



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**ANÁLISE DE MARCAS DE CRESCIMENTO ÓSSEO E
ESTIMATIVAS DE IDADE PARA *Chelonia mydas* (LINNAEUS, 1758)
NO LITORAL DO RIO GRANDE DO SUL**

Dissertação de Mestrado

CARIANE CAMPOS TRIGO

Porto Alegre, 2004



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

**ANÁLISE DE MARCAS DE CRESCIMENTO ÓSSEO E
ESTIMATIVAS DE IDADE PARA *Chelonia mydas* (LINNAEUS, 1758)
NO LITORAL DO RIO GRANDE DO SUL**

Dissertação de Mestrado

CARIANE CAMPOS TRIGO

Porto Alegre, 2004



CARIANE CAMPOS TRIGO

**ANÁLISE DE MARCAS DE CRESCIMENTO ÓSSEO E
ESTIMATIVAS DE IDADE PARA *Chelonia mydas* (LINNAEUS, 1758)
NO LITORAL DO RIO GRANDE DO SUL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Biologia Animal.

Área de Concentração: Ictiologia e Herpetologia
Orientadora: Prof^a Dr^a Lígia Krause

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PORTO ALEGRE
2004



CARIANE CAMPOS TRIGO

**ANÁLISE DE MARCAS DE CRESCIMENTO ÓSSEO E
ESTIMATIVAS DE IDADE PARA *Chelonia mydas* (LINNAEUS, 1758)
NO LITORAL DO RIO GRANDE DO SUL**

Aprovada em / /2004.

Dra. Laura Verrastro

Dr. Thales Renato O. de Freitas

Dr. Alex Bager

AGRADECIMENTOS

À professora Lígia Krause, pela orientação e incentivo, e por ser acima de tudo amiga e não só orientadora.

Ao Márcio Martins, pela orientação (mesmo que informal), por toda a atenção e paciência, e principalmente, por tornar este trabalho possível e por ser um grande exemplo de pesquisador. Não sei o que eu faria sem a tua ajuda! Muito obrigado por ter me incentivado a fazer parte do mundo das tartarugas!!! Juro que depois do Mestrado eu não vou fugir para Uruguaiana!!!

À Laura Verrastro pela oportunidade de trabalho no Laboratório de Herpetologia do Departamento de Zoologia da UFRGS, e por estar sempre disposta a me ajudar sempre que precisei. Por ter me acolhido a mais de quatro anos atrás, e tu que pensa que vai te livrar de mim agora!!!

Aos meus grandes amigos e colegas, de “monitoramento” e de muitas aventuras, do Grupo de Estudos de Mamíferos Aquáticos do Rio Grande do Sul: Márcio, Sue, Maurício, Renata, Daniel, Ignácio, Paulo, Glauco, Rodrigo, Larissa e Larissinha, por todos os momentos maravilhosos que nós passamos juntos. Este trabalho só pôde ser realizado graças à dedicação e ao esforço de vocês. Muito obrigada, gente!!!

A todo pessoal do Laboratório de Herpetologia, do Departamento de Zoologia da UFRGS, pela convivência e amizade que tornaram os dias de trabalho mais divertidos. Principalmente pelas caipirinhas do Martin, que curam o “stress” de qualquer mestrando desesperado!!!

À Maria Inês Lavina Rodrigues, do Laboratório de Histologia do Instituto de Biociências da PUCRS, e à Circe Stieven Machado, do Laboratório de Histologia do Departamento de Zoologia do Instituto de Biociências da UFRGS, pela grande ajuda na realização das preparações histológicas.

À Ingrid Heydrich, do Laboratório de Malacologia da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, por possibilitar-me a utilização do micrótomo do referido laboratório, no período em que o aparelho do Departamento de Zoologia esteve com problemas.

À minha irmã, Tati, por me ajudar em tudo!!! Por sua amizade e companheirismo, e pelas várias discussões muito relevantes e inspiradoras, e por aquelas nem tanto relevantes. A todos os meus amigos e amigas (não vou citar todo mundo, por que a lista é grande) que sempre aturaram minhas reclamações e lamentos em relação aos meus “cortes” que nunca davam certo, e estavam sempre dispostos a ajudar. Aos meus colegas e novos amigos do Pós, rumo ao desemprego galera, mas não vamos desanimar, ainda temos um longo caminho pela frente.

À minha família por estar sempre ao meu lado me ajudando e encorajando em todos os momentos ao longo de toda a minha vida. Pelo apoio e por ter respeitado minha escolha por esta profissão, que as vezes é tão difícil de trilhar.

À todas as pessoas, que de alguma forma, me ajudaram a trilhar este caminho em busca do crescimento pessoal e profissional.

E por fim, às tartarugas marinhas por existirem, e por serem estes animais tão lindos, interessantes e enigmáticos.

SUMÁRIO

Agradecimentos	iii
Lista de Tabelas	vi
Lista de Figuras	vii
Resumo	x
1 - Introdução	1
1.1 – Tartarugas marinhas – Diversidade, ocorrência no Brasil e conservação	1
1.2 – <i>Chelonia mydas</i> – Características gerais, biologia e distribuição	3
1.3 – Crescimento e determinação de idade em tartarugas marinhas	7
1.3.2 – Crescimento e determinação de idade em <i>Chelonia mydas</i>	11
2- Materiais e Métodos	14
2.1 – Área de estudo	14
2.2 – Metodologia de campo	16
2.3 – Material	18
2.4 – Análise das classes de tamanho	18
2.5 – Análise das marcas de crescimento	18
3- Resultados e Discussão	36
3.1 – Ocorrência de tartarugas marinhas no litoral do Rio Grande do Sul	36
3.2 – Classes de tamanho de <i>Chelonia mydas</i> no litoral do Rio Grande do Sul ...	37
3.3 – Exame das marcas de crescimento	40
3.3.1. – Análise da técnica histológica	40
3.3.2 – Marcas de crescimento	47
3.4 – Estimativas de idade para a população de <i>Chelonia mydas</i> no litoral do Rio Grande do Sul	57
4- Conclusões	65
5- Referências Bibliográficas	67
6- Anexos	84

LISTA DE TABELAS

- Tabela I** – Caracterização da amostra de *Chelonia mydas* utilizada para a análise das marcas de crescimento. Número de registro nos catálogos de campo do GEMARS, para cada indivíduo, com seu respectivo número na Coleção de Anexos do Laboratório de Herpetologia do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS (MCPAN), data de coleta e dados biométricos: comprimento curvilíneo da carapaça (ccc) e largura curvilínea da carapaça (lcc), ambos expressos em centímetros; massa do animal expressa em quilogramas..... 21
- Tabela II** - Medidas realizadas para cada úmero de *Chelonia mydas* utilizado para análise das marcas de crescimento. A identificação de cada indivíduo é feita através do número de registro na Coleção de Anexos do Laboratório de Herpetologia do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS (MCPAN). Comprimento curvilíneo da carapaça (ccc) expresso em centímetros e medidas (1 a 12) expressas em milímetros (descrição da realização das medidas no item 2.5) 24
- Tabela III** – Resultados obtidos em relação a aplicação das diferentes técnicas de preparação histológica. Animais submetidos ao processo histológico, com o respectivo número de registro na Coleção de Anexos do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS (MCPAN); tipos de Inclusão realizados na preparação (Inclusão nº 1 e Inclusão nº 2); tipos de Descalcificação realizados na preparação (Descalcificação nº 1 e Descalcificação nº 2 e Descalcificação nº 3); tempo de submissão do material às diferentes técnicas de descalcificação; realização efetiva do corte; visualização das linhas de crescimento. As diferentes técnicas de Inclusão e Descalcificação estão descritas na seção 2.5 de Material e Métodos 51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplar de <i>Chelonia mydas</i> encalhado no litoral norte do Rio Grande do Sul.....	4
Figura 2 - Localização da área de estudo.....	15
Figura 3 – Medidas realizadas em campo nos exemplares de <i>Chelonia mydas</i> encontrados encalhados no litoral do Rio Grande do Sul. (a) e (b) comprimento curvilíneo da carapaça (ccc); (c) largura curvilínea da carapaça (lcc). Figuras (b) e (c) modificadas a partir de BOLTEN (1999).....	17
Figura 4 - Vista proximal (A) , dorsal (B) e ventral (C) de úmero direito de um Cheloniidae (modificado de ZUG <i>et al.</i> , 1986) com a indicação das medidas tomadas (conforme descrito no item 2.5), principais estruturas anatômicas e o local de retirada da secção para preparação histológica (a)	23
Figura 5 – (a) vista ventral do úmero esquerdo de <i>Chelonia mydas</i> (escala 5 centímetros). (b) realização das medidas com a utilização de paquímetro. (c) e (d) corte da secção na diáfise do osso, com a utilização de serra em arco. (d) corte da secção na região próxima à crista deltapeitoral (seta).....	28
Figura 6 - Frequência relativa das quatro espécies de tartarugas marinhas (<i>Chelonia mydas</i> , <i>Caretta caretta</i> , <i>Dermochelys coriacea</i> , <i>Eretmochelys imbricata</i>) encontradas encalhadas no litoral norte do Rio Grande do Sul entre março de 1994 e setembro de 2003.....	36
Figura 7 – Distribuição por classes de tamanho das tartarugas-verdes encalhadas no litoral norte do Rio Grande do Sul entre março de 1994 e setembro de 2003.....	37
Figura 8 - Cortes histológicos transversais de úmeros de <i>Chelonia mydas</i> . (a) visão geral do corte transversal do úmero do indivíduo de número 770 (aumento 1,6x). (b) corte transversal do úmero do indivíduo de número 785 com indicação das regiões	vii

medular (M), cortical (C) e do periósteo (P) (aumento 4x). **(c)** região cortical do úmero do indivíduo de número 779, demonstrando a ausência de marcas de crescimento (aumento 1,6x). **(d)** vista em maior aumento (aumento 40x) da região cortical do úmero do indivíduo de número 779, demonstrando a ausência de marcas de crescimento **(e)** região cortical do úmero do indivíduo de número 771, demonstrando a presença de marcas de crescimento (setas) (aumento 3x). **(f)** vista em maior aumento da região cortical do úmero do indivíduo de número 771, demonstrando a presença de marcas de crescimento (aumento 40x)..... 54

Figura 9 - Cortes histológicos transversais de úmeros de *Chelonia mydas*, demonstrando as similaridades e diferenças nos padrões das marcas de crescimento, da região cortical dos indivíduos, com relação às modificações nas preparações histológicas. **(a)** indivíduo de número 767 submetido a descalcificação nº 1, demonstrando a presença de marcas de crescimento (setas) (aumento 40x). **(b)** indivíduo de número 767 submetido a descalcificação nº 2, demonstrando a presença de marcas de crescimento (setas) (aumento 40x). **(c)** indivíduo de número 783 submetido a descalcificação nº 1 por um período de 12 dias, demonstrando a presença de marcas de crescimento (aumento 40x). **(d)** indivíduo de número 783 submetido a descalcificação nº 2 por um período de 55 dias, demonstrando a presença de marcas de crescimento (aumento 40x). **(e)** indivíduo de número 761 submetido a coloração nº 1, demonstrando a presença de marcas de crescimento fracamente visíveis (aumento 40x). **(f)** indivíduo de número 761 submetido a coloração nº 2, demonstrando a presença de marcas de crescimento nitidamente visíveis (aumento 40x) 55

Figura 10 - Cortes histológicos transversais de úmeros de *Chelonia mydas*, demonstrando a presença de marcas de crescimento ósseo na região cortical nos diferentes indivíduos. **(a)** indivíduo de número 962 demonstrando a presença de 1 marca de crescimento na região mais externa do periósteo (seta) (aumento 40x). **(b)** indivíduo de número 959 demonstrando a presença de 1 marca de crescimento (seta) entre a região medular (M) e o periósteo (P) (aumento 40x). **(c)** indivíduo de número 765 demonstrando a presença de 2 marcas de crescimento (aumento 40x). **(d)** indivíduo de número 767 demonstrando a presença de 3 marcas de crescimento (aumento 40x). **(e)** indivíduo de número 783 demonstrando a presença de 4 marcas de viii

crescimento (aumento 40x). **(f)** indivíduo de número 784 demonstrando a presença de 5 marcas de crescimento (aumento 40x) 56

Figura 11 – Correlação entre o número de linhas de crescimento no úmero e o comprimento curvilíneo da carapaça (ccc) de *Chelonia mydas* no litoral norte do Rio Grande do Sul..... 58

RESUMO

A tartaruga-verde, *Chelonia mydas*, possui ampla distribuição geográfica circuntropical, ocorrendo em toda zona costeira brasileira. A espécie está incluída em diversas listas de animais ameaçados de extinção, sendo assim fundamental a elaboração de modelos demográficos que possam vir a subsidiar futuros planos de manejo. Contudo, muitos aspectos referentes à história de vida destes animais ainda são pouco conhecidos, por serem animais marinhos de difícil observação, especialmente durante o período que despendem nas áreas de alimentação e durante as grandes migrações. As tartarugas marinhas apresentam características, em seu ciclo de vida, que dificultam a realização de estudos de marcação e recaptura, para determinação de parâmetros importantes como crescimento e determinação de idade. Por esta razão, muitos estudos envolvendo determinação de idade utilizando linhas cíclicas de crescimento presentes nos tecidos rígidos - esqueletocronologia, vêm sendo acumulados para esta espécie. Muito pouco se sabe sobre quaisquer aspectos relacionados às etapas do ciclo de vida das tartarugas marinhas que habitam o litoral do Rio Grande do Sul, deste modo, este estudo tem como principal objetivo avaliar a técnica histológica utilizada usualmente nas análises de esqueletocronologia em tartarugas marinhas a fim de verificar a ocorrência de crescimento cíclico nos ossos e de se obter estimativas de idade para a população local. As amostras são provenientes de tartarugas-verdes encalhadas no litoral norte do Rio Grande do Sul e coletadas, de forma sistemática entre Torres e Mostardas, de março de 1994 a setembro de 2003. Os 89 exemplares (35%) de tartarugas-verdes registrados indicam que a espécie é a segunda em número de ocorrências, sendo menos freqüente apenas que *Caretta caretta* (54%). Foi verificada apenas a ocorrência de exemplares juvenis (ccc = 29,0 a 52,0 cm, média = 38,9cm), que estão iniciando o período de desenvolvimento costeiro. A técnica avaliada não apresentou os resultados esperados, necessitando de algumas modificações metodológicas. A partir da observação dos cortes histológicos pôde-se constatar a presença de linhas de crescimento ósseo em apenas onze dos vinte e quatro indivíduos que apresentaram resultados satisfatórios na preparação histológica, indicando que a deposição das linhas pode ser variável e dependente de fatores ambientais. Nos onze indivíduos puderam ser distinguidas de uma a cinco linhas de crescimento, indicando uma idade entre 1 e 5 anos para o término da fase no ambiente pelágico. Com estes resultados obteve-se o primeiro registro da presença de linhas de crescimento ósseo, assim como, a primeira estimativa de idade para a população de *Chelonia mydas* no início de sua fase de desenvolvimento costeiro no Brasil.

1 – INTRODUÇÃO

1.1– Tartarugas Marinhas – Diversidade, ocorrência no Brasil e conservação

As tartarugas marinhas pertencem à Classe Reptilia, Ordem Testudines, Subordem Cryptodira (POUGH *et al.*, 1998). Os primeiros fósseis de tartarugas marinhas datam de sedimentos de 110 milhões de anos atrás (HIRAYAMA, 1998) e a diversidade morfológica e taxonômica conhecida no registro fóssil supera a conhecida no presente. Apenas sete espécies são conhecidas atualmente, estando divididas em duas famílias, sendo seis espécies de tartarugas marinhas com casco recoberto por escudos córneos, da família Cheloniidae (Gray, 1825), e uma espécie morfológicamente divergente, com casco recoberto por epiderme coriácea, da família Dermochelyidae (Wieland, 1902) (PRITCHARD, 1979).

As sete espécies consideradas pela taxonomia vigente incluem: *Caretta caretta* (Linnaeus, 1758), *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758), *Eretmochelys imbricata* (Linnaeus, 1766), *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz, 1829), *Lepidochelys kempii* (Garman, 1880), *Natator depressus* (Garman, 1880) e *Dermochelys coriacea* (Linnaeus, 1766). Uma oitava espécie, a tartaruga-negra ou tartaruga-verde-do-Pacífico-Leste (*Chelonia agassizii*), é reconhecida por alguns biólogos (e.g., ALVARADO *et al.*, 1993; PRITCHARD & MORTIMER, 1999), porém os dados morfológicos, bioquímicos e genéticos publicados até a presente data são conflitantes, indicando a necessidade de mais estudos que definam a sua relação com *Chelonia mydas* (ver detalhes em BOWEN & KARL, 1997 e PRITCHARD, 1997).

No Brasil, são encontradas cinco espécies, a tartaruga-cabeçuda (*Caretta caretta*), a tartaruga-verde (*Chelonia mydas*), a tartaruga-de-pente (*Eretmochelys imbricata*), a tartaruga-oliva (*Lepidochelys olivacea*) e a tartaruga-de-couro (*Dermochelys coriacea*),

que desovam no continente ou em ilhas oceânicas das regiões nordeste e sudeste (MARCOVALDI & MARCOVALDI, 1999). Fora da estação reprodutiva, adultos e indivíduos juvenis em vários estágios de desenvolvimento podem ser encontrados ao longo de quase todo litoral, especialmente nas áreas de alimentação (MARCOVALDI *et al.*, 1998; MARCOVALDI & MARCOVALDI, 1999; GALLO *et al.*, 2000; MARCOVALDI *et al.*, 2000). Atualmente o maior acúmulo de informações a respeito das tartarugas marinhas no Brasil está centrado em aspectos ligados à reprodução.

No Rio Grande do Sul já foram registradas as cinco espécies de tartarugas marinhas encontradas no Brasil, porém a tartaruga-de-pente e a tartaruga-oliva parecem ocorrer apenas ocasionalmente (LEMA & FERREIRA, 1990; D'AMATO, 1992; MARTINS *et al.*, 1996; PINEDO *et al.*, 1996; SOTO & BEHEREGARAY, 1997a; MORENO *et al.*, 2003). Entre as demais espécies têm sido observadas grandes diferenças nas frequências de ocorrência relativas e, especialmente, nas classes de tamanho dos indivíduos encontrados na região (MARTINS *et al.*, 1996; SILVA & ALMEIDA, 1998; NAKASHIMA, *et al.*, 2001; MORENO *et al.*, 2003). Diferenças sazonais nas taxas de ocorrência também parecem ocorrer, porém muito pouco ainda se conhece a este respeito neste Estado (NAKASHIMA, *et al.*, 2001; TRIGO & BORGES-MARTINS, 2001; TRIGO *et al.*, 2001).

Em todo mundo, estes répteis têm sido caçados há centenas de anos, por causa de sua carne, óleo, carapaça, pele e ovos. Entretanto, foi no início deste século que sua comercialização cresceu consideravelmente. A captura insustentável resultou em um esgotamento muito rápido de numerosas colônias, estando algumas destas atualmente próximas à extinção (MÁRQUEZ, 1990).

Inúmeras ameaças a estes animais são conhecidas, tanto nas praias de desova como em áreas oceânicas e costeiras, durante o período migratório e de alimentação (CÂMARA, 1982). A urbanização das praias, com a construção crescente de edificações, o alto tráfego

de pessoas e a iluminação noturna são, atualmente, uma grande ameaça à manutenção das áreas de desova (PETERS & VERHOEVEN, 1994; WITHERINGTON, 1999). Já em relação ao ambiente marinho, altas taxas de mortalidade têm sido observadas e se devem principalmente à captura acidental em redes de pesca de emalhe e de arrasto, bem como em espinhéis de pesca oceânica (SHOOP & RUCKDESCHEL, 1982; CHAN *et al.*, 1988; CAILLOUET *et al.*, 1991; GUINEA *et al.*, 1997; ACHAVAL *et al.*, 1998; BARATA *et al.*, 1998; ECKERT & SARTI, 1998; MARCOVALDI *et al.*, 1998; OTT *et al.*, 1999; GALLO *et al.*, 2000; MARCOVALDI *et al.* 2000). Ameaças adicionais como a poluição dos oceanos, também tem contribuído para o aumento dos riscos de extinção destes animais (GIBSON & SMITH, 1999).

Assim, todas as espécies, exceto *Natator depressus*, estão classificadas como Ameaçadas ou Vulneráveis na Lista Vermelha da União Mundial para a Conservação da Natureza (IUCN, 2003). Todas espécies constam do Apêndice I da Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies Ameaçadas de Fauna e Flora Selvagem e todas, exceto *Natator depressus*, constam também dos Apêndices I e II da Convenção sobre a Conservação de Espécies Migratórias de Animais Selvagens (CEM ou Convenção de Bona) (HYKLE, 1999).

