



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
ESCOLA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E BIOLÓGICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Adriele Silva Lopes

**Investigação da secreção cutânea de *Phrynops geoffroanus*
(Testudines, Chelidae)**

Goiânia, 2020.

Adriele Silva Lopes

**Investigação da secreção cutânea de *Phrynops geoffroanus*
(Testudines, Chelidae)**

Monografia apresentada a Escola de Ciências Agrárias e Biológicas da Pontifícia Universidade Católica de Goiás como requisito obrigatório para obtenção do Título de Bacharel em Ciências Biológicas.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Matheus Godoy Pires

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Wilian Vaz Silva

Goiânia, 2020

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
ESCOLA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E BIOLÓGICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

BANCA EXAMINADORA DA MONOGRAFIA

Aluno(a): Adriele Silva Lopes

Orientador(a): Prof. Dr. Matheus Godoy Pires

Membros:

1. Dr. Matheus Godoy Pires

2. Ms. Rafael Martins Valadão

3. Dr. Nelson Jorge da Silva Jr

***Dedico este trabalho a minha mãe
Virginia Pereira Lopes e minha irmã
Adriana que sempre me incentivaram a
estudar e respeitar a vida.***

*“Um homem que ousa desperdiçar
uma hora de tempo não descobriu o valor
da vida.”*

Charles Darwin

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Matheus Godoy Pires, pelos ensinamentos e dedicação durante esse tempo em que me orientou, além de sua valiosa contribuição na minha formação como profissional. Saiba que tenho uma grande admiração por você e pelo seu trabalho.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Wilian Vaz Silva pela orientação de sempre, durante todos esses anos de graduação, de convivência tive a oportunidade de aprender muito contigo de crescer profissionalmente e como pessoa, obrigada por me manter motivada durante todo o processo.

À Dra. Marta Regina Magalhães por toda colaboração, conhecimento e por ceder gentilmente o espaço de seu Laboratório de Toxinologia para realização de parte desse estudo.

À minha família, especialmente minha mãe Virginia Pereira Lopes, que sempre incentivou em meus estudos e batalhou muito por isso, me mostrando todos os dias o mais belo da vida e a nunca desistir. À minha irmã Adriana Silva Lopes por estar sempre do meu lado, amo vocês e ao meu padrinho Prof. Dr. Welinton Ribamar Lopes por ser minha inspiração a entrar para o curso de Ciências Biológicas, além de ser um grande cientista e sempre me apoiar.

A meus amigos, em especial Edison Rodrigues, Diego Michel, Max Moraes e Gustavo Marinho que estiveram comigo durante toda essa caminhada, tornando meus dias mais divertidos. Crescemos juntos, choramos, nos apoiamos, viajamos, brigamos algumas vezes e não desistimos. Vou levar vocês sempre comigo.

Aos pesquisadores do ICMBio/RAN Rafael Martins Valadão, Rafael Antônio Machado Balestra, Sônia Helena Santesso Teixeira de Mendonça pela parceria na coleta da espécie, pelo conhecimento, dedicação e convivência durante toda a expedição. A todos os colaboradores da Estação Ecológica de Pirapitinga/MG, que me receberam com grande carinho e por toda a aprendizagem nestes dias.

Ao Centro de Estudos e Pesquisas Biológicas (CEPB) onde estagiei grande parte da minha graduação, a todos os colaboradores e pesquisadores por fazerem parte da minha formação e crescimento como cientista e como pessoa.

Também quero agradecer à Pontifícia Universidade Católica de Goiás e o seu corpo docente que demonstrou estar comprometido com a qualidade e excelência do ensino.

Desejo expressar meus agradecimentos a todas as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram na realização deste trabalho.

Sumário

LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	6
2.1. Objetivo geral	6
2.2. Objetivos específicos	6
3. MATERIAL E MÉTODOS	7
3.1. Área de Estudo	7
3.2. Técnica de Captura	7
3.3. Coleta e armazenamento da secreção	8
3.3. Morfologia e histologia das glândulas	9
3.4. Isolamento e purificação de alcaloides	10
3.5. Fracionamento por cromatografia em fase reversa	11
3.6. Detecção de alcaloides	11
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
4.1. Cromatografia fase reversa	13
4.2. Teste colorimétrico para alcaloides	14
5. CONCLUSÕES	16
6.REFERÊNCIAS	17

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) Foto: Rafael Martins Valadão 2
- Figura 2:** Locais amostrados das espécies capturadas de *Phrynops geoffroanus* no reservatório da UHE Três Marias e Vereda Grande próxima a ESEC Pirapitinga, localizado em Minas Gerais no Município de Morada Nova. 8
- Figura 3:** Instalação da armadilha tipo funil (funnel trap) no reservatório da UHE Três Marias Foto: Sônia Helena Santesso Teixeira de Mendonça.....9
- Figura 4:** Coleta da secreção no reservatório da UHE Três Marias. Foto: Sônia Helena Santesso Teixeira de Mendonça..... 10
- Figura 5:** Secção do conjunto carapaça-plastrão (esq.) e poro excretor (apontado com agulha) (dir.). Fotos de Wilian Vaz Silva. 11
- Figura 6:** Perfil cromatográfico da amostra comprimento de onda de 216nm identificando a presença de alcaloides na presença de 10 picos (P1-P10). . 15

RESUMO

O gênero *Phrynops* é representado por quatro espécies com complexo ainda com filogenia mal compreendida, estão entre os grupos de quelônios menos conhecidos. Diversos relatos de comunidades tradicionais apontam para características peculiares na secreção cutânea de algumas espécies que ainda permanecem desconhecidas para a ciência. Dessa forma o presente estudo teve como objetivo a investigação da presença de glândulas de Ratke e as características bioquímicas da secreção. Para este estudo foram utilizadas secreções de 17 indivíduos de *Phrynops geoffroanus* provenientes da coleta em parceria com a equipe do ICMBio no reservatório da UHE Três Marias, ao longo do perímetro da ESEC Pirapitinga e na área conhecida como Vereda Grande. Três indivíduos foram selecionados e transportados para o Centro de Estudos e Pesquisas Biológicas da PUC Goiás para a realização da análise morfológica e histológica das glândulas produtoras da secreção de interesse. Foram realizado o método de extração ácido/base, o material obtido foi submetido a cromatografia utilizando coluna C18 de fase reversa em aparelho HPLC. Para a identificação da presença de alcaloides utilizou-se um método colorimétrico a partir do Reagente de Mayer. A espécie exsuda secreção por poros visíveis nas regiões axilar e inguinal, de coloração amarelada. A cromatografia em fase reversa demonstrou 10 picos de maior intensidade, os picos P8 e P9 apresentaram resultado positivo a presença de alcaloides na amostra. A secreção possui prováveis efeitos tóxicos, registrando toxinas de natureza alcaloide em quelônios, especificamente em *Phrynops geoffroanus*. Resta sem explicação a origem da toxicidade da secreção estudada.

