B. & EHRHART, L. M., 1985. Preliminary growth models for green turtle, Chelonia mydas, and loggerhead, Caretta Caretta, turtles in the wild, *Copeia*, nº 1, pag. 73-79.
- GARCIA, S.M. L.; JECKEL, E.; GARCIA, C. B. *Embriologia*, Editora Artes Médicas, 1991, Porto Alegre, RS, 350 p.
- GODFREY, M.H.; D'AMATO, A.F.; MARCOVALDI, M.Â.; MROSOVSKY, N. Sex ratios of hatchling hawksbill turtles from Bahia, Brazil. *In: 19º Annual Symposium on sea turtle Conservation and biology*, 2000. Texas. Proceedings..., Miami:U. S. Department of Commerce. pag.19. [NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-443]
- GODLEY, B. J.; BRODERICK, A. C.; FRAUENSTEIN, R.; GLEN, F.; HAYS, G. C. 2002. Reproductive seasonality and sexual dimorphism in green turtles. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, vol. 226, pág. 125 -133.

- GONCHROSKY, J.; CAMPANHÃ, C.; SANTOS, D. F. Avaliação das técnicas de manejo em desovas de tartarugas marinhas no litoral norte do Estado da Bahia, Brasil. *In: 8ª Semana Nacional de Oceanografia*. 1995. Rio Grande. Resumos..., Rio Grande: Fundação Universidade do Rio Grande, pág. 66.
- GREEN, D. 1993. Growth rates of wild immature green turtles in Galápagos Islands, Ecuador. *J. of Herp.*, vol. 27, nº 3, pag. 338-341.
- GUEBERT, F. M. 2004 *Ecologia alimentar e mortalidade da tartaruga marinha Chelonia mydas no litoral do Estado do Paraná*. Pontal do Paraná. 34 p. Monografia, UFPR.
- HIRTH, H. F. & CARR, A. 1970. The green turtle in the Gulf of Aden and Seychelles Islands. *Vert. K. Ned. Akad. Wet. (Afd. Nat. Tweede Sect.)* vol. 58, pag. 1 – 44.
- IPARDES, Fundação Edison Vieira. *Zoneamento do litoral paranaense*. Curitiba, 1989.
- LIMPUS, C. J., 1990. Puberty and first breeding in Caretta Caretta. *In 10º Annual Workshop on sea turtle biology and conservation*. Proceedings..., Miami, FL., 1990, pag. 81 – 84 [NQAA Tech. Memo. NMFS – SEFSC – 278]
- LIMPUS, C. J. & WALTER, D. G., 1980. The growth of immature green turtles (Chelonia mydas) under natural conditions. *Herpet.*, vol. 36, nº 2, pp. 162-165
- LUTZ, P. L. *The biology of sea turtles*, CRC Press, vol. 1, New York, 1997.

- LUTZ, P. L.; MUSICK, J. A.; WYNEKEN, J. *The biology of sea turtles*, CRC Press, vol. 2, Washington, 2003.
- MAACK, R. *Geografia física do Paraná*. Editora e Livraria José Olimpo, 1º edição. Rio de Janeiro, 1981.
- MARCOVALDI, M. A. ; BAPTISTOTTE, C. ; DE CASTILHOS, J. C. ; GALLO, B. M. G. ; LIMA, E. H. S. M. ; SANCHES, T. M. & VIEITAS, C. F. 1998. Activities by Projeto Tamar in Brazilian Sea Turtles Feeding Grounds. *Mar. Turtle News.*, nº 80, pag. 5 - 7.
- MARCOVALDI, M.Â.G. de; D'AMATO, A. F. Estudo comparativo do sucesso de eclosão para diferentes tipos de manejo de ninhos da espécie Caretta caretta na Base do Projeto TAMAR/IBAMA de Praia do Forte, Bahia. *In: 22º Congresso Brasileiro de Zoologia*, 1998. Recife. Resumos..., Recife: UFPE, Ref.1120. pag. 285.
- MARCOVALDI, M.Â.; GODFREY, M.H.; MROSOVSKY, N., 1997. Estimating sex ratios of loggerhead turtles in Brazil from pivotal incubation duration. *Can. J. of Zool.*, nº. 75, pag. 755-770.
- MARCOVALDI, M. A. & MARCOVALDI, G. G. 1999. Marine turtles of Brasil: the history and structure of Projeto TAMAR – IBAMA. *Biol. Cons.*, vol. 91. pag. 1 - 41.
- MARCOVALDI, M. Â. & MARCOVALDI, G. G. D. 1987. Projeto Tartaruga marinha: áreas de desova, épocas de reprodução, técnicas de preservação. *Bol. FBCN*, nº 22, pag. 95 - 104.