1.2– *Chelonia mydas* – Características gerais, biologia e distribuição

A tartaruga marinha *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) (Fig.1) é popularmente conhecida como tartaruga-verde, recebendo este nome em função da coloração de seu óleo (HIRTH, 1971). São animais grandes, que atingem cerca de 120 cm de comprimento da carapaça e que podem pesar aproximadamente 230 kg (PRITCHARD & MORTIMER, 1999). A

tartaruga-verde é um animal tipicamente nectônico e solitário, podendo ocasionalmente formar agregações em áreas de alimentação (MÁRQUEZ, 1990).



Figura 1 - Exemplar de *Chelonia mydas* encalhado no litoral norte do Rio Grande do Sul. Foto Rodrigo Baleia.

As tartarugas-verdes são facilmente diagnosticáveis das demais tartarugas marinhas por apresentarem as seguintes características: quatro pares de escudos laterais ou costais; doze pares de escudos marginais; cinco escudos vertebrais ou centrais, com o mais anterior em contato com o escudo nugal e mais dois pares de escudos marginais; a cabeça possui um único par de escudos pré-frontais (entre as órbitas) e quatro pares de placas pós-orbitais (CARR, 1952; PRITCHARD & TREBBAU, 1984).

Apresentam coloração com grande variação individual e ontogenética. A carapaça é preta nos filhotes, porém nos adultos a coloração varia de marrom até quase preta, podendo ser uniforme ou, ainda, apresentar manchas ou listras. O plastrão, que é totalmente branco nos filhotes, torna-se gradativamente amarelado com a maturidade (PRITCHARD &

MORTIMER, 1999). As escamas dorsais da cabeça e dos membros são pretas nos filhotes, tornando-se marrons ou acinzentadas com as bordas claras, à medida que o animal cresce (PRITCHARD & TREBBAU, 1984).

Durante os primeiros anos de vida, as tartarugas-verdes são onívoras, consumindo preferencialmente alimento de origem animal (BJORNDAL, 1985). Depois deste primeiro estágio, estes animais tornam-se predominantemente herbívoros, ocupando um nicho único entre as tartarugas marinhas (BJORNDAL, 1997), e raro, mesmo entre outros grandes vertebrados marinhos. As tartarugas-verdes alimentam-se principalmente de monocotiledôneas marinhas (e.g. *Thalassia testudinum*) e de algas, todavia também consomem matéria animal, particularmente águas-vivas, salpas e esponjas (BJORNDAL, 1997). Variações na dieta principal podem ser observadas, dependendo da população e de sua distribuição geográfica (FERREIRA, 1968; BJORNDAL, 1980; SAZIMA & SAZIMA, 1983).

As tartarugas-verdes ocupam uma grande variedade de habitats ao longo de sua vida, incluindo habitats pelágicos oceânicos, quando jovens, e zonas de desenvolvimento, alimentação e desova, em regiões costeiras, quando juvenis ou adultos (MUSICK & LIMPUS, 1997). Esta espécie migra de colônias de reprodução para áreas de alimentação, as quais podem distar milhares de quilômetros. Os intervalos entre as sucessivas migrações para desova dependem da população, da localização e da qualidade das áreas de alimentação (MÁRQUEZ, 1990). As fêmeas usualmente apresentam fidelidade ao sítio de desova, ou seja, elas retornam para colocar os ovos em locais próximos aos utilizados na última estação reprodutiva (MEYLAN *et al.*, 1990), ou ainda, retornam para a mesma praia de onde emergiram como filhotes (BOWEN *et al.*, 1992). Esta fidelidade resulta em uma estruturação da espécie em diversas populações reprodutivas, pelo menos em relação às fêmeas (BOWEN & AVISE, 1994). Já, estudos de marcação-recaptura e análises genéticas, têm revelado que áreas de forrageio podem ser compartilhadas por diferentes populações

de tartarugas-verdes (PRITCHARD, 1969; CARR, 1975; MORTIMER & CARR, 1987; BOWEN & AVISE, 1995; MEYLAN, 1995; LAHANAS *et al.*, 1998; BASS & WITZELL, 2000).

A distribuição geográfica da tartaruga-verde é bastante ampla, abrangendo os ambientes tropicais e ocasionalmente subtropicais nos Oceanos Atlântico, Pacífico e Índico e nos Mares Mediterrâneo e Vermelho (PRITCHARD & MORTIMER, 1999). A maioria das áreas de reprodução encontra-se em locais onde a temperatura da água é superior a 25°C (MÁRQUEZ, 1990). As colônias reprodutivas podem ser encontradas no litoral dos continentes (como na Costa Rica e Suriname), em ilhas em barreiras de coral (Austrália), ou em ilhas oceânicas remotas (por exemplo, Ilha Ascensão e Atol das Rocas) (PRITCHARD, 1997).

No Brasil, embora existam registros esporádicos de desovas em alguns pontos no litoral dos estados do Rio Grande do Norte, Bahia, Sergipe e Espírito Santo (MARCOVALDI & LAURENT, 1996; MARCOVALDI & MARCOVALDI, 1999), a espécie reproduz-se regularmente apenas em ilhas oceânicas como Trindade, Atol das Rocas e Fernando de Noronha (BELLINI & SALES, 1992; BELLINI *et al.*, 1995; MOREIRA *et al.*, 1995; MARCOVALDI & MARCOVALDI, 1999). Além disso, a tartaruga-verde pode ser encontrada em áreas de alimentação ao longo da costa brasileira até a região Sudeste, e nas Ilhas de Fernando de Noronha e Atol das Rocas (MARCOVALDI *et al.* 1998, 2000; SANCHES & BELLINI, 1999; GALLO *et al.*, 2000).

Na Região Sul do Brasil foi registrada a ocorrência de tartarugas-verdes juvenis em Santa Catarina (LEMA e FERREIRA, 1990) e, juvenis e adultas, no estado do Paraná (D'AMATO, 1991). No Rio Grande do Sul existem registros para toda a costa baseados, principalmente, em encalhes de animais mortos nas praias (LEMA & FERREIRA, 1990; MARTINS *et al.*, 1996; PINEDO *et al.*, 1996; SILVA & ALMEIDA, 1998; BUGONI & KRAUSE, 2001; MORENO *et al.*, 2003). Um registro indica também a ocorrência da espécie no

interior da Laguna dos Patos, pelo menos até a região do Saco de Tapes (SOTO & BEHEREGARAY, 1997b).

Para o Uruguai foram registradas ocorrências desta espécie em toda costa e ao longo do estuário do Rio da Prata (ACHAVAL, 1965; ACHAVAL, 1968; GUDYNAS, 1980; FRAZIER, 1984). Na Argentina os registros abrangem, além do estuário do Rio da Prata, ainda a costa leste da província de Buenos Aires, principalmente nas proximidades da cidade de Mar del Plata (FRAZIER, 1984). Em ambos países são encontrados somente indivíduos juvenis (FRAZIER, 1984).

1.3- Estudos de crescimento e determinação de idade

O conhecimento das taxas de crescimento naturais e da idade dos indivíduos de uma população é fundamental para entender a demografia, avaliar a qualidade do hábitat, e projetar planos de manejo e medidas conservacionistas adequadas para as espécies ameaçadas de extinção (BJORNDAL & BOLTEN, 1988).

Para se determinar o crescimento dois tipos de técnicas podem ser reconhecidas: as diretas e as indiretas. As medidas diretas de crescimento consistem em determinar o aumento de tamanho dos indivíduos ao longo do tempo através de sua marcação e recaptura. Os métodos indiretos fornecem estimativas de taxas de crescimento passadas. Estes incluem as análises de frequência de comprimento dos indivíduos em amostras da população e o exame de marcas de crescimento em tecidos rígidos (DAM, 1999).

Em muitas espécies de animais, a técnica de marcação e recaptura é difícil de ser executada, e por esta razão, muitos estudos utilizando a análise de linhas cíclicas de crescimento presentes nos tecidos rígidos vêm sendo desenvolvidos em diversos grupos de vertebrados.

Em peixes, por exemplo, as estruturas utilizadas são principalmente os otólitos (PANELLA, 1971; CERCHIARI & ANDRADE, 2000; LEITE JR. & HAIMOVICI, 2000), enquanto em mamíferos, estas linhas cíclicas são observadas nos dentes (HOHN & FERNANDEZ, 1999; PINEDO & HOHN, 2000; ROSAS *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2003). Já em anfíbios e répteis, o padrão cíclico de crescimento é evidenciado nos ossos longos.

A análise de marcas de crescimento nos ossos é denominada esqueletocronologia. Inúmeros trabalhos vêm sendo desenvolvidos com a utilização deste método no grupo dos anfíbios (e.g. CAETANO, 1990; ESTEBAN, 1990; LECLAIR, 1990; MONTORI, 1990; CASTANET *et al.*, 1996; PARHAM *et al.*, 1996; GUARINO *et al.*, 1998; SAGOR *et al.*, 1998; SULLIVAN & FERNANDEZ, 1999; ALCOBENDAS *et al.*, 2000; MEASEY, 2001). Igualmente para os répteis, a esqueletocronologia têm sido amplamente utilizada (e.g. CASTANET *et al.*, 1988; SANDER, 1990; EL MOUDEN *et al.*, 1999; HORNER *et al.*, 1999; WAYE, 1999; VARELLA & CABRERA, 2000). Muitos destes estudos, principalmente em anfíbios e lagartos, vêm sendo associados à marcação e recaptura, visto que o método de marcação, que consiste no corte das falanges dos animais capturados, também proporciona as amostras para a esqueletocronologia (CASTANET *et al.*, 1988; CAETANO, 1990; GUARINO *et al.*, 1998; SAGOR *et al.*, 1998; SULLIVAN *et al.*, 1999; MIAUD *et al.*, 2000; MEASEY, 2001).

No grupo dos quelônios, além dos ossos (e.g. CASTANET & CHEYLAN, 1979, CASTANET, 1982 *apud* ZUG *et al.* 1986), a carapaça também é amplamente utilizada na determinação da idade dos animais através da contagem dos anéis de crescimento em seus escudos epidérmicos (revisões em GRAHAM, 1979, GERMANO & BURY, 1998 e WILSON *et al.*, 2003).

1.3.1 – Crescimento e determinação de idade em tartarugas marinhas

Inúmeros trabalhos têm sido realizados com espécies de tartarugas marinhas, através de marcação e recaptura (e.g., CARR & GODMAN, 1970; LIMPUS & WALTER, 1980; FRAZER & EHRHART, 1985; FRAZER & LADNER, 1986; BJORN DAL & BOL TEN, 1988; BOULON & FRAZER, 1990; COLLAZO *et al.*, 1992; EHRHART & WITHAM 1992; GREEN, 1993; SHAVER, 1994; BALAZS, 1995), contudo, estes animais possuem características que dificultam a realização deste tipo de estudo. As tartarugas marinhas possuem crescimento lento, necessitando de um grande investimento de tempo para se obter resultados satisfatórios. A probabilidade de recaptura dos indivíduos marcados é muito baixa, devido às peculiaridades de cada estágio de vida (por exemplo, filhotes ocupando um hábitat pelágico) e também às altas taxas de mortalidade no estágio juvenil de vida, além da alta mortalidade, induzida pelo homem, tanto de juvenis quanto de adultos (BJORN DAL & BOL TEN, 1995).

Devido à impossibilidade técnica de marcação de filhotes para seu posterior reconhecimento quando adultos, não existem dados sobre crescimento longitudinal para toda fase de crescimento juvenil para nenhuma das espécies (ZUG & PARHAM, 1996). Nenhum indivíduo foi, até hoje, rastreado desde o nascimento até o retorno à praia para desova. Por esta razão, as estimativas de idade de maturação sexual para as espécies de tartarugas marinhas derivam de extrapolações de modelos de crescimento (ZUG *et al.* 1997).

A estrutura da carapaça das tartarugas marinhas não permite a contagem de linhas de crescimento (HOHN & FRAZIER, 1979; TUCKER & LIMPUS, 1992), e por isso, o método indireto de determinação de idade que mais vêm sendo utilizado para estes animais é a esqueletocronologia. Estudos deste tipo já foram realizados em várias espécies de

tartarugas marinhas, abrangendo populações de diferentes locais: *Caretta caretta* (ZUG *et al.*, 1986; KLINGER & MUSICK, 1992; ZUG *et al.*, 1995; PARHAM & ZUG, 1998; COLES *et al.*, 2001); *Lepidochelys kempii* (ZUG, 1991; ZUG *et al.*, 1997); *Dermochelys coriacea* (ZUG & PARHAM, 1996); e *Chelonia mydas* (BJORNDAL *et al.*, 1998; ZUG & BALAZS, 1985; ZUG & GLOR, 1998; ZUG *et al.*, 2002).

As análises de esqueletocronologia produzem estimativas de idade, não idades reais. Sua utilidade não é para a identificação da idade individual dos animais, mas sim para prever o padrão de crescimento da população e uma idade de maturação média (ZUG *et al.* 1997). As linhas ósseas do córtex são as linhas de crescimento utilizadas neste tipo de estudo. Admite-se que estas linhas de crescimento são produtos de um crescimento anual. Cada linha de crescimento consiste de uma área de coloração clara e de uma área de coloração escura. A área clara representa uma área de rápido crescimento, e a escura, crescimento lento ou nulo. Juntas, as áreas claras e escuras adjacentes representam um ciclo completo de crescimento (ZUG *et al.*, 1986).

Visto que a reabsorção e remodelagem são as principais características do crescimento do osso em tartarugas marinhas, as técnicas de esqueletocronologia devem quantificar a perda progressiva das primeiras linhas de crescimento (ZUG *et al.*, 1997). Segundo CASTANET & SMIRINA (1990), os ossos longos dos membros são as partes mais adequadas do esqueleto para a análise das marcas de crescimento. O úmero e o fêmur retêm numerosas linhas de perióstio na porção média da diáfise, onde o perióstio do córtex é mais espesso e a cavidade medular é mais estreita, sendo esta a região que contém o maior número de linhas de perióstio não modificadas (ZUG, 1990).

1.3.2 - Crescimento e determinação de idade em *Chelonia mydas*

Para *Chelonia mydas*, estudos sobre crescimento e determinação de idade vêm sendo realizados em diversas de suas populações. Aqueles envolvendo o método de marcação e recaptura já foram conduzidos tanto para indivíduos juvenis quanto para adultos, principalmente no Hawai (BALAZS, 1995), Austrália (LIMPUS & WALTER, 1980), Ilha de Ascensão, Suriname, Costa Rica (FRAZER & LADNER, 1986) e Flórida (MENDONÇA, 1981; FRAZER & EHRHART, 1985). Da mesma forma, a esqueletocronologia também tem sido amplamente empregada para acessar estes parâmetros, obviamente requeridos para um melhor entendimento da dinâmica populacional das espécies. Esta técnica já foi utilizada em populações do Hawaii (ZUG & BALAZS, 1985; ZUG *et al.*, 2002), Flórida (ZUG & GLOR, 1998) e Bahamas (BJORNDAL *et al.*, 1998).

No Brasil estudos sobre padrões de crescimento em *Chelonia mydas*, assim como para as demais espécies, não foram realizados até o momento. Em áreas com grande concentração de indivíduos, principalmente juvenis, como no Arquipélago de Fernando de Noronha (SANCHES & BELLINI, 1999), foram desenvolvidos estudos envolvendo a metodologia de marcação e recaptura, porém considerações referentes ao crescimento não foram abordadas.

Muito pouco se sabe, ainda, sobre quaisquer aspectos relacionados às etapas do ciclo de vida das tartarugas marinhas que habitam o litoral do Rio Grande do Sul. Entretanto, a partir do registro de encalhes destes animais nesta região (MORENO *et al.*, 2003), o grande número de indivíduos encontrados mortos são convertidos em espécimes potencialmente valiosos para diversos tipos de pesquisa.

A morfologia da costa do RS é extremamente favorável para o registro periódico do encalhe de animais marinhos, visto que apresenta um litoral uniforme com uma grande

extensão de área aberta, não apresentando elevações (à exceção de Torres) fora dos cômodos de areia, cujas cotas altimétricas raras vezes alcançam 20 metros (RAMBO, 1994). A análise de exemplares encalhados pode auxiliar na coleta de dados biológicos, principalmente no estudo daquelas espécies animais de difícil observação ou ameaçadas de extinção, como é o caso de *Chelonia mydas*, onde a coleta proposital é obviamente incoerente.

A oportunidade de aquisição de amostras de tecido ósseo, sem o sacrifício de animais, torna possível a utilização da esqueletocronologia para a população desta região. Além disso, a abundância de encalhes da espécie possibilita a obtenção de um grande número de amostras (NAKASHIMA, *et al.*, 2001; MORENO *et al.*, 2003).

A distribuição das classes de tamanho observadas para esta população indica que esta é composta por indivíduos juvenis (TRIGO & BORGES-MARTINS, 2001). Visto que a reabsorção e remodelagem são as principais características do crescimento do osso em tartarugas marinhas, e que esta reabsorção acentua-se à medida que o animal cresce, espera-se que os indivíduos juvenis, encontrados no litoral do Rio Grande do Sul, sejam mais fáceis de serem estudados por esta técnica, já que a remodelagem óssea é muito menor do que nos subadultos e adultos.

O tamanho dos animais da população do litoral do RS condiz com aquele no qual estes aparecem na costa pela primeira vez desde sua entrada no mar, logo após o nascimento (BJORNDAL & BOLTEN, 1988; BJORNDAL & BOLTEN, 1988; BALAZS, 1995). Muito pouco se sabe ainda sobre o hábitat ocupado pelos animais mais jovens, e por esta razão, este período, entre o nascimento e o retorno à região costeira, é freqüentemente referido como “lost year” (PRITCHARD & TREBBAU, 1984). Assim, torna-se importante a realização de estudos sobre a idade dos animais que estão nesta fase do ciclo de vida, visto que a aquisição de dados sobre este período é, também, grandemente impedida pela falta

de técnicas de marcação adequadas e duráveis para os animais recém-nascidos (WITHAN, 1980).

O presente estudo tem por objetivo ampliar o atual conhecimento sobre as tartarugas-verdes no litoral do Rio Grande do Sul com relação a aspectos relacionados ao crescimento e idade. Os objetivos específicos são:

- Avaliar a técnica histológica utilizada usualmente nas análises de crescimento ósseo em tartarugas marinhas.
- Verificar a ocorrência de crescimento cíclico nos ossos a fim de se obter estimativas de idade de *Chelonia mydas* no Estado do Rio Grande do Sul.

2– MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 – Área de estudo

O estudo foi conduzido na costa norte do estado do Rio Grande do Sul, entre a barra do Rio Mampituba, em Torres (29°19'S, 49°43'W), e a barra da Lagoa do Peixe, em Mostardas (31°22'S, 51°02'W). Esta área cobre 271 km de praias e inclui duas comunidades pesqueiras artesanais: Torres e Tramandaí/Imbé (29°58'S, 50°07'W) (Fig. 2).

A área de estudo apresenta clima subtropical à temperado (MORENO, 1961) e localiza-se nas proximidades da Zona de Convergência Subtropical, possuindo um padrão complexo de diferentes tipos de água. A região apresenta a influência de duas correntes: a Corrente do Brasil e a Corrente das Malvinas. Durante o período do verão, esta região é influenciada por águas tropicais de maior temperatura (>20°C) e salinidade (36,00‰) proveniente da Corrente do Brasil. Nos meses de inverno, a plataforma continental é dominada pelas águas continentais do Rio da Prata e da Lagoa dos Patos, bem como pelas águas frias (4 a 15°C) e de baixa salinidade (33,70‰ a 34,15‰) da Corrente das Malvinas (GARCIA, 1997). As marés possuem uma amplitude de cerca de 50 cm, com a maré alta ocorrendo ao meio-dia e meia-noite. Entretanto os ventos possuem uma influência predominante no nível do mar, baixando o mesmo com ventos de nordeste e levantando com os de sul.