Palavras chave: cágado-de-barbela, secreção, toxicidade, glândulas tegumentares.

ABSTRACT

The *Phrynops* genus is represented by four species with complex yet with poorly understood phylogeny, they are among the lesser known groups of turtles. Several reports from traditional communities point to peculiar characteristics in the cutaneous secretion of some species that still remain unknown to science. Thus, the present study aimed to investigate the presence of Ratke's glands and the biochemical characteristics of the secretion. This study used the secretion of 17 *Phrynops geoffroanus* individuals from the collection in partnership with the ICMBio team at the Três Marias HPP reservoir, along the perimeter of ESEC Pirapitinga and in the area known as Vereda Grande. Three individuals were selected and transported to the Center for Biological Studies and Research at PUC Goiás to carry out the morphological and histological analysis of the glands producing the secretion of interest. The acid / base extraction method was performed, the material obtained was subjected to chromatography using a reverse phase C18 column on an HPLC apparatus. To identify the presence of alkaloids, a colorimetric method was used from the Mayer Reagent. The species exudes secretion through pores visible in the axillary and inguinal regions, yellowish in color. Reverse phase chromatography showed 10 peaks of greater intensity, peaks P8 and P9 showed positive results in the presence of alkaloids in the sample. The secretion has probable toxic effects, registering toxins of an alkaloid nature in turtles, specifically in *Phrynops geoffroanus*. The source of the toxicity of the studied secretion remains unexplained.

Keywords: Tortoise-de-barb, secretion, toxicity, integumentary glands.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado o 3º lugar em riqueza de espécies de répteis do mundo, onde são encontrados atualmente 795 espécies, sendo 36 da ordem Testudines. Considerando a diversidade de répteis, 47% são endêmicos, dentre estes, seis espécies são de quelônios (BÉRNILS *et al.*, 2018). A perda de habitat, fragmentação e poluição são alguns dos fatores de grande ameaça à biodiversidade global e a sobrevivência dos quelônios (STANFORD *et al.*, 2020).

Quelônios são vertebrados amniotas, diápsidos modificados e ectodérmicos. Tiveram sua origem provavelmente entre 170 e 163,5 milhões de anos passados, no Jurássico médio (JOYCE, 2017). Atualmente são representados por poucas famílias de dois clados Cryptodira e Pleurodira, diferenciados por características anatômicas e pelo plano de retração do pescoço (RUEDA-ALMONACID *et al.*, 2007). Os quelônios possuem grande importância em estudos genéticos e taxonômicos por possuírem história filogenética única, pois mantêm diversas características altamente conservadas ao longo de sua evolução sendo, desta forma, importantes candidatos para as ações de conservação (SHAFTER, 2009).

Os quelônios possuem carapaça dorsal e plastrão ventral, suas costelas são fusionadas à estrutura da carapaça, músculos abdominais e peitorais auxiliam na respiração. São desprovidos de dentes e possuem placas córneas rígidas para a apreensão do alimento, são ovíparas e sua fecundação é interna, com os machos possuindo órgão copulador alojado dentro da cloaca (HICKMAN *et al.*, 2013). Ocupam diferentes habitats com representantes exclusivamente terrestres, como os Testudinidae, espécies que vivem em ambientes fluviais e lacustres, como os Chelidae, espécies exclusivamente marinhas como os Cheloniidae, e ainda espécies que vivem em ambiente terrestre e de água doce (GARCIA *et al.*, 1994; GOULART, 2004).

Agrupando espécies popularmente conhecidas como Tartarugas-de-pescoçolateral (cágado), a família Chelidae constitui uma das famílias mais diversas de quelônios. Agrupa pouco mais de 61 espécies viventes das quais 22 ocorrem na América do Sul e 20 no Brasil, com sua distribuição influenciada pelo clima e vegetação (SOUZA, 2005; BONIN *et al.*, 2006; RHODIN *et al.* 2017; VARGAS *et al.* 2020).

O gênero *Phrynops* é representado por quatro espécies, *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) (Figura 1), alvo do presente estudo (Carvalho et al. 2016; NOVELLI, 2011), *Phrynops hilarii* (Duméril & Bibron, 1835), *Phrynops tuberosus* (Peters, 1870) e *Phrynops williamsi* Rhodin & Mittermeier, 1983 (BÉRNILS, 2018). A espécie *Phrynops geoffroanus* representa um complexo de espécies ainda com filogenia mal compreendida. Friol (2014) reconheceu uma nova espécie críptica para o grupo.



Figura 1: *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) Foto: Rafael Martins Valadão.

Phrynops geoffroanus é conhecido popularmente como cágado-de-barbela (VOGT, 2008). A espécie pode atingir até 70 cm de carapaça, os machos são menores que as fêmeas, possuem manchas negras e laranjas em tom escuro no plastrão, faixas escuras de cada lado da cabeça esverdeada, com presença de listras brancas, duas barbelas gulares pequenos de cor branca em região mentoniana (NOVELLI, 2011). Pescoço bem alongado, carapaça achatada, larga com coloração cinza esverdeada e, quando adultos a coloração forte tende a ser menos intensa (BENÍCIO & FONSECA, 2012; VOGT, 2008).

A espécie possui ampla distribuição geográfica na América do Sul, ocorrendo desde a Amazônia colombiana ao sul do Brasil e norte da Argentina (VANZOLINI,1994). No Brasil, essa espécie ocorre nos biomas Amazônia, Caatinga, Pantanal, Cerrado e Mata Atlântica (VAN DIJK *et al.*, 2014; RHODIN *et al.* 2017). Em toda a sua extensão, podem ser encontradas em córregos, lagos e em rios urbanos altamente afetados pela poluição (SOUZA & ABE 2000, 2001), sendo que fatores ambientais moldam o ritmo do comportamento das espécies, possuindo maior distribuição dentre os cágados brasileiros (SOUSA *et al.*, 2004).