- MÁRQUEZ, R. M. 1990. FAO Species Catalogue. Vol. 11: Sea turtles of the world. An annotated and illustrated catalogue of sea turtles species know to date. *FAO Fis. Syn.* nº 125, vol 11. Roma, FAO. 81 pag.
- MENDONÇA, M. T., 1981. Comparative growth rates of wild immature green turtle Chelonia mydas and Caretta Caretta in Florida. *J. of Herp.*, vol. 15, nº 4, pag. 444 – 447.
- MEYLAN, P. AP; DAVIS, K.; MEYLAN, A. B. 1994. Predicting sexual maturity of male green turtles from morphological characters. In: *13º annual symposium on sea turtle biology and conservation*. 1994, Proceedings... [NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-341]
- MROSOVSKY, N; BAPTISTOTTE, C.; GODFREY, M.H., 1999 Validation of incubation duration as an index of the sex ratio of hatchling sea turtles. *Can. J. of Zool.*, nº. 77, pag. 831 - 835
- NOERNBERG, M. A. 2001 *Processos morfodinâmicos no Complexo Estuarino de Paranaguá – Paraná – Brasil: Um estudo a partir de dados In situ e LANDSAT-TM*. Curitiba, 180 pag. Tese de Doutorado, UFPR.
- POUGH, F. HARVEY. *A vida dos Vertebrados*. Editora. Atheneu, São Paulo – SP, 1993.
- ROSS, J. P., 1985. Biology of the green turtle, Chelonia mydas, on an Arabian Feeding Ground, *J. of Herp.*, vol. 19, nº 4, pag. 459 – 468.
- SANCHES, T. M. Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da zona costeira e marinha. Termo de referência nº 155/98: <http://www.bdt.org.br/workshop/costa/tartaruga/diagnostico>, acessado em 23/09/2004

- VALADEZ, C. G.; SILVA, F. De A. B.; VAZQUEZ, S. H. 2000. Proporción sexual en crías de la tortuga marina Lepidochelys olivacea, producida en corral de incubación en la playa de anidación La Gloria, Jalisco, México. *Bol. Del Centro de Invest. Biol. Universidad Del Zulia.*, vol. 34, nº 3, pag. 305 – 313.
- ZUG, G. R. & GLOR, R. E., 1998. Estimates of age and growth in a population of green sea turtles (Chelonia mydas) from the Indian River lagoon system, Florida: a skeletochronological analysis. *Can. J. of Zool.*, vol. 76, pag. 1497 – 1506.
- WOOD, J. R.; WOO, F. E.; CRITCHLEY, K. H.; WILDT, D. E.; BUSH, M. 1983. Laparoscopy of the green sea turtle (Chelonia mydas) *Br. J. Herpetol.* Vol. 6, pág. 323 – 327.
- WONS, I. *Geografia do Paraná*. Editora Ensino Renovado, 1ª edição. Rio de Janeiro, 1981.

6. ANEXO

PROTOCOLO

FIXADOR PARA TECIDOS ORGÂNICOS (gônadas de tartarugas marinhas)

Independente do tipo de fixador, sempre utilizar um volume pelo menos cinco vezes superior ao tecido, órgão, gônada (...), a ser fixado. Injetar fixador no interior da parte a ser fixada

ALFAC - Fixador para histologia (álcool + formol + ácido acético)

Para cada 100 ml de ALFAC:

- 85 ml de álcool 80%
- 10 ml de formol 40%
- 05 ml de ácido acético

- Deixar no ALFAC (ou AFA) por 16 horas (rigorosamente) e passar então a amostra para o álcool 70%.

- **Adicionar o Ácido Acético somente na hora de utilizar o fixador.**

PREPARAÇÃO DE LÂMINA HISTOLÓGICA PERMANENTE (gônadas de tartarugas marinhas)

Gônadas retiradas e fixadas em ALFAC por 16 horas e conservadas em álcool 80% por período indeterminado.

Fragmentos retirados para histologia de no máximo 5 milímetros, também conservados em álcool 80% por período indeterminado.

DESIDRATAÇÃO DO MATERIAL (sujeito a alteração de tempo)

Álcool 80% por, no mínimo 2 horas.

Álcool 90% por pelo menos 2 horas.

Álcool 95% durante 1 dia (uma pernoite).

Álcool absoluto:

1º banho – pequenos fragmentos por 45 minutos; maiores por 1 a 1.5 hora.

2º banho – 30 minutos.

3º banho – 30 minutos.

4º banho – 15 minutos.

Álcool absoluto mais xilol (benzol) 50% (meio a meio) – 30 minutos.

Xilol:

1º banho – 15 minutos.

2º banho – 15 minutos.

3º banho – 10 minutos.

EMBLOCAMENTO DO MATERIAL EM PARAFINA

Material levado à parafina líquida, na estufa a 60°C, por 4 horas.

O material pode permanecer na parafina por tempo indeterminado.