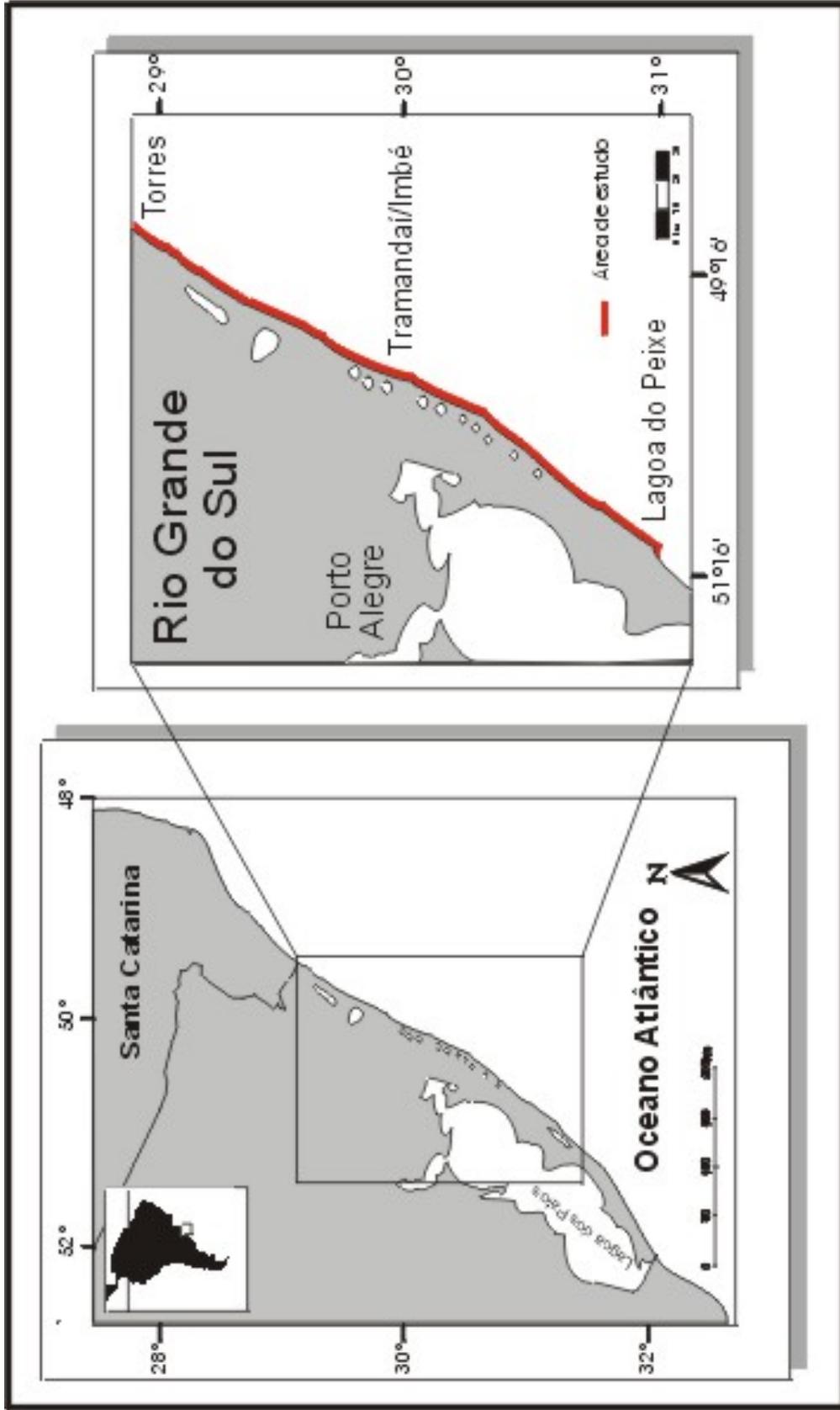


Figura 2 - Localização da área de estudo.

2.2 – Metodologia de campo

As amostras foram coletadas durante monitoramentos de praia com frequência aproximadamente mensal, realizados entre março de 1994 e setembro de 2003, ao longo dos 271 km da área de estudo. Cada monitoramento teve a duração aproximada de dois dias, sendo um dia destinado ao percurso do trecho Tramandaí/Mostardas, e o outro, ao trecho Imbé/Torres. Durante o período de estudo, foram percorridos 18.298 km.

Estes monitoramentos fazem parte de um projeto sistemático de levantamento dos encalhes de mamíferos marinhos e tartarugas marinhas do Litoral Norte do Rio Grande do Sul, implementado pelo Grupo de Estudos de Mamíferos Aquáticos do Rio Grande do Sul (GEMARS), em parceria com o Centro de Estudos Costeiros, Limnológicos e Marinhos da UFRGS (CECLIMAR). Este projeto visa, a partir da análise das carcaças encalhadas regularmente no litoral do Estado, fornecer informações sobre os padrões de ocorrência das diferentes espécies de mamíferos marinhos e tartarugas marinhas, bem como identificar seus problemas de conservação e subsidiar estudos sobre a ecologia e história natural destas espécies. Apesar das amostras terem sido coletadas desde 1994, a participação efetiva da autora no projeto e, conseqüentemente, nas coletas, teve início no ano 2000. Entretanto, todo o material coletado desde o início do projeto foi disponibilizado pelo GEMARS.

Em campo, os indivíduos foram medidos (Fig.3a) e, quando possível, pesados e sexados. Entretanto, devido, principalmente, ao estado avançado de decomposição de alguns espécimes estes não apresentaram condições para a realização de tais procedimentos. As medidas básicas tomadas para cada animal foram o comprimento curvilíneo da carapaça (ccc) e a largura curvilínea máxima da carapaça (lcc). O comprimento curvilíneo é medido na linha mediana da carapaça, desde o ponto médio

anterior (escudo nugal) até a porção mais distal das escamas supracaudais (Fig3b). Já a largura curvilínea é medida no ponto mais largo da carapaça (Fig.3c) (BOLTEN, 1999). As medidas foram realizadas com uma fita métrica flexível com precisão de 0,5 centímetro.

Os crânios e úmeros das tartarugas foram coletados e acondicionados em sacos plásticos permeáveis à água. Todas as peças ósseas coletadas foram mantidas em tanques sob a ação de água corrente para a maceração dos tecidos moles. Este processo de maceração e limpeza foi realizado no CECLIMAR. Todo o material testemunho coletado recebeu um número de registro nos catálogos de campo do GEMARS e, posteriormente, foi tombado na Coleção de Anexos do Laboratório de Herpetologia do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS (MCPAN).

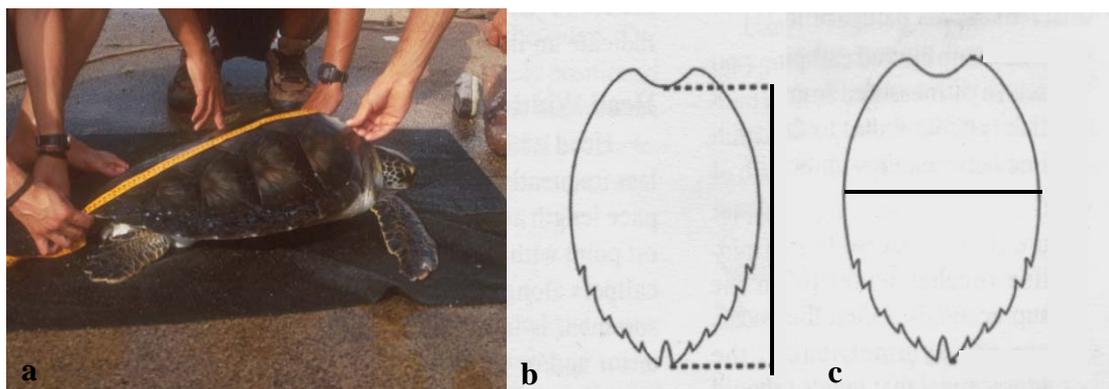


Figura 3 – Medidas realizadas em campo nos exemplares de *Chelonia mydas* encontrados encalhados no litoral do Rio Grande do Sul. (a) e (b) comprimento curvilíneo da carapaça (ccc); (c) largura curvilínea da carapaça (lcc). Figuras (b) e (c) modificadas a partir de BOLTEN (1999).

2.3 – Material

O material utilizado neste estudo consiste de 89 exemplares da espécie *Chelonia mydas* coletados na área de estudo, entre os anos de 1994 e 2003 (Anexo I). Setenta e três espécimes desta amostra foram utilizados na análise das classes de tamanho e, cinquenta e quatro espécimes (Tab.I) foram utilizados para a análise das marcas de crescimento. Todos os exemplares encontram-se depositados na Coleção de Anexos do Laboratório de Herpetologia do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS (MCPAN).

2.4 – Análise das classes de tamanho

As medidas de comprimento curvilíneo da carapaça (ccc), realizadas para cada exemplar de tartaruga-verde coletado, foram agrupadas em classes para uma melhor visualização da faixa de tamanho registrada. A partir dos comprimentos dos animais coletados, seis classes de tamanho foram estabelecidas: 1) 25-30 cm; 2) <30-35 cm; 3) <35-40 cm; 4) <40-45 cm; 5) <45-50 cm; 6) <50 -55 cm.

2.5 – Análise das marcas de crescimento

Os espécimes foram processados com o objetivo de implementar uma rotina de preparação histológica para a população do litoral do Rio Grande do Sul. Devido à importância da seleção dos ossos, e partes destes, mais adequados para a realização das análises das marcas de crescimento, nem todos indivíduos coletados puderam ser utilizados nas análises. Muitos dos indivíduos encalhados não possuíam os membros anteriores ou posteriores (devido a predação, malformação, estado avançado de putrefação ou remoção

por pescadores e moradores locais), sendo assim retirados da amostra. Mesmo sendo possível a utilização de outros ossos longos para a realização da análise, foram utilizados apenas os úmeros para padronizar a amostra. Mesmo que o padrão geral das linhas nos diferentes ossos de um indivíduo seja usualmente o mesmo, diferentes ossos e até diferentes partes destes podem diferir na duração dos períodos de crescimento e, assim, registrar diferentes números de ciclos de crescimento (CASTANET & SMIRINA, 1990). Sendo assim a presença de outros ossos nos indivíduos encalhados não foi levada em consideração. Os úmeros dos exemplares coletados foram isolados e macerados em água para a remoção dos tecidos moles. Posteriormente ao processo de maceração dos tecidos, os ossos foram lavados e secos, sendo então, estocados em coleção.

A preparação das amostras para a análise das marcas de crescimento baseou-se na metodologia empregada por ZUG *et al.* (1986). Esta técnica é usualmente a mais utilizada para a realização deste tipo de estudo de determinação de idade em tartarugas marinhas (e.g. ZUG & PARHAM, 1996; PARHAM & ZUG, 1998; ZUG & GLOR, 1998; ZUG *et al.*, 2002; BJORN DAL *et al.*, 2003). Algumas modificações na preparação histológica de ZUG *et al.* (1986) tiveram que ser realizadas em função das diferenças nos tipos de equipamentos empregados, e da obtenção de alguns resultados inesperados (discutidos em detalhe na seção 3.3.1). Todas modificações empregadas estão descritas oportunamente adiante.

A preparação do material foi realizada conforme a descrição a seguir:

Inicialmente, foram tomadas 12 medidas para cada úmero analisado (Fig.4, Tab.II). A realização destas medidas é importante uma vez que os ossos são cortados, impossibilitando, assim, futuras medições. Estas medidas podem vir a ser necessárias em outros estudos sobre crescimento ósseo, portanto o corte dos ossos sem a realização destas impediria a realização destes novos estudos.

As medidas realizadas foram as seguintes:

- 1) comprimento máximo (CM): distância da extremidade mais próxima do processo ulnar à superfície articular distal.
- 2) comprimento longitudinal (CL): distância da superfície próxima à cabeça à superfície articular distal, paralela ao eixo longitudinal do úmero.
- 3) comprimento do processo ulnar (CPU): distância da extremidade proximal do processo ulnar até a junção da cabeça e do processo.
- 4) comprimento proximal (CP): distância da superfície próxima à cabeça até a borda distal do processo radial, paralelo ao eixo longitudinal.
- 5) largura proximal (LP): distância da superfície pré-axial da cabeça à superfície pós-axial do processo ulnar, perpendicular ao eixo longitudinal.
- 6) comprimento do processo radial (CPR): distância entre as bordas pré e pós axiais do processo, diagonal ao eixo longitudinal.
- 7) largura na crista deltopeitoral (LCDp): distância transversal da haste desde a superfície pré até a pós-axial na crista deltopeitoral.
- 8) largura média (LM): distância transversal da superfície pré até a pós-axial no ponto de largura mínima.
- 9) largura distal (LD): distância transversal da superfície pré até a pós-axial na junção dos côndilos articulares com a haste (diáfise).
- 10) diâmetro máximo da cabeça (DCMax).
- 11) diâmetro mínimo da cabeça (DCMin).
- 12) espessura (E): profundidade mínima no meio da haste, aproximadamente a cerca da largura média (LM), perpendicular aos eixos longitudinal e transversal.

Tabela I – Caracterização da amostra de *Chelonia mydas* utilizada para análise das marcas de crescimento. Número de registro nos catálogos de campo do GEMARS, para cada indivíduo, com seu respectivo número de registro na Coleção de Anexos do Laboratório de Herpetologia do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS (MCPAN), data de coleta e dados biométricos: comprimento curvilíneo da carapaça (ccc) e largura curvilínea da carapaça, ambos expressos em centímetros; massa do animal expressa em quilogramas.

GEMARS Nº	MCPAN Nº	Data Ano	Biometria		
			ccc (cm)	lcc (cm)	Massa (kg)
18	784	1994	-	-	-
27	326	1994	38,0	37,5	-
32	320	1994	34,5	31,5	-
33	783	1994	45,0	40,0	-
38	322	1995	35,0	-	4,9
39	327	1995	42,0	40,0	-
40	328	1995	34,5	30,5	-
77	774	1997	35,5	32,0	5,2
80	778	1997	37,0	35,0	-
86	777	1997	36,0	-	-
87	769	1997	35,0	34,0	-
88	761	1997	39,0	37,0	-
89	785	1997	37,5	34,0	-
90	768	1997	38,5	-	-
91	772	1997	-	-	-
92	776	1997	35,0	-	-
101	771	1997	38,0	36,0	-
106	992	1997	39,0	37,0	-
109	990	1997	41,5	39,0	-
110	993	1997	44,0	40,0	-
111	991	1997	35,0	32,0	4,0
112	981	1997	42,0	39,0	6,5
113	763	1997	39,0	38,0	7,5
114	779	1997	39,0	36,0	7,25
115	762	1997	33,0	30,0	3,75
116	767	1997	39,0	37,0	6,8
117	979	1997	40,0	37,5	-
118	995	1997	35,0	33,5	-

Continuação Tabela I

GEMARS	MCPAN	Data	Biometria		
			ccc (cm)	lcc (cm)	Massa (kg)
Nº	Nº	Ano			
122	985	1997	38,5	35,0	-
125	982	1997	43,0	43,0	8,5
127	984	1997	43,5	40,5	-
128	980	1997	40,0	39,5	-
129	986	1997	40,5	38,0	-
130	996	1997	36,0	32,0	-
131	987	1997	37,0	33,0	5,5
133	1044	1997	29,0	27,5	-
134	988	1997	40,0	38,0	-
135	983	1997	40,0	38,0	-
137	770	1997	33,0	33,0	-
138	773	1997	41,5	38,0	-
139	764	1997	-	-	-
146	765	1998	34,5	32,0	5,23
147	955	1998	40,0	37,0	7,5
148	959	1998	39,0	36,0	7,5
149	960	1998	38,5	-	-
150	775	1998	38,0	35,0	-
152	780	1998	40,0	35,0	-
163	957	1998	37,0	36,0	-
164	1038	1998	38,0	34,5	-
172	962	1999	35,0	-	-
174	1075	1999	42,0	39,5	-
176	958	1999	43,0	40,0	-
200	975	2000	45,5	44,0	-
204	1060	2000	38,5	38,5	-

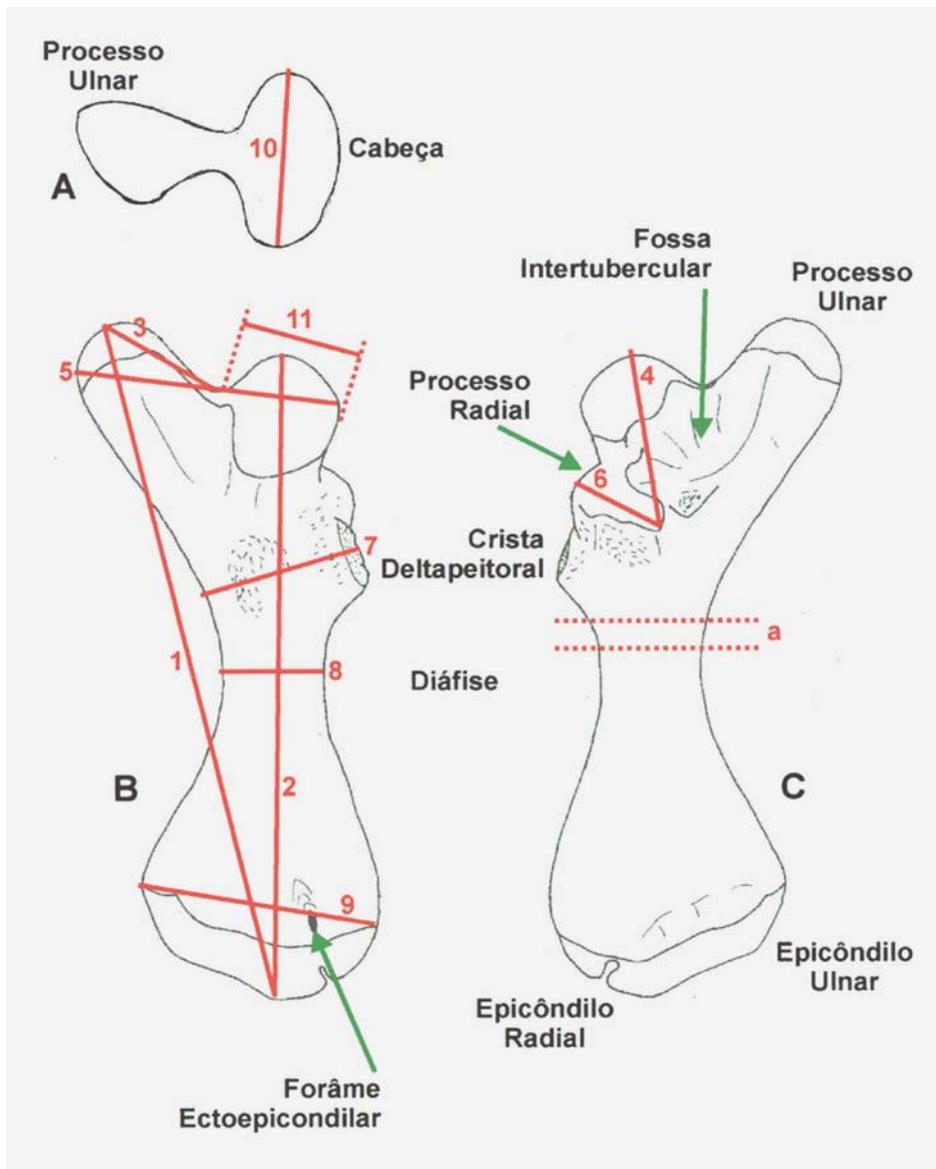


Figura 4 – Vista proximal (A), dorsal (B) e ventral (C) de úmero de um Cheloniidae (modificado de ZUG *et al.*, 1986) com a indicação das medidas tomadas (conforme descrito no item 2.5), principais estruturas anatômicas e o local de retirada da secção para preparação histológica (a). Medidas conforme descrito no item 2.5: **1**- comprimento máximo (CM); **2**- comprimento longitudinal (CL); **3**- comprimento do processo ulnar (CPU); **4**- comprimento proximal (CP); **5**- largura proximal (LP); **6**- comprimento do processo radial (CPR); **7**- largura na crista deltapeitoral (LCDp); **8**- largura média (LM); **9**- largura distal (LD); **10**- diâmetro máximo da cabeça (DCMax); **11**- diâmetro mínimo da cabeça (DCMin); **12**- espessura (E).

Tabela II – Medidas realizadas para cada úmero de *Chelonia mydas* utilizado para análise das marcas de crescimento. A identificação de cada indivíduo é feita através do número de registro na Coleção de Anexos do Laboratório de Herpetologia do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS (MCPAN). Comprimento curvilíneo da carapaça (ccc) expresso em centímetros e medidas (1 a 12) expressas em milímetros (descrição de realização das medidas no item 2.5).