Phrynops geoffroanus chegou a ser considerada por Medem (1960) e Molina (1989) uma espécie exclusivamente carnívora, porém hoje a espécie é considerada onívora oportunista, tendo como base alimentar sementes, talos, frutos, cogumelos, peixes, crustáceos e insetos com tendência a padrões carnívoros na sua dieta (FACHÍN-TERÁN *et al.*, 1995; VOGT, 2008), havendo grande plasticidade de alteração de acordo com o ambiente (DECONTE, 2012). O tegumento possui revestimento de defesa contra invasão de bactérias e outros microrganismos para o corpo como uma camada de tecido funcionando como isolante para as estruturas internas do organismo em relação ao meio ambiente (NOVELLI, 2011).

Essa espécie não é consumida pela população ribeirinha, já que segundo a mesma a carne causa uma reação alérgica, que pode estar relacionado com o modo de preparo incorreto, sua coloração laranja do plastrão sugere que seja venenosa para algumas pessoas, sendo incluída em rituais sagrados por comunidades indígenas (VOGT, 2008).

Secreções tegumentares são produzidas por répteis e de uma maneira geral, atuam no comportamento reprodutivo como estímulo sexual e identificação intraespecífica ou como odores, que são secretados para funções defensivas para repelir algum possível predador (BLUM *et al.*, 1971; NEILL, 1948). Glândulas apresentam maior similaridade nas espécies aquáticas e semiaquáticas, pela facilidade de dispersão das secreções na água (BEZERRA *et al* 2019).

A maioria das tartarugas possuem glândulas inframarginais que se encontram na altura da axila, produzindo secreção que possivelmente são utilizadas nas interações sociais como mecanismo de defesa contra predadores (CARR & MITTERMEIER, 2007), ficando ativa em alguns geoemídeos durante a temporada

reprodutiva (RUEDA-ALMONACID *et al.*, 2007). Em tartarugas marinhas são encontradas a Glândula de sal, órgão responsável pela eliminação do excesso de sal presente no organismo para manutenção da molaridade do animal (BRIAN & COWAN, 1971).

Algumas espécies de quelônios possuem glândulas localizadas no interior da cloaca, glândulas mentais que liberar secreções de perto da mandíbula e os órgãos secretores emparelhados conhecido como glândulas de cheiro ou de Rathke (EHRENFELD & EHRENFELD, 1973; PLUMMER & TRAUTH 2009; TRAUTH, 2012). Na espécie *Kinosternon scorpioides* estas glândulas se localizam abaixo dos quinto e sétimo escudos marginais, e produzem uma secreção de coloração amarelada e odor característico (BEZERRA *et al.*, 2019).

Encontradas em membros de 13 das 14 famílias de quelônios atuais, as glândulas de Rathke foram descritas pela primeira vez por Peters (1848), também são conhecidas como glândulas inguinais e glândulas axilares, estruturas antigas e homólogas e compartilhadas entre todas as linhagens de tartarugas. Os dutos desta glândula passam pelos ossos e abrem através dos poros na ponte da concha ou na pele da axila ou regiões inguinais, funcionando provavelmente como uma defesa para afastar predadores. Este órgão é hipotetizado para descarregar repelentes de predadores, feromônios e metabólitos excretados, ainda não totalmente esclarecida pelos pesquisadores (EHRENFELD & EHRENFELD, 1973; PLUMMER & TRAUTH, 2009; WELDON & GAFFNEY, 1998; BRIAN & COWAN, 1971; CARR & MITTERMEIER, 2007).

Os principais produtos das glândulas de Rathke são proteínas, durante a época de reprodução, o conteúdo glandular serve como sinais de reconhecimento pelos quais os machos em acasalamento podem distinguir entre as fêmeas de sua espécie e as de outras espécies (EISNER *et al.*, 1977).

As secreções liberadas por glândula de Rathke podem ter um mal cheiro, que serve para impedir ou afastar predadores, sendo descrita na maioria dos gêneros vivos das famílias de Pleurodira, Chelidae, Pelomedusidae Bataguridae, Carettochelyidae, Cheloniidae, Chelydridae, Platysternon), Dermatemydidae, Dermochelyidae, Kinosternidae e Trionychidae (WELDON & GAFFNEY, 1998). Emydidae, Platysternidae e Testudinidae possuem invaginações epidérmicas emparelhadas

chamadas glândulas mentais que estão situadas na região da garganta e secretam ativamente durante o período de acasalamento (ROSE *et al.*, 1969).

Ehrenfeld e Ehrenfeld (1973) descreveram as glândulas axilares e inguinais de *Chelonia mydas* e *Sternotherus odoratus* as quais secretam lipídios, glicoproteínas, enzimas e vários ácidos sendo que a diversidade de glicoproteínas pode fornecer especificidade no nível da espécie e são especializadas para a produção e extrusão rápida de uma proteína-carboidrato substância.

Em *Chelonia mydas* as glândulas de Rathke são localizadas ao longo do ângulo formado pela carapaça e plastrão, podendo medir mais de 1,5 cm de comprimento por 5 mm de largura e pesa 0,5 g, consiste em uma série de secreções lóbulos embutidos em uma cápsula espessa de músculo estriado esvaziando-se diretamente nos dutos (EHRENFELD & EHRENFELD, 1973). Bezerra *et al.* (2019) descreveram um único duto saindo da glândula contendo uma porção livre que vai até a entrada do canal ósseo, onde entra e se estende até o poro excretor externo onde são localizados os escudos axilar e inguinal.

De acordo com Guix *et al.* (1989), o complexo *P. geoffroanus* entre os grupos de quelônios menos conhecidos. Em relação as glândulas tegumentares, diversos relatos de comunidades tradicionais apontam para características peculiares na secreção cutânea de algumas espécies que ainda permanecem desconhecidas para a ciência.

Durante manejo de espécimes de *Phrynops geoffroanus* em um programa de monitoramento ambiental, um profissional que teve contato com a secreção relatou efeitos sistêmicos como dilatação das pupilas, visualização de cores brilhantes e estado letárgico, durante um pequeno período ao ingerir a secreção expelida da espécie *Phrynops geoffroanus* acidentalmente durante manuseio da espécie (comunicação pessoal, 08 de outubro de 2019). Dados sobre a secreção nesta espécie são desconhecidos na literatura científica.