Nº MCPAN	Úmero	ccc (cm)	1)CM (mm)	2)CL (mm)	3)CPU (mm)	4)CP (mm)	5)LP (mm)	6)CPR (mm)	7)LCDP (mm)	8)LM (mm)	9)LD (mm)	10)Max dc (mm)	11)Min dc (mm)	12)E (mm)
320	Dir	34,5	59,2	56,55	8,95	22,8	27,0	10,0	16,95	12,05	22,1	17,25	14,9	5,72
322	Dir	35,0	67,65	61,25	10,08	22,25	28,28	10,95	18,0	13,85	24,2	18,5	14,38	6,85
326	Esq	38,0	67,55	61,75	10,5	23,4	28,2	10,75	18,2	14,03	24,3	18,4	14,1	6,8
327	Esq	42,0	67,18	63,04	12,43	27,35	30,23	13,15	19,85	15,36	25,64	20,93	15,8	7,07
328	Dir	34,5	76,83	71,2	12,3	26,95	33,3	14,35	21,85	15,85	27,3	20,65	17,05	7,67
761	Dir	34,5	61,16	57,71	9,15	23,5	26,69	9,83	17,28	12,73	22,4	19,14	13,8	6,29
761	Esq	39,0	61,1	57,6	10,77	23,41	26,09	10,29	17,12	12,97	22,28	18,71	13,32	6,24
761	Dir	39,0	69,1	66,2	10,65	26,45	30,1	12,55	20,1	13,55	24,3	18,8	15,05	6,35
762	Esq	33,0	68,98	65,33	10,1	26,3	30,15	12,9	20,25	13,38	24,2	19,35	15,8	6,2
762	Esq	33,0	62,83	59,15	10,25	24,75	28,13	13,0	18,05	12,52	23,33	19,33	14,23	5,37
763	Dir	39,0	75,03	70,47	12,13	28,72	31,63	12,73	20,62	15,4	26,6	20,83	16,13	7,08
764	Esq	-	75,33	70,97	11,45	28,37	31,82	12,33	20,72	15,1	26,32	28,83	16,3	6,97
765	Dir	34,5	77,52	73,21	13,45	29,48	33,3	12,03	20,86	15,4	29,17	21,33	17,8	7,2
765	Dir	34,5	61,4	57,95	9,5	23,2	27,55	11,98	18,3	12,35	22,6	17,6	14,35	5,75
767	Esq	39,0	61,45	58,3	9,85	23,6	27,45	12,0	18,25	12,4	22,45	18,0	14,95	5,85
767	Dir	39,0	71,1	66,25	10,7	25,8	30,1	11,83	19,8	15,1	26,55	19,7	16,05	6,65
769	Esq	35,0	70,35	65,28	10,5	26,1	30,1	11,25	19,75	15,05	26,03	19,95	16,5	7,0
769	Dir	35,0	62,53	58,62	11,87	23,48	28,93	11,36	18,01	19,94	23,2	18,63	14,51	6,27
769	Esq	35,0	62,45	58,93	9,82	23,52	28,73	10,42	17,93	12,78	23,23	18,45	15,0	6,2

Continuação Tabela II

Nº MCPAN	Úmero	ccc (cm)	1)CM (mm)	2)CL (mm)	3)CPU (mm)	4)CP (mm)	5)LP (mm)	6)CPR (mm)	7)LCDP (mm)	8)LM (mm)	9)LD (mm)	10)Max dc (mm)	11)Min dc (mm)	12)E (mm)
770	Dir	33,0	62,35	59,03	9,7	22,82	28,67	9,78	17,45	12,1	22,52	18,07	15,17	6,03
	Esq		61,82	57,8	9,65	22,58	28,57	9,85	17,2	12,27	22,5	17,9	15,77	5,73
771	Dir	38,0	71,15	66,8	11,2	26,65	31,5	12,2	19,95	14,3	25,43	19,8	16,58	6,75
	Esq		71,7	67,0	11,3	27,6	31,7	12,55	22,28	14,98	25,4	20,15	17,0	6,6
772	Dir	-	70,98	66,01	13,34	24,29	29,92	12,44	19,89	13,69	25,2	19,6	15,16	6,48
	Esq		71,09	67,05	12,06	25,96	29,84	12,6	20,33	14,08	24,75	19,58	15,15	6,69
773	Dir	41,5	77,39	72,73	14,08	29,27	34,71	14,19	21,6	16,05	28,66	22,46	17,47	7,99
	Esq		76,9	72,83	13,08	28,82	34,35	12,97	21,55	15,63	28,23	22,07	18,25	7,9
774	Dir	35,5	64,2	60,9	11,0	25,9	29,3	11,5	17,68	13,23	24,7	20,0	15,25	6,2
	Esq		64,35	60,75	10,4	26,1	29,5	11,45	18,05	13,5	24,65	20,35	15,93	6,25
775	Dir	38,0	69,61	64,98	12,51	26,67	30,24	14,09	20,25	14,45	25,0	19,73	15,67	6,68
	Esq		69,76	65,7	12,29	27,33	30,65	13,74	20,92	14,44	25,01	19,74	15,83	6,78
776	Dir	35,0	66,85	62,88	10,5	26,4	29,75	11,75	18,35	13,55	25,55	20,35	15,65	6,4
	Dir		62,77	60,03	10,57	24,52	28,22	11,0	17,97	13,15	24,07	18,47	15,37	6,22
778	Esq		63,27	60,52	10,25	24,57	28,6	11,45	18,6	13,3	24,03	18,83	15,18	6,17
779	Dir	37,0	67,5	64,75	10,65	26,25	29,2	10,75	19,13	14,1	24,35	18,95	15,15	6,7
	Dir		69,43	67,0	11,2	27,75	31,22	11,45	19,87	14,97	25,32	20,4	16,8	6,77
780	Esq		68,95	66,35	11,63	27,57	30,8	11,08	19,63	14,65	25,4	20,38	17,45	6,47
	Dir		76,04	71,99	12,22	29,67	33,73	13,82	22,06	15,69	27,66	22,44	17,34	7,47
783	Esq		75,08	71,37	12,47	29,97	33,5	12,6	21,95	15,43	27,22	21,93	18,17	7,1
784	Esq	45,0	75,25	72,25	12,07	29,78	34,17	13,52	22,42	17,6	28,8	22,33	18,92	8,07
	Esq	-	81,35	76,72	14,43	33,2	35,8	16,15	23,26	16,38	28,97	24,06	17,92	7,73
785	Dir	37,5	67,05	63,05	11,85	26,73	31,17	11,63	19,47	14,67	27,22	20,82	16,17	7,22
	Esq		67,43	63,48	11,63	27,5	31,18	11,62	19,53	14,63	27,8	21,1	16,4	7,23

Continuação Tabela II

Nº MCPAN	Úmero	ccc (cm)	1)CM (mm)	2)CL (mm)	3)CPU (mm)	4)CP (mm)	5)LP (mm)	6)CPR (mm)	7)LCDP (mm)	8)LM (mm)	9)LD (mm)	10)Max dc (mm)	11)Min dc (mm)	12)E (mm)
955	Dir	40,0	75,33	71,53	12,53	27,9	32,13	13,5	20,88	15,82	27,41	21,72	17,9	7,61
	Esq		74,53	71,7	12,36	27,88	31,74	13,43	20,85	15,69	27,24	21,94	18,29	7,93
957	Dir	37,0	66,38	64,12	11,54	25,8	30,48	11,96	19,72	14,58	25,31	21,26	15,81	6,91
	Esq		66,37	64,6	11,89	26,19	30,72	12,15	20,02	14,63	25,21	21,16	16,53	7,05
958	Dir	43,0	77,51	73,31	14,36	29,22	34,2	14,27	21,2	16,66	27,74	23,16	17,63	8,3
	Esq		77,45	72,92	14,52	28,58	33,49	13,82	21,26	16,68	27,63	23,11	17,69	8,25
959	Dir	39,0	70,67	66,84	11,89	25,87	31,57	12,64	20,36	15,1	26,91	21,46	15,85	7,16
	Esq		69,66	67,46	12,4	26,24	31,52	13,22	20,22	15,23	26,13	21,36	16,95	7,07
960	Dir	38,5	70,89	67,93	12,8	28,24	31,17	14,71	19,17	14,64	25,72	21,17	16,61	7,12
	Esq		71,25	67,9	12,31	27,35	31,23	14,01	20,03	14,78	26,03	21,59	16,65	7,33
962	Dir	35,0	63,28	58,96	10,26	23,75	27,43	11,93	16,4	12,56	24,34	17,96	13,84	6,23
	Esq		62,74	57,92	10,79	23,07	26,89	11,66	16,85	12,48	24,03	17,98	13,98	6,27
975	Dir	45,5	83,82	77,6	16,89	29,93	37,89	15,84	22,98	18,15	30,57	23,85	19,59	8,64
979	Dir	40,0	67,74	65,15	11,68	25,85	27,73	11,86	18,3	13,29	22,34	17,73	13,73	6,74
980	Dir	40,0	71,27	67,78	13,98	27,71	30,64	13,18	19,95	14,61	24,45	18,35	14,37	6,44
	Esq		70,13	66,03	13,71	27,05	30,7	13,47	20,6	14,71	24,34	18,69	14,83	6,85
981	Dir	42,0	71,64	67,96	13,06	25,94	31,42	12,79	19,84	15,11	25,35	18,89	16,19	7,49
	Esq		72,19	69,04	14,06	27,61	31,78	12,94	20,02	15,19	24,61	18,79	15,94	7,41
982	Esq	43,0	76,14	71,07	14,21	27,93	32,6	13,83	21,87	15,87	25,3	21,24	17,24	7,66
983	Dir	40,0	68,3	64,62	12,28	25,67	28,7	12,89	19,34	15,04	23,94	18,51	14,94	6,89
984	Dir	43,5	76,44	71,83	12,71	31,31	32,9	15,11	20,81	16,1	25,65	21,64	15,84	7,62
	Esq		76,29	72,54	12,65	31,0	32,52	15,18	21,18	16,32	26,46	21,63	15,93	7,65
985	Dir	38,5	68,71	63,9	11,28	26,19	29,84	13,7	20,27	15,35	24,08	17,76	13,85	6,96
	Esq		68,39	64,11	11,36	25,99	30,1	14,01	19,63	15,65	23,66	18,28	13,86	7,01

Continuação Tabela II

Nº MCPAN	Úmero	ccc (cm)	1)CM (mm)	2)CL (mm)	3)CPU (mm)	4)CP (mm)	5)LP (mm)	6)CPR (mm)	7)LCDP (mm)	8)LM (mm)	9)LD (mm)	10)Max dc (mm)	11)Min dc (mm)	12)E (mm)
986	Dir	40,5	75,29	71,99	13,89	29,64	33,03	14,7	21,21	15,85	26,94	21,19	15,96	7,9
	Esq		76,15	71,2	13,68	29,57	34,47	14,89	21,79	15,66	27,03	21,62	16,85	7,47
987	Dir	37,0	63,45	59,41	11,09	23,11	27,37	12,24	17,48	13,67	24,2	17,89	13,6	6,55
	Esq		62,89	59,17	11,77	23,26	27,7	12,83	17,85	13,33	23,54	16,94	13,11	6,63
988	Dir	40,0	70,86	66,24	12,33	27,17	30,17	13,91	19,66	14,67	23,02	18,66	14,71	7,12
990	Dir	41,5	69,51	64,19	10,8	25,65	29,55	11,8	19,68	15,35	25,27	18,17	14,4	7,22
	Esq		68,12	63,48	11,53	27,22	29,95	13,5	19,3	15,25	23,76	17,62	14,46	7,3
991	Dir	35,0	56,07	53,49	9,33	22,13	24,75	11,15	15,46	12,25	19,53	14,42	11,2	5,67
	Esq		56,24	53,81	9,82	22,42	24,18	10,77	15,92	12,54	20,03	14,56	11,47	5,9
992	Dir	39,0	71,59	68,14	13,62	27,62	31,48	14,78	19,93	15,04	26,12	20,42	15,48	7,63
	Esq		71,23	68,6	12,59	27,55	31,9	14,5	20,22	14,94	25,82	21,02	15,37	7,7
993	Dir	44,0	70,8	68,18	12,39	26,88	29,73	12,9	19,52	14,45	23,18	18,18	15,06	6,78
	Esq		70,87	67,78	12,84	26,41	30,17	13,07	20,15	14,94	23,29	18,84	14,94	6,41
995	Dir	35,0	65,36	61,14	11,8	23,5	26,69	14,46	17,3	13,79	22,65	17,23	12,43	6,45
	Esq		66,27	60,5	11,77	22,94	27,52	11,68	17,39	13,73	22,94	17,43	12,61	6,44
996	Dir	36,0	63,05	59,37	11,26	23,7	26,02	11,52	16,29	12,72	21,71	16,97	12,86	5,95
	Esq		63,21	60,4	11,69	23,67	26,32	11,51	16,64	12,73	21,94	17,51	13,15	5,91
1038	Dir	38,0	69,6	64,82	13,08	27,34	31,12	14,3	18,28	13,95	25,87	20,67	15,06	6,64
	Esq		69,82	65,29	13,37	26,82	31,75	14,46	18,38	13,87	25,93	20,94	15,59	6,85
1044	Esq	29,0	49,71	47,81	8,35	20,54	21,26	9,61	14,18	11,54	17,74	14,29	11,58	5,59
1060	Dir	38,5	68,92	66,91	13,84	28,0	32,46	14,67	20,19	14,87	26,52	22,64	17,1	6,8
1075	Dir	42,0	76,91	73,89	14,96	29,9	33,28	14,6	21,7	15,56	26,82	21,28	15,92	7,71
	Esq		76,96	73,34	14,1	29,34	33,64	14,46	21,81	15,57	27,17	21,39	16,22	7,82

Após a realização das medidas, uma secção transversal do osso foi retirada na porção média da diáfise, próxima à crista deltapeitoral. Esta secção foi obtida através da utilização de uma serra em arco manual (Fig. 5).

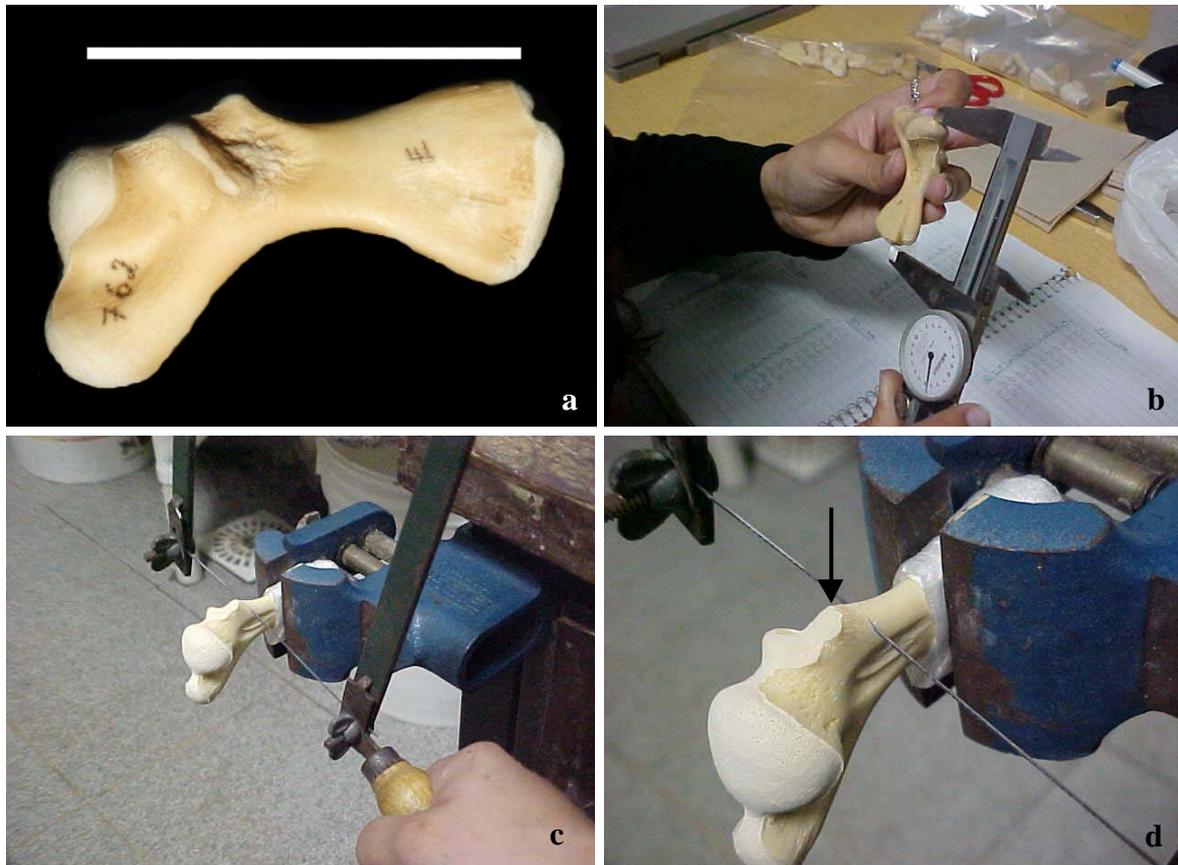


Figura 5 – (a) vista ventral do úmero esquerdo de *Chelonia mydas* (escala 5 centímetros). (b) realização das medidas dos úmeros com a utilização de paquímetro. (c) e (d) corte da secção na diáfise do osso, com a utilização de serra em arco. (d) corte da secção na região próxima à crista deltapeitoral (seta).

Segundo SHEEHAN & HRAPCHAK (1973), para assegurar uma fixação e descalcificação adequadas, o tecido selecionado não pode exceder 4 ou 5mm de espessura. Assim, as secções foram cortadas com uma espessura de aproximadamente 3 mm. Após o corte, as secções foram, então, submetidas à preparação histológica, que seguiu as etapas descritas adiante.

Fixação

Segundo CORMACK (1991), o processo de fixação previne a degeneração post-mortem, e outras alterações estruturais enganosas nas células e tecidos, além de endurecer os tecidos moles. Grande parte desta ação pode ser atribuída ao fato de que os fixadores coagulam as proteínas, que são abundantes nas células e tecidos. A etapa de fixação é muito importante para a obtenção de resultados satisfatórios quanto à estrutura dos tecidos, visto que a ação do descalcificador pode provocar alterações nesta estrutura se o processo de fixação não for realizado com êxito. Devido às mudanças na etapa de descalcificação (explicadas a seguir) alguns dos procedimentos na fixação do material tiveram que ser modificados. Sendo necessária a utilização de dois tipos diferentes de fixadores, conforme a solução empregada na descalcificação.

- **Fixação 1**

Conforme proposto por ZUG *et al.* (1986), uma parte das secções foi armazenada em solução de 4% de formalina (fórmula de preparo no Anexo 2) por, pelo menos, 24 horas antes da descalcificação. O material fixado nesta solução foi, posteriormente, descalcificado na solução n^o 1 (descrita a seguir).

- **Fixação 2**

As demais secções foram armazenadas em formalina 10% (fórmula de preparo no Anexo 2), por um período de até 12 horas. Esta solução foi utilizada para fixar as amostras submetidas às soluções descalcificadoras n^{os} 2 e 3 (descritas a seguir).

Descalcificação

Outros dois tipos de descalcificadores, além daquele proposto por ZUG *et al.* (1986), foram utilizados. As três diferentes metodologias estão descritas a seguir.

- **Descalcificação 1**

Nesta primeira metodologia foi utilizado o descalcificador proposto no trabalho de ZUG *et al.* (1986), uma solução de partes iguais de ácido fórmico 8% e ácido clorídrico 8% (fórmula de preparo no Anexo 2). Para se obter uma consistência elástica no material, indicativa de uma descalcificação satisfatória, ZUG *et al.* (1986) sugeriu um período de descalcificação de 4 a 8 dias. Entretanto, como não foi verificada uma descalcificação satisfatória neste período, as secções foram armazenadas na solução por um tempo maior, que variou de 12 a mais de 45 dias. Inicialmente as soluções foram trocadas em um intervalo de dois dias. Porém, como não se obteve a consistência ideal do material, com o tempo sugerido por ZUG *et al.* (1986), a solução passou a ser trocada diariamente.

- **Descalcificação 2**

O segundo tipo de descalcificação foi realizado com a utilização de ácido nítrico (fórmula de preparo no Anexo 2). Este ácido é amplamente empregado em diversos trabalhos de esqueletocronologia em anfíbios e répteis (CASTANET *et al.*, 1988; CASTANET *et al.*, 1996; ROSSELL JR. & SHEEHAN, 1998; GUARINO *et al.*, 1998; SAGOR *et al.*, 1998; WAYE , 1999; VARELLA & CABRERA, 2000; MEASEY, 2001; BRUCE *et al.*, 2002). Nos trabalhos acima referidos a concentração da solução de ácido nítrico variou 2,5% até 10%. Para este trabalho utilizou-se este ácido em uma concentração de 5%. As secções permaneceram neste descalcificador por um período semelhante ao da **descalcificação 1**, aproximadamente 30 dias. A solução foi trocada diariamente.