Diante disso, o objetivo deste trabalho é fazer uma investigação preliminar sobre a secreção tegumentar expelida por *P. geoffroanus* (Schweigger, 1812), fornecendo dados para maior entendimento da biologia da espécie que ainda são pouco estudadas a fim de subsidiar inferências funcionais. Nossa hipótese inicial é que a secreção é tóxica diante do relato supracitado.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar a presença de glândulas de Ratke e as características bioquímicas da secreção de *Phrynops geoffroanus*.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar a complexidade e diversidade molecular da secreção obtida;
- Verificar a presença de alcaloides na secreção de *P. geoffroanus*;
- Testar protocolos para a caracterização bioquímica da secreção;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Área de Estudo

Entre os dias 24 de setembro a 03 de outubro de 2019, foi realizada a expedição de monitoramento em parceria com a equipe do ICMBio que desenvolve o monitoramento da população de *Phrynops geoffroanus* no âmbito da Usina Hidrelétrica Três Marias, no Estado de Minas Gerais (18°20' -18°23'S e 45°17' 45°20'O), área que circunda a Estação Ecológica de Pirapitinga (Figura 2), localizada na região da bacia hidrográfica do Rio São Francisco, dentro do bioma cerrado. A coleta ocorreu, em dois locais no reservatório da UHE Três Marias ao longo do perímetro da ESEC Pirapitinga e na área conhecido como Vereda Grande.

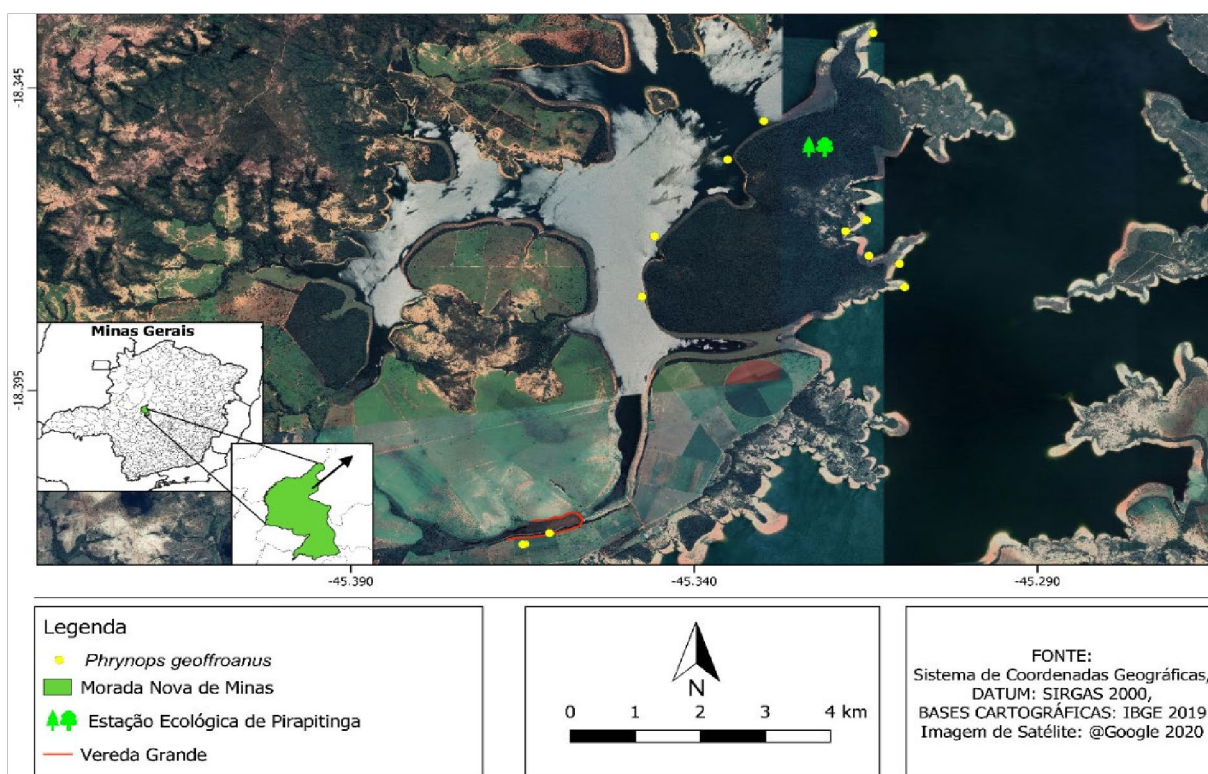


Figura 2: Locais amostrados das espécies capturadas de *Phrynops geoffroanus* no reservatório da UHE Três Marias e Vereda Grande próxima a ESEC Pirapitinga, localizado em Minas Gerais no Município de Morada Nova, Bacia hidrográfica do Rio São Francisco.

3.2. Técnica de Captura

A coleta ocorreu pelos pesquisadores da equipe do ICMBio durante o monitoramento da espécie, utilizando armadilhas *funnel trap* com iscas atrativas (carne bovina, ração para felinos, sardinha em conserva e abacaxi) que foram colocadas e condicionadas em um recipiente plástico perfurado e amarrado dentro da armadilha. As armadilhas são compostas por aros metálicos que sustentam uma rede

de náilon em seu entorno. Ambas as extremidades da armadilha, são compostas por uma entrada em forma de funil invertido, por onde o animal entra atraído pela isca, tendo assim, dificuldade para sair por meios próprios.

Importante salientar que as armadilhas foram mantidas apenas parcialmente submersas para permitir que o animal capturado pudesse subir para respirar.

Ao longo do perímetro da ESEC Pirapitinga foram instaladas 74 armadilhas, que permaneceram ativas por três dias. Já na área denominada Vereda Grande, foram instaladas 40 armadilhas que permaneceram instaladas por dois dias. Todas as armadilhas foram revisadas diariamente (Figura 3). A coleta dos espécimes foi condicionada à Licença do SISBIO n. 610622.



Figura 3: Instalação da armadilha tipo funil (funnel trap) no reservatório da UHE Três Marias. Foto: Sônia Helena Santesso Teixeira de Mendonça.

3.3. Coleta e armazenamento da secreção

Foram capturados muitos indivíduos, entretanto foram coletadas secreção de 17 espécimes, os mesmos foram transportados ao laboratório na sede do projeto da ESEC Pirapitinga. Contidos manualmente, os espécimes foram posicionados com o decúbito dorsal como forma de estimular a secreção de suas glândulas. O material secretado foi coletado com capilares de vidro e estocado em criotubos mantidos sob refrigeração (Figura 4). Após este procedimento, três espécimes, dois adultos e um juvenil, foram selecionados e transportados para o Centro de Estudos e Pesquisas

Biológicas da PUC Goiás para, em cativeiro, continuarem o fornecimento de secreção em estudo e para estudos morfológicos e histológicos. Os demais espécimes capturados foram retornados a seus pontos de captura e libertados.