- **Descalcificação 3**

A última metodologia empregada utilizou RDO, uma solução descalcificadora comercial cujo ingrediente ativo é o ácido hidrocloreídrico. O uso deste descalcificador é amplamente empregado em estudos de marcas de crescimento em dentes de mamíferos marinhos (HOHN & FERNANDEZ, 1999; PINEDO & HOHN, 2000; ROSAS *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2003) e foi sugerido pela pesquisadora Aleta Hohn (com. pess.). Segundo Aleta Hohn (com. pess.), a utilização deste descalcificador já usado na descalcificação de outros materiais possibilita uma descalcificação mais adequada. Os ossos foram armazenados nesta solução por um período de 6 a 12 horas. A solução não foi trocada. Esta solução também foi citada no trabalho de ZUG *et al.* (1986), porém seu uso não foi recomendado naquele estudo (maiores detalhes na seção 3.2.1).

Enxágüe

- Após o término do período de descalcificação (com os três diferentes ácidos), os ossos foram lavados em água corrente por, pelo menos, 12 horas.

Desidratação

O princípio da técnica de inclusão em parafina é substituir a água inicialmente presente no tecido pela parafina, de modo que o bloco de tecido possa ser cortado com facilidade. Isto é feito em duas etapas, que ocorrem após a fixação dos tecidos. A primeira etapa é a desidratação, e esta é realizada passando-se o bloco de tecido por concentrações cada vez maiores de álcool até o álcool absoluto (CORMACK, 1991). A etapa de desidratação foi realizada da mesma maneira para toda a amostra. A desidratação proposta por ZUG *et al.* (1986) se dá em duas etapas, e é realizada automaticamente em um aparelho (Fisher Histomatic Tissue Processor). O diferencial deste aparelho é a possibilidade de

serem realizadas etapas da inclusão com o uso do vácuo. Por não ser possível a utilização deste tipo de equipamento nenhuma etapa foi realizada sob vácuo.

- Na primeira etapa da desidratação utilizou-se Etanol 95%. As amostras foram desidratadas nesta solução por um período 24 horas, sendo o álcool trocado a cada 8 horas, totalizando três séries.
- Na segunda etapa as amostras foram mantidas em Etanol 100%. Nesta solução as amostra foram armazenadas por um período de 30 horas, sendo esta trocada a cada 7,5 horas, totalizando quatro séries.

Clarificação ou Diafanização

A segunda fase da técnica da inclusão em parafina é a clarificação ou diafanização. Nesta etapa, o álcool deve ser retirado do tecido para permitir a penetração adequada da parafina, visto que ele não age como solvente desta. Desta forma é necessária a utilização de uma solução intermediária, um solvente, que seja miscível nas outras duas (SHEEHAN & HRAPCHAK, 1973).

- O solvente utilizado nesta preparação foi o xilol. As amostras foram clarificadas em xilol por 12 horas, sendo trocadas a cada 4 horas.

Inclusão

A última etapa é a inclusão propriamente dita, onde o bloco embebido de xilol é passado por várias trocas de parafina quente, que se dissolve prontamente no xilol. A parafina derretida preenche todos os espaços anteriormente ocupados pela água e, ao esfriar-se, endurece, tornando o bloco de tecido preparado para a microtomia (CORMACK, 1991).

- Toda a etapa de inclusão foi realizada em estufa (aproximadamente 60° C).

- As secções foram submetidas 6 horas de inclusão em Parafina, sendo trocadas a cada 2 horas, totalizando três séries.

Microtomia

Após a impregnação em parafina, inicia-se a fase de corte ou microtomia, para tanto dois tipos de micrótomos rotativos foram utilizados: Leica, modelo RM 2145 e Reichert-Jung, modelo 1130/Biocut.

- Os ossos foram montados em blocos de parafina, sendo, então, seccionados transversalmente no micrótomo. Após serem cortadas, as secções foram distendidas em uma cuba, contendo água quente (40° C), sendo posteriormente, retiradas desta com uma lâmina de vidro. As lâminas foram previamente revestidas com uma preparado de albumina (fórmula de preparo no Anexo II) para melhor adesão dos cortes à lâmina.
- A espessura dos cortes variou de 7 a 20µm.
- Após o corte as lâminas foram colocadas em estufa (60° C) para secar por, pelo menos, 24 horas.

Coloração

Visto que o trabalho de Zug *et al.*(1986) não fornece nenhuma referência quanto a metodologia de coloração do material foram utilizados três métodos diferentes para comparação. Nos dois primeiros utilizou-se a Hematoxilina/Eosina de Harris, proposta em Zug *et al.*(1986) e no terceiro realizou-se a coloração com Hematoxilina de Ehrlich's (fórmulas de preparo no Anexo II). A Hematoxilina de Ehrlich's vêm sendo utilizada em diversos estudos envolvendo esqueletocronologia (CASTANET *et al.*, 1988; CASTANET *et al.*, 1996; GUARINO *et al.*, 1998; SAGOR *et al.*, 1998; SULLIVAN & FERNANDEZ, 1999;

ALCOBENDAS *et al.*, 2000; VARELLA & CABRERA, 2000; BRUCE *et al.*, 2002), e por este motivo foi testada juntamente com a primeira proposta por Zug *et al.*(1986).

A maioria dos corantes funciona melhor em solução aquosa. Assim, antes que o corte seja corado, a cera (neste caso, a parafina) que o impregna deve ser dissolvida e substituída pela água. Para isto, o corte é montado em uma lâmina de vidro e passado através de xilol para remoção da parafina, de álcool absoluto para remoção do xilol e, então, de álcoois de concentrações decrescentes, até finalmente pela água. Neste momento o corte pode ser corado. Após serem corados, os cortes passam por concentrações cada vez maiores de álcoois até o álcool absoluto, e em seguida para o xilol (MCMANUS & MOWRY, 1960).

- As lâminas foram colocadas em recipientes de vidro apropriados, os quais foram, sucessivamente, embebidos em cubetas contendo as diferentes soluções. Todos os métodos de coloração (designados pelos n^{os} 1 a 3) utilizados passaram pelo mesmo processo. As diferenças entre as técnicas se deram no tempo ao qual as lâminas permaneceram expostas ao corante. As etapas do processo de coloração estão descritas a seguir:

Xilol I 15 min

Xilol II 15 min

Álcool 100% I 1 min

Álcool 100% II 1 min

Álcool 96% I 1 min

Álcool 96% II 1 min

Água destilada passagem rápida para hidratação

Coloração 1 - Hematoxilina de Harris 3 a 5 min

Coloração 2 - Hematoxilina de Harris	10 a 15 min
Coloração 3 - Hematoxilina de Ehrlich's	45 a 60 min
Água corrente	no mínimo 20 min
Eosina	2 a 3 min
Álcool 96% I	1 min
Álcool 96% II	1 min
Álcool 96% II	1 min
Álcool 100% I	3 min
Álcool 100% II	3 min
Xilol I	3 min
Xilol II	3 min

Montagem

- Após terminado o processo de coloração os cortes foram montados em lâminas colocando-se uma ou duas gotas de um meio de montagem (neste caso, bálsamo do Canadá), sendo, então, cobertas por uma lamínula cuidadosamente colocada.

Visualização

- Após toda preparação histológica as lâminas foram observadas em estereomicroscópio sob aumentos de 2 a 10x, e em microscópio óptico, sob aumentos de 40 e 100x, para a verificação da presença das marcas de crescimento. Aqueles cortes que apresentaram boas condições foram fotografados. As fotos foram tomadas com uma câmera fotográfica acoplada à lupa ou ao microscópio.

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 – Ocorrência de tartarugas marinhas no litoral do Rio Grande do Sul

Entre março de 1994 e setembro de 2003 foram coletados um total de 254 espécimes de tartarugas marinhas. A análise desta coleta indicou a ocorrência de cinco espécies na área de estudo: *Caretta caretta*, *Chelonia mydas*, *Dermochelys coriacea*, *Eretmochelys imbricata* e *Lepidochelys olivacea*. As frequências relativas de ocorrência de exemplares destas espécies corresponderam a: 54% dos registros para *Caretta caretta* (n=137), 35% para *Chelonia mydas* (n=89), 10,2% para *Dermochelys coriacea* (n=26) e 0,4% tanto para *Eretmochelys imbricata* (n=1) quanto para *Lepidochelys olivacea* (n=1). A tartaruga-verde foi, portanto, a segunda espécie mais frequente em termos de encalhes cumulativos durante todo o período amostrado (Fig.6).

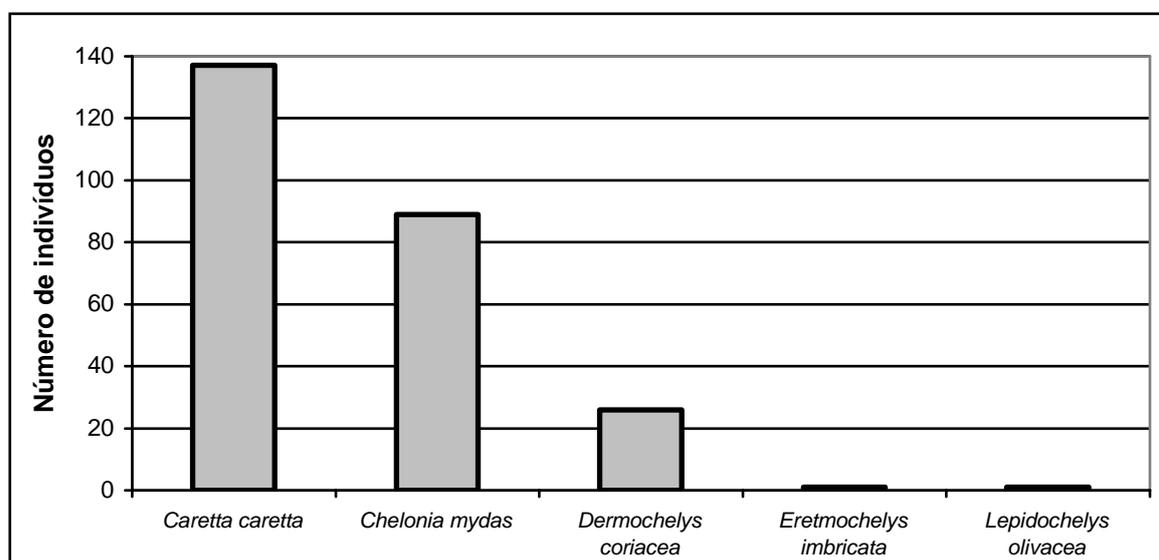


Figura 6 – Frequência relativa das cinco espécies de tartarugas marinhas (*Chelonia mydas*, *Caretta caretta*, *Dermochelys coriacea*, *Eretmochelys imbricata* e *Lepidochelys olivacea*) encontradas encalhadas no litoral norte do Rio Grande do Sul entre março de 1994 e setembro de 2003.

3.2. – Classes de tamanho de *Chelonia mydas* no litoral do Rio Grande do Sul

Dos 89 espécimes de tartarugas-verdes coletados, apenas 78 apresentaram condições de serem medidos. As classes de tamanho (comprimento curvo da carapaça – ccc) dos espécimes encalhados mostraram um padrão bem definido. As tartarugas-verdes registradas foram representadas por animais com comprimento curvo da carapaça variando de 29 a 52 cm, sendo o comprimento médio 38,9 cm. A maioria dos exemplares (52,6%, n=41) pertence à classe de animais com comprimento de carapaça entre <35-40 cm (Fig.7), enquanto 92,3% (n=72) dos exemplares apresentaram comprimentos entre 33 e 45 cm.

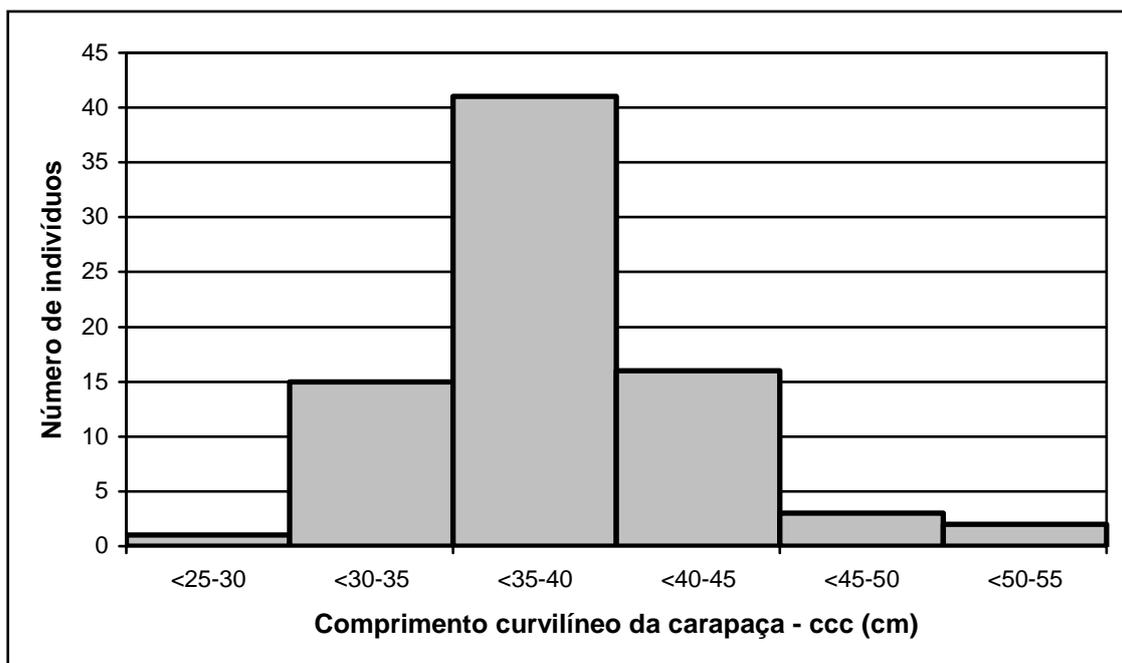


Figura 7 – Distribuição por classes de tamanho das tartarugas-verdes encalhadas no litoral norte do Rio Grande do Sul, no período entre março de 1994 e setembro de 2003.

Para Argentina e Uruguai, FRAZIER (1984) registrou tartarugas-verdes com comprimento curvilíneo de carapaça variando entre 27 e 50 cm, sendo que 82% dos exemplares apresentaram comprimentos entre 32,5 e 42,4 cm.

SILVA & ALMEIDA (1998) registram para o Rio Grande do Sul, no ano de 1996, exemplares com comprimento variando entre 20 e 80cm (ccc), porém com a maioria apresentando comprimentos entre 20 e 60cm. Estes resultados são bastante discrepantes com os observados neste estudo e também com os observados por FRASIER (1984) para Argentina e Uruguai. O fato da amostragem de SILVA & ALMEIDA (1998) sobrepor em parte com a área e o período amostrado neste estudo, aumenta a dificuldade de interpretação das diferenças. Infelizmente não parece existir material testemunho das amostragens de SILVA & ALMEIDA (1998) depositado em coleções para permitir uma nova análise dos dados destes autores.

Segundo BOULON & FRAZER (1990), COLLAZO *et al.* (1992) e BJORN DAL *et al.* (1998), composições de classes de tamanho entre 25 e 75cm são indicativas de populações de indivíduos juvenis. Assim, as classes de tamanho observadas para as tartarugas-verdes, que habitam tanto o litoral gaúcho quanto os litorais do Uruguai e da Argentina, indicam que estas populações estão constituídas por animais juvenis. O único registro discordante deste padrão, que indicou a presença de animais adultos, seria o de SILVA & ALMEIDA (1998).

Para regiões localizadas ao norte do Rio Grande do Sul os tamanhos dos animais são relativamente diferentes. Para o estado do Paraná, D'AMATO (1991) registrou a presença de animais juvenis e adultos. Em Ubatuba, litoral do Estado de São Paulo, GALLO *et al.* (2000) registraram a ocorrência de animais juvenis e adultos. O comprimento dos animais nesta última região variou de 27 a 96cm, porém, a média de comprimento foi de 40,6cm, sendo 99,3% das tartarugas capturadas representadas por indivíduos juvenis (MARCOVALDI *et al.*, 1998).

No Arquipélago de Fernando de Noronha, SANCHES & BELLINI (1999) registraram a ocorrência de indivíduos com comprimento entre 32 e 83cm (tendo a maioria destes, um

comprimento entre 40 e 50cm) nos recifes de corais das ilhas do Arquipélago. Estes indivíduos são residentes destas ilhas, onde se alimentam durante todo ano, assim, estes locais consistem de habitats de desenvolvimento para esta população de tartarugas-verdes (SANCHES & BELLINI, 1999). Em Almofala, no Ceará, MARCOVALDI *et al.* (1998) constataram que a maioria (70,1%) das tartarugas encontradas consiste de indivíduos juvenis.

As tartarugas-verdes ao se tornarem adultas, realizam suas primeiras desovas, com comprimentos diferentes, dependendo da população. Segundo CARR & GOODMAN (1970) as tartarugas da Ilha Ascensão (muitas destas alimentam-se no litoral do Brasil) realizam suas primeiras desovas ao atingirem um comprimento mínimo de 83 cm. Já as tartarugas da Ilha de Trindade (MOREIRA *et al.*, 1995) e do Atol das Rocas (BELLINI *et al.*, 1995) iniciam suas desovas com comprimento de aproximadamente 100 centímetros.

A partir da observação destes padrões diferenciados de distribuição das classes de tamanho para estas regiões do litoral brasileiro, pode-se admitir que as populações de tartarugas-verdes que habitam as áreas ao norte do Rio Grande do Sul são constituídas tanto por animais juvenis, quanto subadultos e adultos, diferentemente das que habitam os litorais gaúcho, uruguaio e argentino, onde apenas os indivíduos juvenis são encontrados. Segundo CARR (1980), grupos de tartarugas-verdes de diferentes idades podem ocorrer em uma mesma área, desde que existam recursos alimentares disponíveis para suportar tanto animais juvenis, apresentando uma dieta principalmente carnívora, quanto animais adultos herbívoros. A partir destas considerações, pode-se supor que os indivíduos encontrados no litoral gaúcho, uruguaio e argentino realizam migrações para locais mais quentes e com maior quantidade de alimento (principalmente algas bentônicas, segundo FERREIRA (1968) e SAZIMA & SAZIMA (1983)) assim que atingem um tamanho entre 50 e 60cm, visto que não são encontrados indivíduos com comprimentos maiores do que estes nestas

localidades. Estes animais realizariam uma migração de desenvolvimento (CARR, 1980) para áreas localizadas ao norte do estado do Rio Grande do Sul, sendo encontrados indivíduos de diversas classes de tamanho em toda costa brasileira a partir do estado do Paraná (D'AMATO, 1991; MARCOVALDI *et al.*, 1998; SANCHES & BELLINI, 1999; GALLO *et al.*, 2000).

3.3 – Exame das marcas de crescimento

Dos 89 indivíduos coletados na área de estudo, 73 possuíam úmeros em condições satisfatórias para a coleta. Destes 73, apenas 54 foram submetidos à preparação histológica, visto que os demais ainda se encontram em processo de maceração e limpeza nos tanques do CECLIMAR. Estes 54 animais apresentaram comprimento de carapaça variando entre 29 e 49 cm (Tab.I). Destes, apenas três animais não possuíam medidas de comprimento e largura curvilíneos da carapaça. Assim, o tamanho destes exemplares foi estimado através da utilização de uma equação de regressão relacionando o comprimento longitudinal do úmero (cl) ao comprimento curvilíneo da carapaça (ccc) (ver dados na Tab. II). A equação obtida foi $ccc=0,1548cl + 0,5503$.

3.3.1 – Análise da técnica histológica

A partir da utilização da metodologia proposta por ZUG *et al.* (1986), não foram obtidos os resultados esperados. A metodologia original necessitou de algumas modificações, visto que a descrição das etapas de processamento dos materiais não foram realizadas de maneira satisfatória. Mesmo sendo extremamente utilizada na maioria dos trabalhos com esqueletocronologia em tartarugas marinhas, não foram relatados problemas

relacionados a sua replicação em nenhum destes estudos. A análise da técnica histológica foi realizada tendo em vista a constatação das inúmeras dificuldades referentes à replicação efetiva desta.

Dos 54 úmeros inicialmente submetidos à preparação histológica apenas 25 apresentaram condições satisfatórias para a análise das marcas de crescimento (Tab.III, Fig.8). Os 29 úmeros não analisados tiveram problemas durante a preparação e não puderam ser cortados no micrótomo. As fases da preparação anteriores ao corte (descalcificação e inclusão) foram críticas na obtenção dos resultados. Esta dificuldade para obter cortes satisfatórios para a análise das linhas de crescimento foi relatada em poucos trabalhos envolvendo a utilização desta metodologia.