Figura 4: Coleta da secreção no reservatório da UHE Três Marias. Foto: Sônia Helena Santesso Teixeira de Mendonça.

3.3. Morfologia e histologia das glândulas

Dos três espécimes de *Phrynops geoffroanus*, um foi selecionado para a análise morfológica e histológica das glândulas produtoras da secreção de interesse. O animal foi eutanasiado por meio de injeção intravascular de tiopental sódico no vaso caudal, sendo o óbito verificado pela palidez das mucosas e ausência de reflexo corneal. Uma vez irresponsivo, perfuração craniana com destruição mecânica do encéfalo foi adotado como método adjunto para assegurar-se do óbito. O procedimento foi efetuado por profissional médico-veterinário, em concordância com a diretriz da prática de eutanásia do CONCEA (CONCEA, 2018) e sob anuência da Comissão de Ética no Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (autorização n. 5523051219 CEUA).

Para a localização e retirada das glândulas de interesse, foi realizada dissecação exploratória da cavidade celomática do espécime através da separação do plastrão (Figura 5). Amostras de tecido foram coletadas e fixadas em formaldeído, incluindo seção da carapaça à altura da fossa inguinal contendo o poro excretor e todos os tecidos associados. O restante da carcaça do animal foi congelado a -20°C para estudos posteriores.



Figura 5: Secção do conjunto carapaça-plastrão (dir.) e poro excretor (apontado com a gulha) (esq.). Fotos: Wiliam Vaz Silva.

Para análise microscópica das amostras da região inguinal e axilar onde se encontra o poro e a possível glândula, foram realizados cortes seriados na posição parassagital, transversal e longitudinal dos fragmentos, que foram fixados em formol a 10%, desidratados em uma série de concentrações crescentes de álcool, diafanizados em xilol e impregnados em parafina para obtenção de cortes transversais e longitudinais seriados de 5 μ m de espessura, conforme técnicas de rotina já utilizadas para estudos histológicos (LILLIE; FULLMER, 1976).

3.4. Isolamento e purificação de alcaloides

Sobre a secreção obtida de *Phrynops geoffroanus*, realizou-se extração ácido/base com a secreção expelida pela espécie para a separação de alcaloides. Para tanto, 200 μ L de secreção em suspensão aquosa foi acidificada com 200 μ L de solução de ácido clorídrico 0,1 N e submetida a 3 extrações consecutivas com 200 μ L de acetato de etila. A fração aquosa obtida foi alcalinizada com hidróxido de amônio até ph 9-10 e submetida a 4 extrações com 200 μ L acetato de etila, assim gerando uma fração orgânica enriquecida em alcaloides que foi desidratada com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada. Com este procedimento buscou-se a separação dos alcaloides de características básicas através de sua conjugação em sais com a adição de solução ácida. Após a extração do sal com solvente polar, a amostra foi tratada com base para a liberação dos alcaloides em conformação nativa (VALENTE *et al.* 2006).

3.5. Fracionamento por cromatografia em fase reversa

Realizada a extração, foi realizada cromatografia do material obtido, utilizando-se coluna C18 de fase reversa em aparelho cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A coluna foi inicialmente equilibrada em solução aquosa de ácido trifluoracético (TFA) a 0,1 %, com fluxo de 1,0 ml/minuto e eluição com gradiente linear de acetonitrila + TFA 0,1% TFA. A detecção da eluição foi realizada em comprimento de onda de 216nm.

3.6. Detecção de alcaloides

Para a identificação da presença de alcaloides utilizou-se um método colorimétrico a partir do Reagente de Mayer, o qual é constituído de Cloreto de Mercúrio e Iodeto de Potássio. Para tanto, a amostra foi solubilizada em água destilada (200µL) e acidificada com 30µL de HCl 70%, seguido da exposição ao Reagente de Mayer (NATH *et al.* 1946).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante a campanha de campo no reservatório da UHE de Três Marias em parceria com o ICMBio/RAN, entre os dias 24 de setembro e 3 de outubro de 2019, enquanto manuseava *Phrynos geoffroanus* nós percebemos que a espécie exsudava secreção por poros visíveis nas regiões axilar e inguinal que estimulou a concretização do presente trabalho.

A secreção observada durante a captura de *Phrynos geoffroanus* e manuseio dos mesmos no laboratório da sede da Unidade de Conservação, possui coloração amarelada, pastosa, inodora, onde os indivíduos a expeliam sob condições de estresse.

Dezessete espécimes contidos manualmente foram estimulados com posicionamento do decébito dorsal obtendo secreção de suas glândulas durante o manejo. Vogt (2008) relata que a população ribeirinha não consome a carne de *P. geoffroanus* por apresentar reação alérgica, relaciona ainda a grande variedade de cogumelos consumida pela espécie pode ser a causa da toxicidade da carne, causando as reações alérgicas e alucinógenas na população.

Foi localizada a presença de poros visíveis nas regiões axilar e inguinal, de coloração amarelada por onde a secreção é exsuda. Há evidências de que a espécie possua uma glândula que produza a secreção expelida em condições de estresse como uma possível forma de defesa, ainda desconhecida na literatura. Em quelônios são observadas glândulas de Rathke ou glândulas inguinais e axilares, liberam secreção abaixo das pontes plastrais anterior e bordas posteriores, elimina produtos de secreção, através da axila ou poros inguinais, que funcionam como repelentes de predadores, feromônios e metabólitos excretados, ainda com função pouco esclarecida (BRIAN & COWAN, 1971; EHRENFELD & EHRENFELD, 1973; WELDON & GAFFNEY, 1998; CARR & MITTERMEIER, 2007; PLUMMER & TRAUTH, 2009).

Carr & Mittermeier (2007) sugeriram que possivelmente são utilizadas nas interações sociais como mecanismo de defesa, previnem as espécies de serem alimentadas por seus predadores em potencial.

Durante a expedição um dos pesquisadores relatou que teve contato com a secreção expelida pela espécie, acidentalmente sentindo logo em seguida dilatação

das pupilas, cores brilhantes, de acordo com os dados, verificamos que é inédita a presença de toxinas em *Phrynops geoffroanus*.