Nos trabalhos de BJORNDALE *et al.* (2003) e MEASEY (2001), dos 40 espécimes submetidos à preparação histológica, alguns sofreram danos durante o processamento e não puderam ser utilizados, sendo excluídos das análises. No primeiro trabalho, que utilizou a mesma preparação de ZUG *et al.* (1986), 12,5% das amostras sofreram danos, enquanto no segundo trabalho, que utilizou uma preparação diferente daquela de ZUG *et al.* (1986), 25% dos ossos não puderam ser lidos e medidos adequadamente, sendo descartados das análises. Os autores destes trabalhos, entretanto, não forneceram nenhuma explicação sobre quais foram os danos e sobre quais teriam sido suas causas. Enquanto até 25% dos exemplares apresentaram problemas nos estudos referidos, cerca de 50% das amostras utilizadas no presente trabalho não puderam ser analisadas. A totalidade das amostras que não puderam ser seccionadas no micrótomo apresentaram aparentemente o mesmo problema: inicialmente os ossos demonstraram estar totalmente descalcificados, mas após a inclusão na parafina, o material apresentou uma consistência muito mais resistente do que aquela observada no final do processo de descalcificação. Ao serem cortadas no micrótomo, as secções se comprimiram ou se dilaceraram, impossibilitando, assim, a

obtenção de cortes satisfatórios para as análises. Duas hipóteses podem ser propostas para explicar as dificuldades na obtenção dos cortes em micrótomo. A primeira seria a de que problemas na fase de descalcificação do material estariam afetando o restante da preparação. Já a segunda hipótese estaria relacionada à fase posterior à descalcificação, envolvendo as etapas de desidratação, clarificação e inclusão. Estas hipóteses são detalhadas a seguir.

Descalcificação

Inicialmente supôs-se que o problema seria a não descalcificação total das amostras e, devido a este fato, foram aumentadas a permanência do material na solução descalcificadora (ácido fórmico 8% + ácido clorídrico 8%) e a periodicidade de troca desta. Segundo ZUG *et al.* (1986), o tempo necessário para se obter uma consistência elástica, o que indicaria uma descalcificação satisfatória do material, seria de 4 a 8 dias. Entretanto, aqueles ossos que foram colocados na solução não apresentaram a consistência esperada ao término do referido período. O tempo de exposição ao descalcificador foi, então, aumentado, variando de 12 a mais de 45 dias (Tab.III). Porém, a aparente descalcificação total do material não garantiu sucesso na obtenção dos cortes para todas as amostras.

PREECE (1972) alerta que períodos muito extensos de submissão dos ossos aos compostos descalcificadores podem afetar a estrutura das células do tecido, e por isso, bons detalhes histológicos e citológicos não podem ser esperados. Segundo a mesma autora, o período ideal de descalcificação de um tecido é de 24 a 48 horas, não sendo aconselhável que este seja prolongado por mais de quatro dias. Todavia, ela admite que alguns ossos muito densos possam levar 14 dias ou mais para uma completa descalcificação. PREECE (1972) sugere, também, que a solução ácida seja trocada diariamente ou até duas vezes por dia.

Os períodos maiores de exposição aos ácidos não afetaram a identificação das linhas de crescimento, visto que amostras de um mesmo indivíduo submetidas a tempos diferentes de descalcificação mostraram o mesmo padrão histológico (Tab. III, Fig. 9). Mesmo com o aumento do tempo de submissão do material ao agente descalcificador, muitos dos exemplares continuaram apresentando os mesmos problemas na secção. Desta maneira, outras duas soluções descalcificadoras foram testadas.

A primeira solução alternativa utilizada foi o ácido nítrico 5%, que é o descalcificador mais empregado nos trabalhos de esqueletocronologia no grupo dos anfíbios, e em alguns grupos de répteis (como já referido na seção 2.5). A descalcificação produzida por este ácido também necessitou de um período superior aquele sugerido nos trabalhos que o utilizaram. Este período, que varia de 2 a 10 horas para as falanges (GUARINO *et al.*, 1998; MEASEY, 2001), excedeu trinta dias para os úmeros (Tab.III). A diferença no tempo de descalcificação, neste caso, poderia ser devida às diferenças de dimensões dos materiais, visto que as secções dos ossos das tartarugas são maiores que as das falanges dos anfíbios e lagartos, entretanto, este não parece ser o motivo principal para tais diferenças. Segundo PREECE (1972), tanto o ácido nítrico quanto o fórmico agem rapidamente. O primeiro, em solução aquosa de 5%, sendo trocado diariamente ou duas vezes ao dia, leva de 1 a 4 dias para descalcificar os ossos. Já o ácido fórmico, que é aceito como o mais adequado para a descalcificação de peças grandes, necessita um tempo prolongado para descalcificar o material. A utilização destes dois tipos de descalcificadores apresentou praticamente os mesmos resultados com relação à detecção das marcas de crescimento ósseo (Fig.9).

O segundo descalcificador alternativo utilizado foi o RDO, uma solução descalcificadora comercial, citada no trabalho de ZUG *et al.* (1986). Segundo o referido autor, esta solução mostrou-se muito rápida e eficiente na descalcificação dos ossos,

entretanto, sua velocidade de atuação e a espessura desigual das seções do osso resultaram em descalcificação excessiva. Segundo PREECE (1972), deve-se tomar grande cuidado ao se usar o RDO para evitar a descalcificação excessiva, visto que a ação desta solução é rápida, na maioria dos casos ocorrendo em 4 horas ou menos. A descalcificação por mais de doze horas deve ser evitada, pois se as peças são deixadas no RDO por mais tempo que o necessário ocorre digestão quase total do tecido e os detalhes histológicos são danificados. Fragmentos bem pequenos requerem de meia hora a quatro horas, enquanto espécimes maiores necessitam de 6 a 8 ou, alguns, até 12 horas. Segundo Aleta Hohn (com. pess.), a utilização deste descalcificador com um certo tempo de uso, já utilizado na descalcificação de dentes de mamíferos marinhos, por exemplo, possibilita uma descalcificação menos desigual e não tão rápida dos úmeros que aquela relatada por ZUG *et al.* (1986). De acordo com estas colocações, utilizou-se RDO já usado em outras descalcificações. O período de descalcificação variou de 6 a 12 horas. Entretanto, assim como o ocorrido com os materiais submetidos aos outros descalcificadores, os problemas quanto ao corte permaneceram e apenas uma parte dos exemplares pode ser satisfatoriamente cortado no micrótomo. Mesmo procedendo às modificações acima relatadas os problemas persistiram, indicando que podem haver outros fatores influenciando a obtenção destes resultados.

Inclusão

Existe, ainda, a possibilidade de que os problemas referentes ao corte sejam causados pela preparação posterior a fase de descalcificação, ou seja, todo o processo necessário à inclusão do material em parafina (desidratação, clarificação e inclusão). Segundo vários autores (e.g. PREECE, 1972; SHEEHAN & HRAPCHAK, 1973; BANCROFT, 1975) as etapas de desidratação em álcool, clarificação em xilol e inclusão em parafina,

tendem a enrijecer os tecidos à medida que estes passam de uma etapa para a outra da preparação. Este endurecimento é bastante importante para uma grande quantidade de tipos de tecidos, visto que estes seriam muito frágeis para serem cortados no micrótomo. Infelizmente este enrijecimento parece ter influenciado de maneira negativa a preparação histológica dos ossos.

Normalmente os tempos de desidratação (cerca de 2 a 5 horas), clareamento (1 a 4 horas) e inclusão (1 a 3 horas), na maioria dos tecidos, duram cerca de 12 horas (BEHMER, 1976). Porém a técnica utilizada neste trabalho dura mais de 48 horas na etapa de desidratação (24 horas em álcool 95% e 30 horas em álcool 100%), além de 12 horas na etapa de clareamento e mais 6 horas para a inclusão em parafina. Todas estas etapas são graduais e importantes, pois é a partir da execução destas que o tecido pode ser cortado no micrótomo. Como a parafina funciona como um meio de sustentação ao tecido ela precisa penetrá-lo de maneira eficiente, e para que isso ocorra, todas as etapas anteriores à inclusão devem ser realizadas com êxito.

Segundo PREECE (1972), dificuldades na realização de cortes podem ser devidas ao tratamento prolongado em altas concentrações de álcool etílico, ou em certos agentes clareadores, ou ainda, na parafina. O álcool absoluto pode, especialmente, causar endurecimento excessivo do tecido. Segundo BEHMER *et al.* (1976), problemas relacionados com a dilaceração dos cortes podem ser devidos à inclusão defeituosa ou incompleta.

Outro aspecto importante que pode ter influenciado na preparação é que esta foi feita de maneira totalmente manual, enquanto a metodologia descrita em ZUG *et al.* (1986) utiliza um equipamento (Fisher Histomatic Tissue Processor) que realiza todas as etapas da inclusão automaticamente. Infelizmente este tipo de equipamento não esteve disponível para a realização da preparação. Além disso, na técnica original, todas as fases do processo

de inclusão passam por pelo menos algum tempo sob vácuo, o que facilmente é realizado em um aparelho daquele tipo, mas dificilmente poderia ser feito de maneira manual. Estas diferenças entre a técnica original e a adaptação realizada neste trabalho podem ter tido um efeito negativo na preparação e obtenção dos resultados como um todo.

PREECE (1972) e SHEEHAN & HRAPCHAK (1973) afirmam que a inclusão em parafina sob vácuo é desejável para todo tipo de tecido e particularmente valiosa para tecidos densos. Além disso ela é recomendada para aqueles tecidos que se tornam endurecidos durante as imersões usuais de 2 a 3 horas. O calor e o vácuo aumentam a velocidade da troca dos fluidos com o tecido, permitindo que o tempo de processamento seja grandemente reduzido. Visto que a exposição do material a um ambiente a vácuo proporciona uma penetração mais eficaz das soluções as quais estes estão submetidos, isto pode ter afetado algumas etapas da preparação.

Coloração

Além das dificuldades na preparação anterior ao corte, diferenças na coloração dos tecidos também foram observadas. O tempo de permanência no corante Hematoxilina também afetou a qualidade dos cortes. Tempos de coloração utilizados em muitos outros tipos de técnicas (2 a 3 min, e.g. MCMANUS & MOWRY, 1960) se mostraram menos efetivos na detecção das linhas. Técnicas com períodos maiores de exposição ao corante (10 a 15 min, e.g. BANCROFT & STEVENS, 1977) resultaram em mais nitidez nas linhas (Fig.9). Em relação à coloração com Hematoxilina de Ehrlich's, não foram evidenciadas quaisquer diferenças, apesar dos cortes permanecerem por um tempo muito maior nesta solução (45 min, e.g. BANCROFT & STEVENS, 1977).

As dificuldades relacionadas à aplicação de uma determinada metodologia são muitas vezes omitidas na maioria dos trabalhos. As etapas da metodologia proposta por

ZUG *et al.* (1986) tornam-se difíceis de serem replicadas, visto que as instruções sobre a realização dos procedimentos não são suficientemente claras. Além disso, faltam explicações importantes sobre tempos de exposição das amostras aos produtos, bem como informações sobre o volume adequado das soluções e a periodicidade de troca destas, entre outros aspectos essenciais.

De acordo com o já exposto por outros autores, através de comunicação pessoal, a metodologia empregada por ZUG *et al.* (1986) apresenta problemas quanto a sua realização, problemas estes não adequadamente relatados em nenhum trabalho até o momento. Para tanto, têm-se desenvolvido metodologias alternativas (Aleta Hohn, com. pess.), com preparações totalmente diferentes daqueles sugeridas por ZUG *et al.* (1986). A realização de um procedimento utilizando micrótomo de congelamento vêm sendo desenvolvida por um grupo de pesquisadores norte-americano e parece que irá fornecer resultados promissores (Aleta Hohn, com. pess.). A principal vantagem desta nova metodologia é a supressão de toda a etapa de inclusão (que parece ser bastante crítica na preparação dos tecidos), visto que após a descalcificação do material este é diretamente seccionado no micrótomo. O uso deste tipo de equipamento já foi relatado no trabalho de CASTANET *et al.* (1988) em seu estudo com tuatara (*Sphenodon* sp.), e parece ter fornecido bons resultados. A realização de um estudo comparativo entre esta nova metodologia e aquela desenvolvida por ZUG *et al.* (1986) seria necessária no futuro para reavaliar estas técnicas quanto a sua eficiência.

3.3.2 – Marcas de crescimento

As marcas de crescimento foram evidenciadas nitidamente em 11 dos 25 indivíduos analisados (Tab.III). Nestes onze exemplares as marcas puderam ser visualizadas no córtex

até a margem do periósteo, onde se distinguiram zonas claras e espessas, intercaladas por linhas estreitas escuras. O número de linhas observadas nestes exemplares variou de um a cinco (Fig.10). Os demais indivíduos não apresentaram nenhuma evidência de linha ou banda (Fig.8).

A ausência ou presença variável de marcas de crescimento, em uma mesma população, tem sido documentada em vários estudos (ZUG & BALAZS, 1985; ZUG *et al.*, 1986; ESTEBAN, 1990; CHALOUPKA & ZUG 1997; BJORN DAL *et al.*, 1998; ZUG & GLOR, 1998; WAYE, 1999). A comprovação do crescimento sem deposição de linhas, em algumas populações (e.g. BJORN DAL *et al.*, 1998) ainda tem gerado dúvidas sobre os fatores que influenciam a deposição e a periodicidade destas.

WAYE (1999), utilizando uma preparação histológica diferente da utilizada em ZUG *et al.*(1986), relata que dos 192 ossos de espécimes de serpentes utilizados para determinação de idade, 25 não mostraram qualquer linha legível. Igualmente, CHALOUPKA & ZUG (1997), utilizando a mesma preparação histológica utilizada por ZUG *et al.* (1986), registraram a ausência de linhas em 4 dos 73 ossos de espécimes da tartaruga *Lepidochelys kempii*. Para a tartaruga-verde, ZUG & BALAZS (1985) relatam a ausência de linhas em 2 dos 11 indivíduos analisados, enquanto em ZUG & GLOR (1998), dos 59 indivíduos que compunham a amostra apenas um não apresentou evidência de linhas de crescimento. Nenhum destes trabalhos forneceu hipóteses para a ausência das linhas em parte dos indivíduos da população.

No trabalho de ESTEBAN (1990) foi registrada a ausência de linhas em 42% dos indivíduos amostrados em uma das populações de anuros analisadas pela autora. Este resultado foi atribuído à ausência de um período de hibernação nos animais desta população, visto que este está presente em animais da mesma espécie, porém de outras localidades, que apresentaram linhas de crescimento. Os trabalhos de ZUG *et al.* (1986) e

BJORNDALE *et al.* (1998) também apresentaram algumas hipóteses para a ausência das linhas. O primeiro relatou a presença de linhas na maior parte da amostra, ao contrário do último que cita a ausência das linhas em todos indivíduos amostrados. ZUG *et al.* (1986) sugeriram que os exemplares de *Caretta caretta* capturados na Geórgia, EUA, que não apresentavam linhas de crescimento, poderiam ser migrantes de ambientes tropicais. Sendo assim, o comportamento migratório das tartarugas marinhas pode afetar significativamente o número e periodicidade de linhas depositadas e induzir uma baixa qualidade nas estimativas de idade derivadas das contagens de linhas de crescimento, tanto ao nível individual quanto populacional. BJORNDALE *et al.* (1998) apontam a influência de climas tropicais, sem grandes flutuações térmicas e de produtividade, como a causa para a não deposição de linhas de crescimento, visto que esta população de tartarugas-verdes habita a região das Bahamas, no Caribe.

O mecanismo de formação das linhas não foi suficientemente estudado até hoje. Entretanto, segundo ENLOW (1979), o córtex ósseo das tartarugas é formado por uma estrutura “laminar” típica. Ele é composto por vastas lâminas, circunferencialmente arranjadas, cada qual contendo uma fileira de canais vasculares primários. Esta laminação cortical é resultado de um crescimento intermitente, ou seja, não contínuo, apresentando interrupções ou suspensões. Nos indivíduos muito novos, entretanto, o córtex é composto, usualmente, por uma lâmina única contendo vários canais primários. Para o referido autor, o comportamento cíclico de crescimento do esqueleto parece estar relacionado a fatores sazonais que determinam a atividade de crescimento em geral. A laminação cortical seria o resultado de tal periodicidade sazonal de crescimento. Já CASTANET & SMIRINA (1990) sugerem que a deposição anual seria resultado de ciclos endógenos reforçados pela sincronização com ciclos ambientais. Estes autores sugerem que sob condições de contrastante sazonalidade, as linhas apresentam-se fortemente conspícuas. Já em ambientes

com condições climáticas mais constantes, estas linhas podem apresentar-se menos conspícuas.

Com base nas constatações, através de estudos de marcação-recaptura e de análises genéticas (PRITCHARD, 1969; CARR, 1975; BOWEN & AVISE, 1995; LAHANAS *et al.*, 1998), de que áreas de forrageio são compartilhadas por mais de uma população de tartarugas-verdes pode-se sugerir que animais nascidos em diferentes áreas poderiam estar se alimentando no Rio Grande do Sul. Sendo assim, pode-se supor que aqueles exemplares que não apresentaram evidências de marcas de crescimento possam ser provenientes de ambientes tropicais visto que, segundo BJORN DAL *et al.* (1998), estes ambientes podem sustentar um crescimento e deposição óssea contínuos, impossibilitando a deposição das marcas de crescimento.

Tabela III – Resultados obtidos em relação a aplicação das diferentes técnicas de preparação histológica. Animais submetidos ao processo histológico, com o respectivo número de registro na Coleção de Anexos do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS (MCPAN); tipos de Inclusão realizados na preparação (Inclusão nº 1 e Inclusão nº 2); tipos de Descalcificação realizados na preparação (Descalcificação nº 1 e Descalcificação nº 2 e Descalcificação nº 3); tempo de submissão do material às diferentes técnicas de decalcificação; realização efetiva do corte; visualização das linhas de crescimento. As diferentes técnicas de Inclusão e Descalcificação estão descritas na seção 2.5 de Material e Métodos.