Estudos demonstram que na região do rio São Francisco, onde se localiza o reservatório de Três Marias encontra-se grande abundância de camarão (SATO *et al.*, 2006), provavelmente presente na dieta de *Phrynops geoffroanus* considerada uma espécie onívora com base alimentar em crustáceos, cogumelos, peixes, insetos mudando de acordo com o meio em que vive (FACHÍN-TERÁN *et al.*, 1995; VOGT, 2008; DECONTE, 2012).

Devido a alteração da dieta durante o período de manutenção em cativeiro o espécime foi perdendo a coloração alaranjada intensa do plastrão. Essa perda gradual da coloração reforça a hipótese de que a espécie possa obter a substância pela dieta, dando a coloração da secreção expelida e do plastrão alaranjado, provavelmente associada a crustáceos presentes nessa região.

A partir do relato do pesquisador ao ingerir a secreção gerou-se a hipótese de que haja presença de alcaloides, que possa explicar os sintomas, foi testado o protocolo de separação de alcaloides com a secreção obtida do animal, armazenada em criotubos e mantidas em freezer a -20°C no Centro de Estudos e Pesquisas Biológicas (CEPB).

Durante a realização do protocolo de separação de alcaloides, a diluição da amostra da secreção em metanol secou em rota a vapor. Dificultando a filtragem da solução e submeter ao sistema cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

4.1. Cromatografia fase reversa

A cromatografia em fase reversa demonstrou a presença de 10 picos de maior intensidade, os quais foram denominados P1–P10. Eles foram coletados isoladamente e submetidos ao teste colorimétrico para identificação qualitativa de alcaloides (Figura 6).

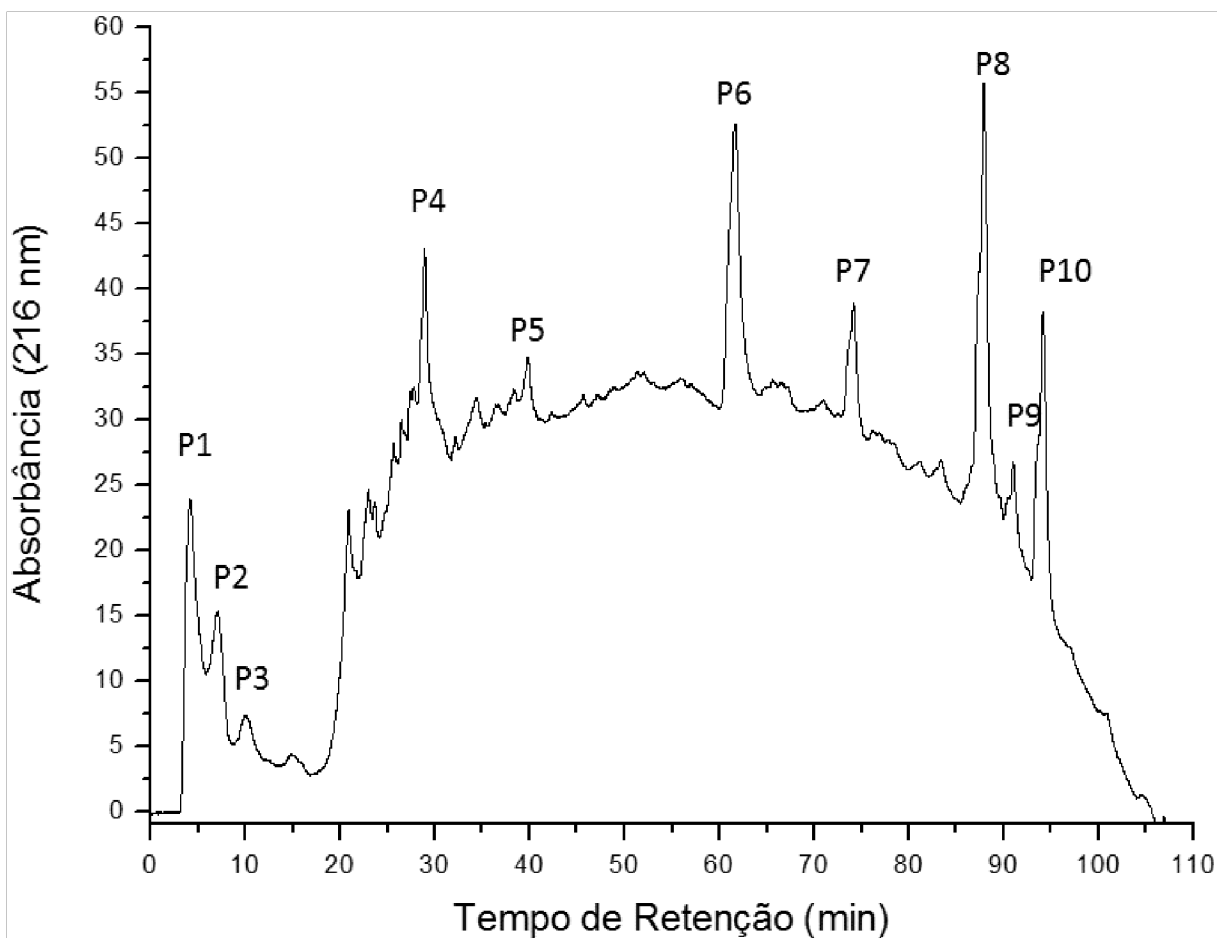


Figura 6: Perfil cromatográfico da amostra comprimento de onda de 216nm identificando a presença de alcaloides na presença de 10 picos (P1-P10).

4.2. Teste colorimétrico para alcaloides

Todos os picos (P1 – P10) coletados no fracionamento por cromatografia de fase reversa foram analisados para identificação da presença de alcaloides na amostra.

Os picos P8 e P9 apresentaram resultado positivo, uma vez que se tornaram turvos com a adição do reagente de Mayer na amostra acidificada. A turvação no tubo P8 foi mais intensa do que a turvação no tubo P9, o que pode indicar contaminação das amostras, considerando que os tempos de retenção das duas amostras estão muito próximos.

A presença de alcaloides pode indicar que a espécie os capture através da dieta, contudo ainda são incipientes estudos sobre a função química e ecológica dessa secreção, além de aspectos da morfologia de *Phrynos geoffroanus*. Novas

abordagens devem ser realizadas aumentando a eficiência dos métodos empregados nesse trabalho fornecendo subsídios para maior compreensão.

5. CONCLUSÕES

- Este é o primeiro estudo que conhecemos que registra a presença de toxinas de natureza alcaloide em quelônios, especificamente em *Phrynops geoffroanus*.
- Essa secreção possui prováveis efeitos tóxicos, conforme observado a partir da sintomatologia relatada pelo biólogo ao, acidentalmente, entrar em contato com a secreção;
- A provável toxicidade desta secreção corrobora o relato de Vogt (2008) da aversão das populações ribeirinhas no consumo da carne de *Phrynops geoffroanus*, apesar do consumo popular de outros quelônios.
- A avaliação macroscópica revelou a presença de poros secretores inguinais e axilares em *Phrynops geoffroanus*, provavelmente oriundos das glândulas de Rathke, que são responsáveis pela secreção expelida pela espécie;
- Resta dois espécimes vivos em cativeiro, para estudos futuros explorando a hipótese sobre a função ecológica da secreção das glândulas, bem como sua caracterização bioquímica funcional, estrutural e morfológica.
- Igualmente, resta sem explicação a origem da toxicidade da secreção estudada, isto é, se é produto metabólico de *Phrynops geoffroanus* ou se a espécie se apropria da diversidade molecular de suas presas;

6. REFERÊNCIAS

- BENÍCIO, Ronildo Alves; FONSECA, Mariluce Gonçalves. **HERPETOFAUNA DA CAATINGA, MUNICÍPIO DE PICOS, PIAUÍ**, 2012.
- BÉRNILS, R. S. **Brazilian reptiles – List of species**. Disponível em: BÉRNILS, R. S. Brazilian reptiles – List of species. Disponível em: <http://www.sbherpetologia.org.br/>. (acessado em: 27/10/2020), 2018.
- BEZERRA, Andréa M., *et al.* "**Anatomical, Histological, and Histochemical Analyses of the Scent**
- BLUM, M.S.; BYRD, J.B.; TRAVIS, J.R.; WATKINS, J.F.; GEHLBACH, F.R. **Chemistry of the cloacal sac secretions of the blind snake *Leptotyphlops dulcis***. Comparative Biochemistry and Physiology, v. 38B, p. 103-107, 1971.
- BONIN, F., B. DEVAUX & A. DUPR. **Turtles of the World**. Tradução Pritchard, The Johns Hopkins University Press, PCH Baltimore, 2006.
- BRIAN, F.; COWAN, M. **The ultrastructure of the lachrymal 'salt' gland and the Harderian gland in the euryhaline *Malaclemys* and some closely related stenohaline emydines**. Canadian Journal of Zoology, n. 49, 1971.
- CARR, J. L.; MITTERMEIER, R. A. **Las tortugas y los cocodrilianos de los países andinos del trópico**, 2007.
- CONCEA. **Diretriz da Prática de Eutanásia do CONCEA**. 2018.
- DE CARVALHO, V. T., Martínez, J. G., Hernández-Rangel, S. M., Astolfi-Filho, S., Vogt, R. C., Farias, I. P., & Hrbek, T. **Giving IDs to turtles: SNP markers for assignment of individuals to lineages of the geographically structured *Phrynops geoffroanus* (Chelidae: Testudines)**. Conservation genetics resources, v. 9, n. 1, p. 157-163, 2017.
- de São Paulo, 1989.
- DECONTE, Monica Ramos *et al.* **Impacto antrópico na dieta do cágado-de-barbicha, *Phrynops geoffroanus* (Testudines, Chelidae) no rio Uberabinha, Uberlândia, Minas Gerais**. 2012.
- EHRENFELD JG, EHRENFELD DW. **Externally secreting glands of freshwater and sea turtles**, 1973.
- EISNER T, Conner WE, Hicks K, Dodge KR, Rosenberg HI, Jones TH, Cohen M, Meinwald J. **Stink of Stinkpot Turtle Identified: ohgr-Phenylalkanoic Acids**. Science. 1977.
- FACHÍN-TERÁN, A., VOGT, R. C.; GOMEZ, M. F. S. **Food Habitats of an Assemblage of River Species of Turtles in the Rio Guaporé, Rondonia, Brazil**. Journal of Herpetology. p. 536-547, 1995.
- FACHÍN-TERÁN, A.; VOGT, R. C. **Estrutura populacional, tamanho e razão sexual de *Podocnemis unifilis* (Testudines, Podocnemididae) no Rio Guaporé (RO), norte do Brasil**. Phyllomedusa 3(1): 29-42, 2004.
- FACHÍN-TERÁN, A.; VOGT, R. C. S.; GOMEZ, M. F. **Alimentación de tres especies de tortugas Chelidae en Costa Maques, Rondônia**. Boletín de Lima 16(9196): 409-416, 1994.
- FRIOL, R. **Filogenia e evolução das espécies do gênero *Phrynops* (Testudines, Chelidae)**. Instituto de Biociencias da Universidade de SP, p. 340, 2014.
- GARCIA-NAVARRO, C.E.K; PACHALY, J.R. **Manual de Hematologia Veterinária**. 1. Ed. São Paulo: Livraria Varela Ltda, 1994.
- Glands of the scorpion mud turtle (*Kinosternon scorpioides scorpioides*).**" The Anatomical Record 303.5, 2019.
- GOULART, C.E.S. **Herpetologia, herpetocultura e medicina de répteis**. Rio de Janeiro: LF Livros de Veterinária, 329p, 2004.
- GUIX, J.C.C.; SALVATTI, M.; PERONI, M.A.; LIMA-VERDE, J.S. **Aspectos da reprodução de *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) em cativeiro (Testudines Chelidae)**. Série de Documentos Grupo de Estudos em Ecologia, v. 1, p. 1-19, 1989.