Nº Coleção MCPAN	Inclusão (Nº)	Descalcificação (Nº)	Tempo de decalcificação	Realização efetiva do corte	Visualização
320	1	1	14 dias	Não	-
	2	3	6 horas	Não	-
322	1	1	14 dias	Não	-
	1	1	25 dias	Sim	Não
	1	1	50 dias	Sim	Não
326	1	1	50 dias	Não	-
	2	3	6 horas	Não	-
327	1	1	14 dias	Não	-
	2	3	6 horas	Não	-
328	1	1	50 dias	Sim	Não
	2	3	6 horas	Não	-
761	1	1	14 dias	Não	-
	1	1	25 dias	Sim	Sim
	1	1	45 dias	Sim	Sim
762	1	1	12 dias	Sim	Não
763	1	1	14 dias	Sim	Não
764	1	1	50 dias	Sim	Não
	2	3	6 horas	Não	-
765	1	1	14 dias	Não	-
	1	1	45 dias	Sim	Sim
767	1	1	14 dias	Não	-
	1	1	50 dias	Sim	Sim
768	1	1	14 dias	Não	-
	2	3	6 horas	Não	-
769	1	1	12 dias	Não	-
	1	1	45 dias	Sim	Não
	2	3	6 horas	Não	-

Continuação Tabela III

Nº Coleção MCPAN	Inclusão (Nº)	Descalcificação (Nº)	Tempo de descalcificação	Realização efetiva do corte	Visualização
770	1	1	12 dias	Sim	Sim
	1	1	50 dias	Sim	Sim
	1	1	55 dias	Sim	Sim
	2	2	40 dias	Sim	Sim
	2	3	6 horas	Não	-
771	1	1	14 dias	Não	-
	1	1	25 dias	Sim	Sim
	1	1	45 dias	Sim	Sim
	1	1	55 dias	Sim	Sim
	2	2	40 dias	Sim	Sim
	2	3	6 horas	Não	-
772	1	1	14 dias	Não	-
	1	1	45 dias	Não	-
	2	3	6 horas	Sim	Não
773	1	1	12 dias	Não	-
	1	1	50 dias	Sim	Sim
774	1	1	14 dias	Não	-
	1	1	45 dias	Não	-
	2	3	6 horas	Não	-
775	1	1	45 dias	Não	-
	2	3	6 horas	Não	-
776	1	1	14 dias	Não	-
	2	3	6 horas	Não	-
777	1	1	12 dias	Sim	Não
	1	1	45 dias	Sim	Não
778	1	1	14 dias	Não	-
779	1	1	12 dias	Sim	Não
780	1	1	12 dias	Não	-
	1	1	50 dias	Sim	Sim
	2	3	6 horas	Não	-
783	1	1	12 dias	Sim	Sim
	1	1	55 dias	Sim	Sim
	2	2	40 dias	Sim	Sim
	2	3	6 horas	Não	-
784	1	1	50 dias	Sim	Sim
	2	3	6 horas	Não	-
785	1	1	12 dias	Sim	Não

Continuação Tabela III

Nº Coleção MCPAN	Inclusão (Nº)	Descalcificação (Nº)	Tempo de descalcificação	Realização efetiva do corte	Visualização
	1	1	50 dias	Sim	Não
955	2	3	6 horas	Não	-
957	1	1	55 dias	Sim	Não
	2	2	40 dias	Sim	Não
958	2	3	12 horas	Sim	Não
959	2	3	12 horas	Sim	Sim
960	2	3	12 horas	Não	-
962	2	3	12 horas	Sim	Sim
975	2	3	6 horas	Sim	Não
979	2	3	6 horas	Não	-
980	2	3	12 horas	Não	-
981	2	3	12 horas	Não	-
982	2	3	6 horas	Não	-
983	2	3	12 horas	Não	-
984	2	3	12 horas	Não	-
985	2	3	12 horas	Não	-
986	2	3	12 horas	Não	-
987	2	3	12 horas	Não	-
988	2	3	6 horas	Não	-
990	2	3	12 horas	Não	-
991	2	3	6 horas	Não	-
992	2	3	12 horas	Não	-
993	2	3	12 horas	Não	-
995	2	3	12 horas	Não	-
996	2	3	6 horas	Sim	Não
1038	1	1	55 dias	Sim	Não
	2	2	40 dias	Sim	Não
1044	2	3	6 horas	Não	-
1060	2	3	6 horas	Sim	Não
1075	1	1	55 dias	Sim	Não
	2	2	40 dias	Sim	Não

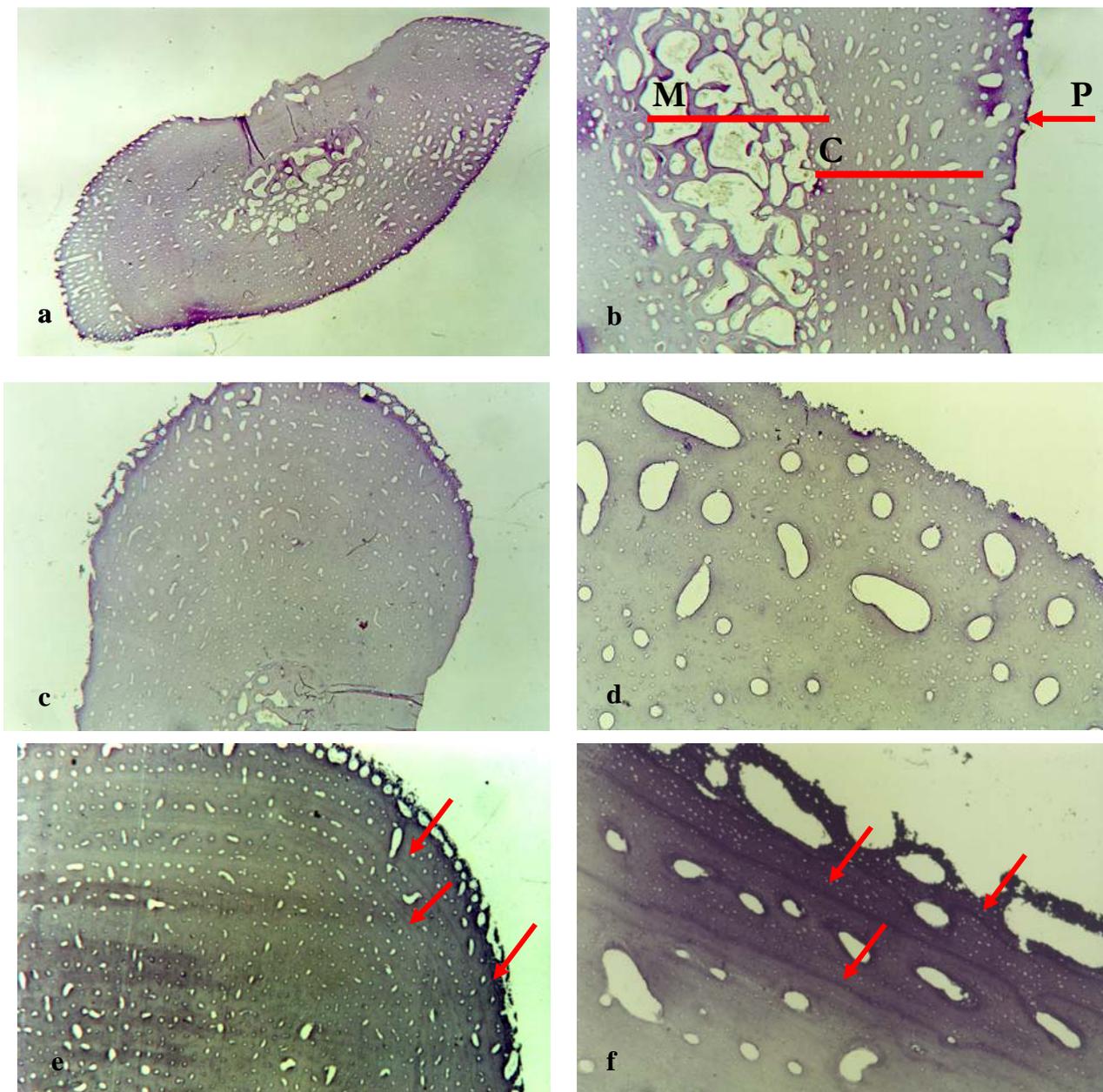


Figura 8 – Cortes histológicos transversais de úmeros de *Chelonia mydas*. **(a)** visão geral do corte transversal do úmero do indivíduo de número 770 (aumento 1,6x). **(b)** corte transversal do úmero do indivíduo de número 785 com indicação das regiões medular (M), cortical (C) e do periósteo (P) (aumento 4x). **(c)** região cortical do úmero do indivíduo de número 779, demonstrando a ausência de marcas de crescimento (aumento 1,6x). **(d)** vista em maior aumento (aumento 40x) da região cortical do úmero do indivíduo de número 779, demonstrando a ausência de marcas de crescimento **(e)** região cortical do úmero do indivíduo de número 771, demonstrando a presença de marcas de crescimento (setas) (aumento 3x). **(f)** vista em maior aumento da região cortical do úmero do indivíduo de número 771, demonstrando a presença de marcas de crescimento (aumento 40x).

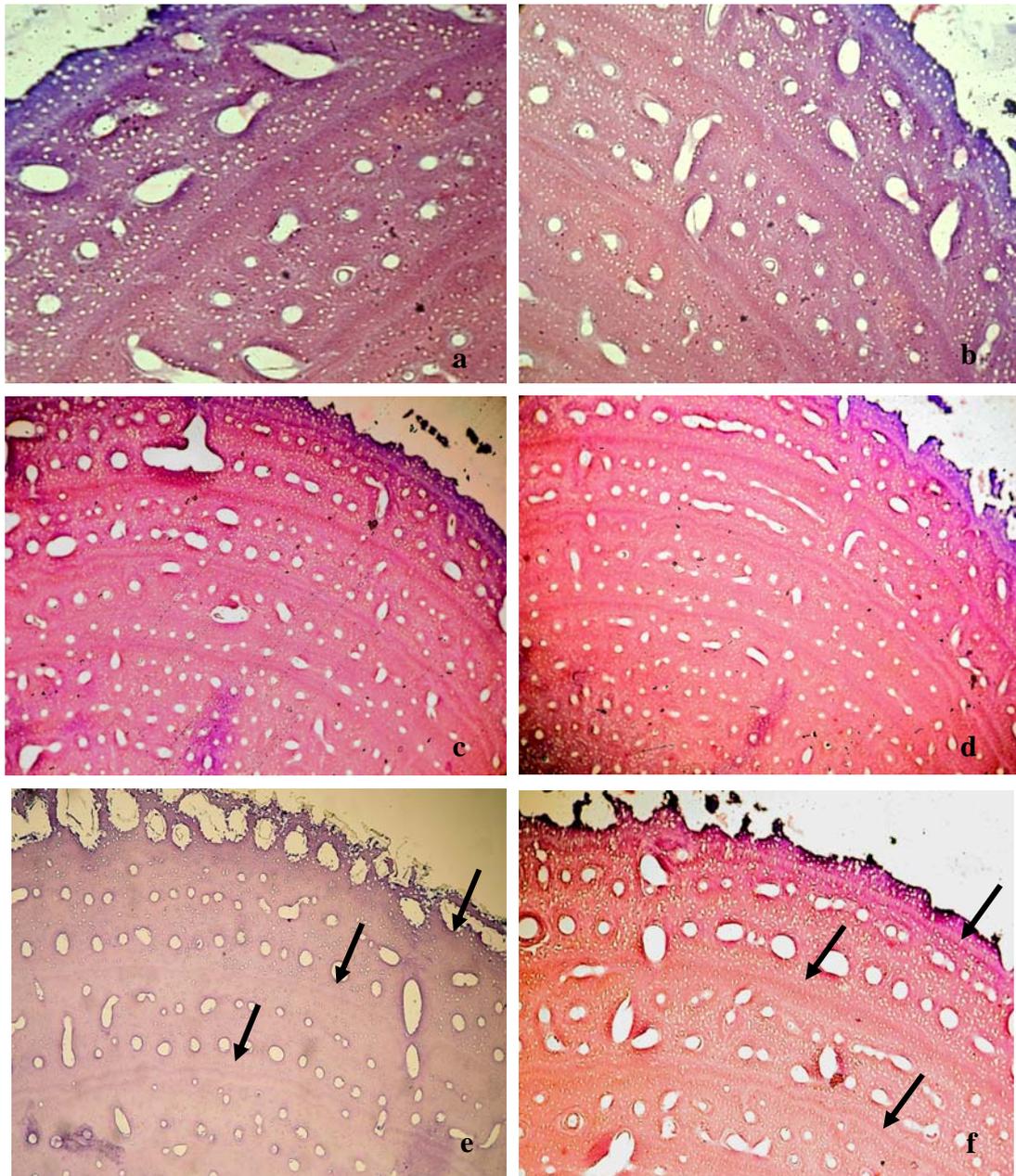


Figura 9 – Cortes histológicas transversais de úmeros de *Chelonia mydas*, demonstrando as similaridades e diferenças nos padrões das marcas de crescimento, da região cortical dos indivíduos, com relação às modificações nas preparações histológicas. **(a)** indivíduo de número 767 submetido a descalcificação nº 1, demonstrando a presença de marcas de crescimento (aumento 40x). **(b)** indivíduo de número 767 submetido a descalcificação nº 2, demonstrando a presença de marcas de crescimento (aumento 40x). **(c)** indivíduo de número 783 submetido a descalcificação nº 1 por um período de 12 dias, demonstrando a presença de marcas de crescimento (aumento 40x). **(d)** indivíduo de número 783 submetido a descalcificação nº 1 por um período de 55 dias, demonstrando a presença de marcas de crescimento (aumento 40x). **(e)** indivíduo de número 761 submetido à coloração nº1, demonstrando a presença de marcas de crescimento fracamente visíveis (setas) (aumento 40x). **(f)** indivíduo de número 761 submetido à coloração nº 2, demonstrando a presença de marcas de crescimento nitidamente visíveis (setas) (aumento 40x).

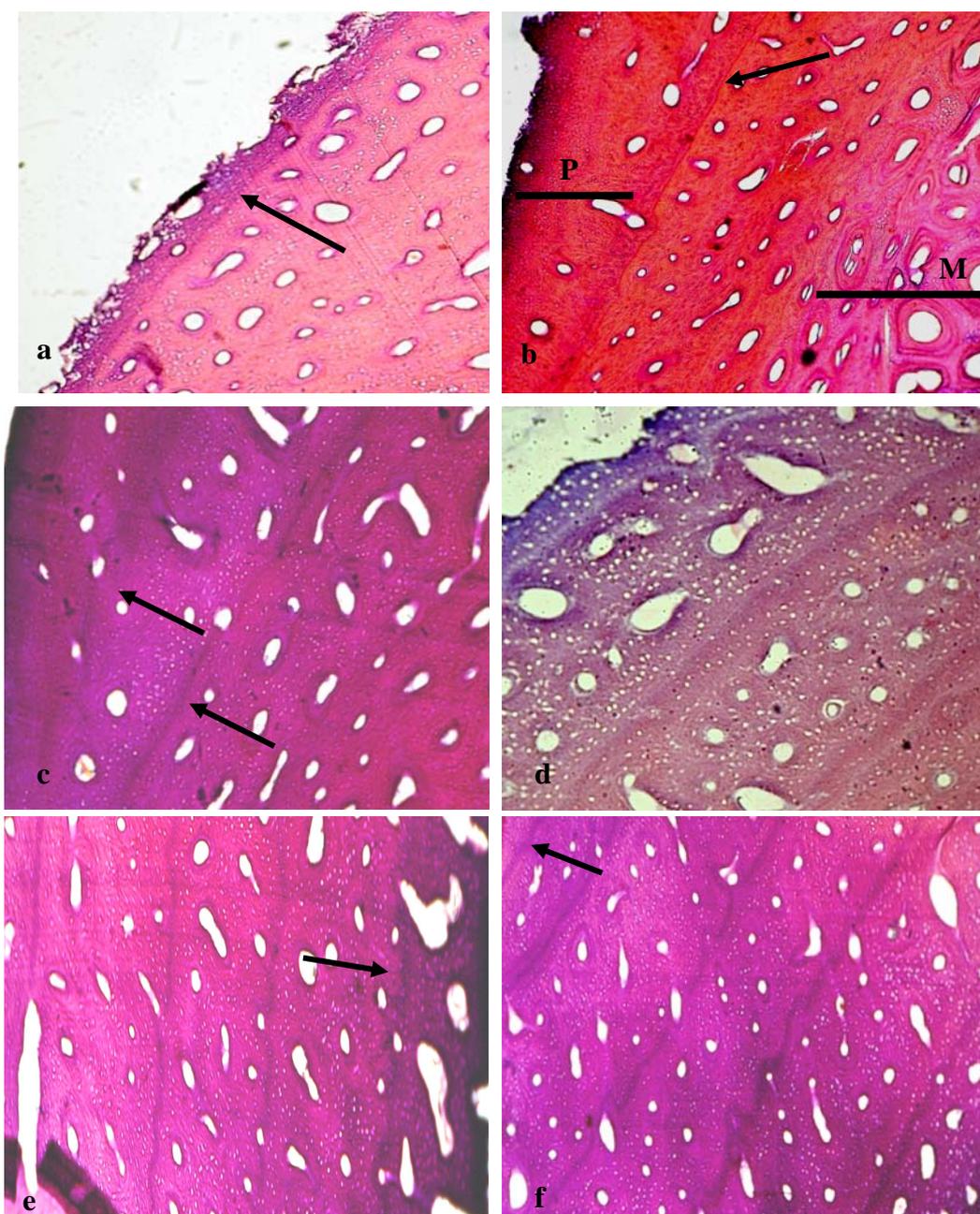


Figura 10 – Cortes histológicos transversais de úmeros de *Chelonia mydas*, demonstrando a presença de marcas de crescimento ósseo na região cortical nos diferentes indivíduos. **(a)** indivíduo de número 962, demonstrando a presença de 1 marca de crescimento na região mais externa do perióstio (seta) (aumento 40x). **(b)** indivíduo de número 959, demonstrando a presença de 1 marca de crescimento (seta) entre a região medular (M) e o perióstio (P) (aumento 40x). **(c)** indivíduo de número 765, demonstrando a presença de 2 marcas de crescimento (setas) (aumento 40x). **(d)** indivíduo de número 767, demonstrando a presença de 3 marcas de crescimento (aumento 40x) **(e)** indivíduo de número 783, demonstrando a presença de 4 marcas de crescimento (aumento 40x). **(f)** indivíduo de número 784, demonstrando a presença de 5 marcas de crescimento (aumento 40x). Em **(e)** e **(f)** as setas indicam as primeiras linhas, que não estão muito nítidas.

3.4 – Estimativas de idade para a população de *Chelonia mydas* no litoral do Rio Grande do Sul

Aqueles indivíduos nos quais as marcas de crescimento foram nitidamente visíveis possuíam comprimento curvilíneo de carapaça (ccc) variando de 33 a 49 cm. As linhas de crescimento variaram de uma a cinco (Fig.10).

Daqueles indivíduos que apresentaram linhas de crescimento nítidas, dois possuíam apenas uma linha. Em um destes animais, o indivíduo de número 962, esta linha localizava-se próxima a região mais externa do perióstio (Fig. 10a). Já no outro indivíduo que apresentava apenas uma linha, o de número 959, esta estava localizada na região central do córtex entre a medula e o perióstio (Fig.10b). Com base nestas observações, e supondo-se que estas linhas representem a idade em anos, pode-se supor que o indivíduo de número 962 poderia estar completando seu primeiro ano, enquanto aquele de número 959 já estaria se aproximando do segundo ano. Estes indivíduos apresentaram comprimentos de carapaça maiores (959 – 39,0cm; 962 – 35,0cm) do que aqueles registrados para os indivíduos que apresentaram duas linhas (770 – 33,0cm; 765 – 34,5cm), entretanto, os demais espécimes apresentaram um tamanho bastante relacionado ao número de linhas observadas: os indivíduos que apresentaram três linhas possuíam um tamanho de carapaça entre 38,0cm (número 771) e 39,0cm (números 761 e 767); aqueles animais apresentando quatro linhas possuíam comprimentos de 40,0cm (780), 41,5cm (773) e 45cm (783); e o único exemplar com cinco linhas apresentou um comprimento estimado de 49cm (estimativa obtida pela equação de regressão apresentada no item 3.3).

A relação entre o comprimento curvilíneo da carapaça e o número de linhas de crescimento dos indivíduos foi testada com a utilização do coeficiente de correlação de Pearson (Fig.11). O valor obtido, $r=0,80175$, apresentou-se significativo ($t=4,0248$;

$\alpha=0,01$), indicando a existência de uma forte correlação positiva entre comprimento curvilíneo da carapaça e o número de linhas de crescimento dos indivíduos.

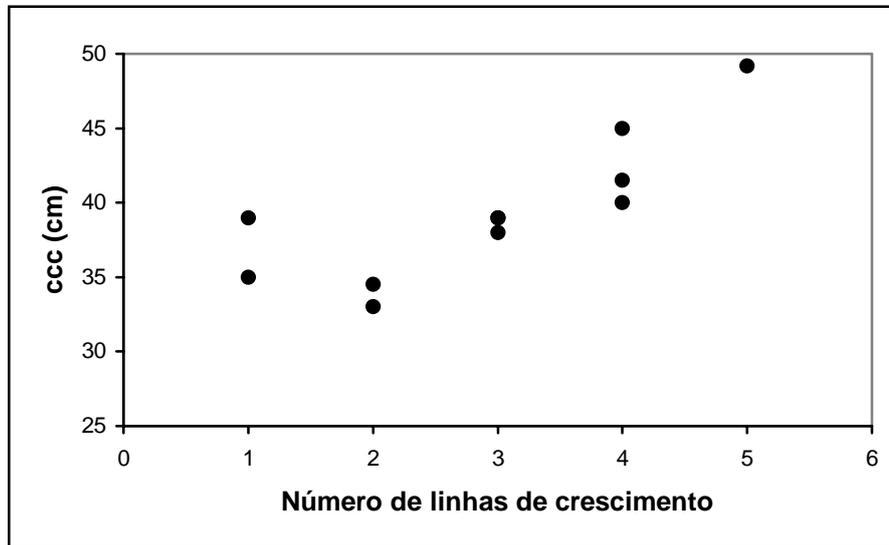


Figura 11 – Correlação entre o número de linhas de crescimento no úmero e o comprimento curvilíneo da carapaça (ccc) de *Chelonia mydas* no litoral norte do Rio Grande do Sul, $r=0,80175$ ($t=4,0248$; $\alpha=0,01$).

Esta relação entre as variáveis indica que a contagem das linhas não apresenta um padrão aleatório e corrobora nossa hipótese de que representa uma deposição cíclica relacionada a idade em anos. Admitindo-se que, tanto para *Caretta caretta* quanto para vários grupos de anfíbios e de outros répteis já estudados, estes ciclos de crescimento observados nos ossos sejam anuais, é possível sugerir então que as tartarugas encontradas no nosso litoral possuem uma idade que varia entre um e cinco anos (média=3 anos).

Os ciclos de crescimento observados nos ossos de anfíbios e répteis já foram confirmados em um grande número de espécies. A base anual de deposição destas linhas já foi confirmada, através da associação entre estudos de esqueletocronologia e marcação e recaptura, para espécies de anuros (CAETANO, 1990; GUARINO *et al.*, 1998; SULLIVAN *et al.*, 1999; MIAUD *et al.*, 2000; MEASEY, 2001), salamandras (ALCOBENDAS *et al.*, 2000;

BRUCE *et al.*, 2002), serpentes (WAYE, 1999), lagartos (El MOUDEN *et al.*, 1999) e para o tuatara (CASTANET *et al.*, 1988). A esqueletocronologia também foi validada através da utilização de indivíduos de idade conhecida, como, por exemplo, no lagarto *Tupinambis merrianae* (VARELLA & CABRERA, 2000).