- HICKMAN, C.P.; ROBERTS, L.S.; LARSON, A. **Princípios Integrados de Zoologia 15º ed.** Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 621 p, 2013.
- JOYCE, Walter G. A review of the fossil record of basal Mesozoic turtles. **Bulletin of the Peabody Museum of Natural History**, v. 58, n. 1, p. 65-113, 2017.
- LILLIE, R.D.; FULMER, H.M. **Histopathologic technic and practical histochemistry.** 4. ed. New York: Mc Graw Hill, 942 p, 1976.
- MEDEM, F. Informe sobre reptiles colombianos. **Observaciones sobre la distribucion geografica y ecologia de la tortoga Phrynops geoffroana ssp em Colombia.** Novedades Colombianas/Museo De Historia Natural De La Universidad Del Cauca, v. 1, n. 5, p. 291- 300, 1960.
- MOLINA, F. B. **Observações sobre a biologia e o comportamento de *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) em cativo (Reptilia, Testudines, Chelidae).** MS thesis, Universidade
- NATH, M. C.; CHAKRAVORTY, M. K.; CHOWDHURY, S. R. **Liebermann-Burchard reaction for steroids.** Nature, v. 157, n. 3978, p. 103-104, 1946.
- Naturwissenschaften**, v. 85, n. 11, p. 556-557, 1998.
- NEILL, W.T. **Odor of young box turtles.** Copeia, v. 1948, p. 130, 1948.
- NOVELLI, Iara Alves *et al.* **Estudo morfológico (anatômico e histológico) do sistema tegumentar de *Hydromedusa maximiliani* (Mikan, 1820)(Testudines, Chelidae) e *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812)(Testudines, Chelidae).** 2011.
- PETERS, W. **Ueber eigenthümliche moschusdrüsen du schildkröten.** Mullers Archive fur Anatomy, v. 1848, p. 492-496, 1848.
- Plummer MV, Trauth SE. **A estrutura das glândulas de Rathke nas tartarugas softshell *Apalone mutica* e *A. spinifera*.** Herpet Cons Biol, 2: 207 – 20, 2009.
- RHODIN, Anders GJ *et al.* **Turtles of the World: Annotated Checklist and Atlas of Taxonomy, Synonymy, Distribution, and Conservation Status.** Lunenburg: Chelonian Research Foundation and Turtle Conservancy, 2017.
- ROSE, Francis L.; DROTMAN, Robert; WEAVER, William G. Electrophoresis of chin gland extracts of Gopherus (tortoises). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 29, n. 2, p. 847-851, 1969.
- RUEDA-ALMONACID, José Vicente *et al.* **Las tortugas y los cocodrilianos de los países andinos del trópico.** Serie de guías tropicales de campo, v. 6, p. 412-423, 2007.
- SATO, Y.; SAMPAIO, E. V. **A ictiofauna do Reservatório de Três Marias, Rio São Francisco, Minas Gerais.** 2006.
- SHAFTER, H.B. **Turtles (Testudines).** In: HEDGES, S.B; KUMAR, S. The Timetree of Life. New York, United States: Eds. Oxford University Press, 1.ed, v.55, p.398-401, 2009.
- SOUZA, F.L. and ABE, A.S. **Feeding ecology, density and biomass of the freshwater turtle, *Phrynops geoffroanus*, inhabiting a polluted urban river in southeastern Brazil.** Journal of Zoology 252:437–446, 2000.
- SOUZA, F.L. **The Brazilian Snake-necked Turtle, *Hydromedusa maximiliani*.** Reptilia, London, v. 40, p. 47-51, 2005.
- SOUZA, F.L. **Uma revisão sobre padrão de atividade, reprodução e alimentação de cágados brasileiros (Testudines: Chelidae).** Phyllomedusa, v. 3, n. 1, p. 15-27, 2004.
- SOUZA, Franco Leandro; ABE, Augusto Shinya. **Population structure and reproductive aspects of the freshwater turtle, *Phrynops geoffroanus*, inhabiting an urban river in southeastern Brazil.** Studies on Neotropical Fauna and Environment, v. 36, n. 1, p. 57-62, 2001.
- STANFORD, Craig B. *et al.* **Tartarugas e tartarugas estão com problemas.** Current Biology , v. 30, n. 12, pág. R721-R735, 2020.

- TRAUTH SE. **Morphology of Rathke's glands in the snapping turtle, *Chelydra serpentina*, with comments on the presence of multilaminar lamellar bodies in turtles.** J Ark Acad Sci 66: 164–172, 2012.
- VALENTE, Ligia MM et al. **Desenvolvimento e aplicação de metodologia por cromatografia em camada delgada para determinação do perfil de alcalóides oxindólicos pentacíclicos nas espécies sul-americanas do gênero *Uncaria*.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 16, n. 2, p. 216-223, 2006.
- VAN DIJK, P.P.; STUART, B.L.; RHODIN, A.G.J. **Asian Turtle Trade: Proceedings of a Workshop on Conservation and Trade of Freshwater Turtles and Tortoises in Asia.** Chelonian Research Monographs 2. Lunenburg, Maine: Chelonian Research Foundation, 164 p, 2000.
- VANZOLINI, P.E. **On the distribution of certain South American turtles (Testudines: Testudinidae & Chelidae),** 1994.
- VARGAS-RAMÍREZ, Mario et al. **Genomic analyses reveal two species of the matamata (Testudines: Chelidae: *Chelus* spp.) and clarify their phylogeography.** Molecular Phylogenetics and Evolution, p. 106823, 2020.
- VOGT, R. C. **Tartaruga da Amazônia.** INPA. 68p, 2008.
- WELDON, Paul J.; GAFFNEY, Eugene S. **An ancient integumentary gland in turtles.**

RESOLUÇÃO n°038/2020 – CEPE


ANEXO I

APÊNDICE ao TCC

Termo de autorização de publicação de produção acadêmica

O(A) estudante Adriele Silva Lopes do Curso de Ciências Biológicas, matrícula: 20162005000039 , telefone: (62)98556574, e-mail: adrisilva041@gmail.com, na qualidade de titular dos direitos autorais, em consonância com a Lei n° 9.610/98 (Lei dos Direitos do autor), autoriza a Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC Goiás) a disponibilizar o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado **Investigação da secreção cutânea de *Phrynops geoffroanus* (Testudines, Chelidae)**, gratuitamente, sem ressarcimento dos direitos autorais, por 5 (cinco) anos, conforme permissões do documento, em meio eletrônico, na rede mundial de computadores, no formato especificado (Texto (PDF); Imagem (GIF ou JPEG); Som (WAVE, MPEG, AIFF, SND); Vídeo (MPEG, MWV, AVI, QT); outros, específicos da área; para fins de leitura e/ou impressão pela internet, a título de divulgação da produção científica gerada nos cursos de graduação da PUC Goiás.

Goiânia, 11 de Dezembro de 2020.

Assinatura do(s) autor(es): 

Nome completo do autor: Adriele Silva Lopes

Assinatura do professor-orientador:



Nome completo do professor-orientador: Matheus Godoy Pires