Para a maioria das espécies de tartarugas marinhas o ciclo anual tem permanecido uma suposição não confirmada (ZUG, 1990). Entretanto, a validação do método tem sido apresentada em alguns casos, comprovando-se a deposição anual das linhas de crescimento (KLINGER & MUSICK, 1992; COLES *et al.*, 2001; Zug *et al.*, 2002; BJORN DAL *et al.*, 2003).

KLINGER & MUSICK (1992) e COLES *et al.* (2001) demonstraram um ciclo de crescimento anual em tartarugas-cabeçudas (*Caretta caretta*) juvenis e adultas, respectivamente. A periodicidade das marcas foi testada através de estudos de marcação e recaptura, onde os animais foram injetados com tetraciclina, um antibiótico que serve como um marcador no esqueleto no momento da injeção, sendo incorporado ao osso em crescimento e fluorescendo sob luz ultravioleta. Quando os animais foram recapturados, o número de linhas de crescimento que foram depositadas externamente à linha de tetraciclina coincidiu com o tempo em anos transcorrido entre a injeção e a recaptura.

O trabalho de BJORN DAL *et al.* (2003), com tartarugas-cabeçudas em um hábitat pelágico, também demonstra que as marcas de crescimento são depositadas anualmente, com base em estudos de marcação e recaptura utilizados em conjunto com a esqueletocronologia.

Para *Chelonia mydas*, apenas o trabalho de Zug *et al.* (2002) cita a deposição anual das linhas em uma população do Havaí. Esta validação também foi executada através da associação do método de marcação e recaptura ao uso da tetraciclina.

Outro requisito fundamental para que a estimativa de idade seja real é a de que não exista remodelação óssea suficiente para provocar a perda das primeiras linhas de

crescimento nestes indivíduos. A reabsorção óssea inicia-se no interior do osso e, com isso, remodela as linhas de crescimento internas, ou seja, as mais antigas ou primeiras a se formarem.

Diversos trabalhos tem levado em consideração o menor tamanho dos indivíduos em que a remodelação óssea não provoca a perda das primeiras linhas de crescimento. De acordo com KLINGER & MUSICK (1992), em animais da espécie *Caretta caretta* menores que 40cm de comprimento, a remodelação ainda não é capaz de provocar a perda das primeiras linhas. Já para as tartarugas-verdes, animais por volta de 55cm foram tidos como aqueles onde a remodelagem óssea atinge a região inicial de deposição das linhas (ZUG & GLOR, 1998).

Considerando que os exemplares de *Chelonia mydas* que habitam o litoral do RS tem tamanhos variando entre 29 e 52 cm, estes indivíduos tendem a apresentar pouca remodelação do tecido ósseo na região interna do córtex. Desse modo, as estimativas de idade, através da contagem das linhas, não devem ser afetadas pela remodelação nos exemplares do Rio Grande do Sul.

WITHAM (1980) e CARR (1987), documentam que o período inicial após o nascimento é um período de existência oceânica, onde animais com comprimentos entre aproximadamente 5 e 20 cm utilizam um ambiente pelágico. A partir de vários anos de pesquisa, CARR (1987) observou que as jovens tartarugas-verdes ao entrarem no mar, inicialmente nadam por várias horas, e após este período de grande atividade, passam a ser carregadas por correntes que as levam para regiões em alto mar, onde são encontradas associadas a aglomerados flutuantes de algas, principalmente *Sargassum*, permanecendo ali por longos períodos de tempo. Estes emaranhados de algas agregam uma biota diversificada, propiciando tanto alimento quanto abrigo para as tartarugas jovens (CARR, 1987). Segundo WITHERINGTON (1993), a abundância da fauna animal encontrada nos

aglomerados de *Sargassum* proporciona às jovens tartarugas uma rica fonte de alimento através da qual o animal estoca um mínimo de recursos para a atividade, salvando assim, grande parte destes para o crescimento. Por esse motivo, as tartarugas apresentam altas taxas de crescimento nesta fase de seu ciclo de vida.

Ao atingirem um tamanho de aproximadamente 30 a 40cm as tartarugas-verdes juvenis são recrutadas para um hábitat nerítico de desenvolvimento (BALAZS, 1995; MUSICK & LIMPUS, 1997; ZUG & GLOR, 1998; Zug *et al.*, 2002). Esta mudança de hábitat se dá, provavelmente, quando as tartarugas-verdes tornam-se herbívoras, sendo então compelidas, pela restrição energética da dieta, a buscar hábitats demersais mais produtivos para se desenvolverem (MUSICK & LIMPUS, 1997). A partir da análise do conteúdo do trato digestivo de tartarugas-verdes do litoral do Rio Grande do Sul, PINEDO *et al.*(1996) observaram a ingestão tanto de matéria vegetal quanto de origem animal, demonstrando a mudança que, provavelmente, está ocorrendo na dieta da espécie neste estágio de vida. Visto que as tartarugas-verdes que habitam nosso litoral possuem comprimento curvilíneo de carapaça semelhante a estes apresentados para outras populações, pode-se supor que estes animais estejam utilizando o litoral do Estado para um período inicial de desenvolvimento costeiro, logo após abandonarem seu hábitat inicial de vida, localizado em áreas oceânicas. Assim, pode-se supor que os animais que habitam o Rio Grande do Sul estariam em um estágio inicial de desenvolvimento, posterior ao estágio de vida pelágico, e anterior à mudança definitiva da dieta e ao recrutamento às pastagens de alimentação.

Os indivíduos desta população, com comprimentos entre 33 e 49cm, apresentaram de uma a cinco linhas no córtex ósseo, indicando uma idade entre 1 e 5 anos para o término da fase de desenvolvimento no ambiente pelágico. Estes resultados concordam em parte com o de alguns estudos em outras regiões.

Segundo ZUG & GLOR (1998) a mudança do hábitat pelágico para o costeiro, em tartarugas-verdes na costa Atlântica da Florida, se dá quando estas atingem um tamanho mínimo de 28cm. Estes autores, através do uso da esqueletocronologia, estimaram que os animais chegam ao ambiente costeiro com idades entre 3 e 6 anos. Animais entre 30 e 50cm apresentaram idades variando de 3 a 5 anos de idade.

De acordo com os resultados apresentados por ZUG & GLOR (1998) pode-se perceber a concordância entre as idades observadas para os indivíduos da população da Florida e aquelas da população do Rio Grande do Sul. Para a mesma classe de tamanho (30 a 50 cm) tanto as tartarugas da Florida quanto as do Rio Grande do Sul apresentaram idades até 5 anos. Porém alguns indivíduos da população do Estado apresentaram idades de 1 e 2 anos, as quais não foram observadas na população da Florida. Isto pode ser devido a uma taxa de crescimento maior nas tartarugas do Rio Grande do Sul, que atingem um mesmo comprimento que as tartarugas da outra população em menos tempo.

Em um trabalho realizado no Hawaii, ZUG *et al.* (2002) estimaram entre 3 a 4 anos a idade de um indivíduo pelágico medindo 28cm e, de 4 a 10 anos, em indivíduos com comprimentos variando entre 35 e 37 cm.

Comparando-se as taxas de crescimento entre as populações da Florida e Hawaii, para a classe de comprimentos entre 30 e 50cm, pode-se perceber que as primeiras crescem sob taxas muito mais rápidas que as segundas. Entre 30 e 40 cm as tartarugas da Florida tem uma taxa de crescimento média de 4,4 cm/ano, enquanto as do Hawaii, crescem a 3,5 cm/ano. Já na classe de tamanho de 40 a 50 cm a diferença entre as taxas são muito maiores, com 4,8 cm/ano para a Flórida e apenas 2,1 cm/ano para o Hawaii. Estas diferenças entre as populações do Oceano Atlântico e Pacífico já haviam sido documentadas através de estudos de marcação e recaptura, onde se pode perceber que populações, como por exemplo, as do Hawaii, Austrália e Equador (LIMPUS & WALTER,

1980; GREEN, 1993; BALAZS, 1995) crescem muito menos que as tartarugas do Atlântico (BOULON & FRAZER, 1990; COLLAZO *et al.*, 1992; BJORN DAL & BOL TEN, 1988).

Entretanto, outro trabalho realizado no Hawai (ZUG & BALAZS, 1985), relata a ocorrência de um animal de 33cm com idade conhecida de dois anos, e um outro de 45cm com quatro anos de idade. Estes resultados são concordantes com os resultados obtidos no presente estudo, visto que a mesma idade foi observada em indivíduos com 33 e 45cm na população do Rio Grande do Sul. Este resultado demonstra que mesmo em populações próximas, como as do Hawai, as taxas de crescimento podem apresentar grandes variações e, conseqüentemente, a idade a qual os animais atingem determinado tamanho pode ser muito variável tanto em populações distantes quanto próximas.

As diferenças quanto às estimativas de idade nas populações podem ser resultantes, principalmente, da variação natural ocorrente entre indivíduos destas (inter-populacional) ou, ainda, daquela observada nos indivíduos de uma mesma população (intra-populacional). Estas variações devem-se a inúmeros fatores que afetam as taxas de crescimento como diferenças genótípicas, sexuais, temperatura do ambiente, ambiente social, idade de maturidade sexual e adaptação a estilos de vida particulares (ANDREWS, 1982).

As taxas de crescimento e idades de maturação em tartarugas marinhas são altamente variáveis entre as espécies (BOULON & FRAZER, 1990; BOULON, 1994; BJORN DAL & BOL TEN, 1988). Entre as diferentes populações de *Chelonia mydas* também existe uma grande variação (LIMPUS & WALTER, 1980; COLLAZO *et al.*, 1992; GREEN, 1993; BALAZS, 1995), que é observada, igualmente, entre os indivíduos de uma mesma população (DAVENPORT & SCOTT, 1993).

Em cativeiro, as tartarugas-verdes são fisiologicamente capazes de crescer rapidamente e de atingir a maturidade sexual com cerca de 8 a 11 anos (WOOD & WOOD,

1980; WOOD & WOOD, 1993). Enquanto o crescimento na natureza é consideravelmente mais lento, com as estimativas de maturidade sexual variando de 18 a mais de 30 anos nas diferentes populações da espécie (LIMPUS & WALTER, 1980; FRAZER & EHRHART, 1985; FRAZER & LANDNER, 1986; EHRHART & WITHAM, 1992). Estas colocações demonstram que com um aporte maior de nutrientes e um menor gasto de energia os animais são capazes de crescer rapidamente. Desse modo, diferenças locais na distribuição dos espécimes podem possibilitar a aquisição de um mesmo comprimento em diferentes idades, como o que se observa entre os indivíduos da população do Rio Grande do Sul e, igualmente, entre estes e as demais populações já analisadas pela mesma metodologia.

A partir da obtenção destes resultados obteve-se o primeiro registro da presença de linhas de crescimento ósseo, assim como, a primeira estimativa de idade para a população de *Chelonia mydas* no início de sua fase de desenvolvimento costeiro no Brasil. Contudo, o desenvolvimento de uma técnica histológica mais adequada, bem como um aumento na amostra e uma melhor compreensão sobre os padrões migratórios das tartarugas-verdes no Atlântico Sul Ocidental poderão permitir uma interpretação mais abrangente dos resultados obtidos com a observação das marcas de crescimento ósseo.

A continuidade dos estudos neste sentido é de fundamental importância para que no futuro sejam obtidas informações que possam contribuir para a elaboração de melhores hipóteses sobre os padrões de ocorrência, migração e crescimento das tartarugas-verdes na região.

4 – CONCLUSÕES

Através da análise dos registros de encalhes da tartaruga marinha *Chelonia mydas* no litoral do Rio Grande do Sul, entre 1994 e 2003, as seguintes conclusões puderam ser obtidas.

Chelonia mydas foi a segunda espécie mais freqüente em termos de encalhes cumulativos durante todo o período amostrado (35%), sendo *Caretta caretta* a espécie mais abundante (54%).

Os indivíduos encontrados encalhados apresentaram comprimento curvilíneo de carapaça (ccc) entre 29 e 52 centímetros (média=38,9 cm). A partir disso, conclui-se que a população que habita o litoral do Rio Grande do Sul é constituída apenas por indivíduos jovens, que provavelmente estão em um estágio inicial de desenvolvimento costeiro, posterior ao estágio de vida pelágico, e anterior à mudança definitiva da dieta e ao recrutamento às pastagens de alimentação. A partir desta consideração, sugere-se que os indivíduos encontrados no litoral gaúcho, uruguaio e argentino migrem para latitudes menores, mais quentes e com maior produtividade, assim que atingem um tamanho entre 50 e 60cm.

A técnica histológica utilizada, modificada de ZUG *et al.* (1986) apresentou diversos problemas quanto a sua execução, sendo as etapas de descalcificação e inclusão as mais críticas no processo. O desenvolvimento de outras técnicas, e de estudos comparativos entre estas, são necessários para reavaliar a eficiência da técnica usualmente utilizada a fim de serem obtidos melhores resultados.

Dos 25 úmeros que puderam ser analisados, para a verificação das marcas de crescimento, apenas onze apresentaram linhas nítidas. Estes resultados corroboram os resultados de outros autores, que também registraram a presença variável das marcas de

crescimento entre indivíduos de uma mesma população.

Naqueles indivíduos que apresentaram linhas de crescimento, estas variaram de uma a cinco, indicando uma idade entre 1 e 5 anos para o término da fase de desenvolvimento no ambiente pelágico. Estes resultados corroboram os de outros autores que indicaram um período de 2 a 6 anos para a volta ao hábitat costeiro, com os animais apresentando, igualmente, comprimentos entre 30 e 50cm. As diferenças quanto às estimativas de idade nas diferentes populações podem ser resultantes, principalmente, das variações intra e/ou inter populacionais. Estas variações devem-se, possivelmente, a inúmeros fatores que afetam as taxas de crescimento.

Com estes resultados obteve-se o primeiro registro da presença de linhas de crescimento ósseo, assim como, a primeira estimativa de idade para a população de *Chelonia mydas* no início de sua fase de desenvolvimento costeiro no Brasil.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHAVAL, F. 1965. Hallazgo de *Chelonia mydas mydas* (Linne) (Tortuga verde) en el Uruguay. **Revista Oficial del Club Ancap**, (108): 27-28.
- _____. 1968. Presencia de la tortuga verde *Chelonia mydas mydas* (Linne) en el Uruguay. **Zoologia Platense**, 1 (3): 15-16.
- ACHAVAL, F.; Y.H. MARÍN & L.C. BAREA. 1998. Incidental capture of turtles with pelagic longline. *In*: **18th Annual Symposium on Sea Turtle biology and Conservation**. Mazatlan, México.
- ALCOBENDAS, M. & J. CASTANET. 2000. Bone growth plasticity among populations of *Salamandra salamandra*: interactions between internal and external factors. **Herpetologica**, 56 (1): 14-26.
- ALVARADO, J.; A. FIGUEROA; C. DELGADO; M.T. SANCHEZ & E. LOPEZ. 1993. Differential retention of metal and plastic tags on the black sea turtle (*Chelonia agassizii*). **Herpetological Review**, 24 (1): 23-24.
- ANDREWS, R.M. 1982. Patterns of growth in reptiles, p. 273-320. *In*: C. GANS & F.H. POUGH (Eds.). **Biology of Reptilia, physiological ecology, Volume 13**. Academic Press, London, 345p.
- BALAZS, G.H. 1995. Growth rates of immature green turtles in the Hawaiian Archipelago, p. 117-125. *In*: BJORN DAL, K.A. (Ed.). **Biology and Conservation of Sea Turtles**. Smithsonian Institution Press: Washington, D.C, 615p.
- BRANCROFT, J.D. 1975. **Histochemical techniques**. Butterworth & Co (Publishers) Ltd, London and Boston, 348 p.

- BARATA, P.C.R.; B.M.G. GALLO; S. DOS SANTOS; V.G. AZEVEDO & J.E. KOTAS. 1998. Captura accidental da tartaruga marinha *Caretta caretta* (Linnaeus, 1758) na pesca de espinhel de superfície na ZEE brasileira e em águas internacionais, p. 579-581. *In: Resumos da XI Semana Nacional de Oceanografia*. Rio Grande, RS, 709p.
- BASS, A.L. & W.N. WITZELL, 2000. Demographic composition of immature green turtles (*Chelonia mydas*) from the east central Florida coast: evidence from mtDNA markers. *Herpetologica*, **56** (3): 357-367.
- BEHMER, O.A.; E.M.C. TOLOSA & A.G.F. NETO. 1976. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. EDART – Editora da Universidade de São Paulo. 241p.
- BELLINI, C.; M.A. MARCOVALDI; T.M. SANCHES; A. GROSSMAN & G. SALES. 1995. Atol das Rocas Biological Reserve: second largest *Chelonia* rookery in Brazil. *Marine Turtle Newsletter*, (72): 1-2.
- BELLINI, C. & G. SALES. 1992. Registro de predação de ovos e neonatos de tartaruga marinha aruanã, *Chelonia mydas* em ilhas oceânicas brasileiras, p. 132. *In: Resumos do XII Congresso Latino-Americano e XIX Congresso Brasileiro de Zoologia*. Belém, PA.
- BJORNDAAL, K.A. 1980. Nutrition and grazing behavior of green turtle *Chelonia mydas*. *Marine Biology*, **56**: 147-154.
- _____. 1985. Nutritional ecology of sea turtles. *Copeia*, **1985** (3): 736-751.
- _____. 1997. Foraging ecology and nutrition of sea turtles, p. 199-231. *In: LUTZ, P. & J.A. MUSICK (Eds.). The biology of sea turtles*. Boca Raton, FL., CRC Press, 432p.
- BJORNDAAL, K.A. & A.B. BOLTON, 1988. Growth rates of juvenile loggerheads, *Caretta caretta*, in the Southern Bahamas. *Journal of Herpetology*, **22** (4): 480-482.

- _____. 1995. Comparison of length-frequency analyses for estimation of growth parameters for a population of green turtles. **Herpetologica**, **51** (2): 160-167.
- BJORNDAL, K.A.; A.B. BOLTEN; R.A. BENNETT; E.R. JACOBSON; T.J. WRONSKI; J.J. VALESKI & P.J. ELIAZAR. 1998. Age and growth in sea turtles: limitations of skeletochronology for demographic studies. **Copeia**, **1998** (1): 23-30.
- BJORNDAL, K.A.; A.B. BOLTEN; T. DELLINGER; C. DELGADO & H.R. MARTINS. 2003. Compensatory growth in oceanic loggerhead sea turtles: response to a stochastic environment. **Ecology**, **84** (5): 1237-1249.
- BOLTEN, A.B. 1999. Techniques for measuring sea turtles, p. 3-5. *In*: ECKERT, K.L.; K.A. BJORNDAL; F.A. ABREU-GROBOIS & M. DONNELLY (Eds.). **Research and Management Techniques for the Conservation of sea turtles**. IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication No. 4, 235p.
- BOULON JR., R.H. 1994. Growth rates of wild juvenile hawksbill turtles, *Eretmochelys imbricata*, in St. Thomas, United States Virgin Islands. **Copeia**, **1994** (3): 811-814.
- BOULON JR., R.H. & N.B. FRAZER. 1990. Growth of wild juvenile Caribbean green turtles, *Chelonia mydas*. **Journal of Herpetology**, **24** (2): 441-445.
- BOWEN, B.W. & J.C. AVISE. 1994. Tracking turtles through time. **Natural History**, **12**: 36-42.
- _____. 1995. Conservation genetics of marine turtles, p. 190-237. *In*: AVISE, J.C. & J.L. HAMRICK (Eds.). **Conservation Genetics: Case Histories from Nature**. New York, Chapman and Hall, 512p.
- BOWEN, B.W. & S.A. KARL. 1997. Population genetics, phylogeography, and molecular evolution, p. 29-50. *In*: LUTZ, P. & J.A. MUSICK (Eds.). **The biology of sea turtles**. Boca Raton, FL., CRC Press, 432p.
- BOWEN, B.W.; A.B. MEYLAN; J.P. ROSS; C.J. LIMPUS; G.H. BALAZS & J.C. AVISE.

1992. Global population structure and natural history of the green turtle (*Chelonia mydas*) in terms of matriarchal phylogeny. **Evolution**, **46** (4): 865-881.
- BRUCE, R.C.; J. CASTANET & H. FRANCILLON-VIEILLOT. 2002. Skeletochronological analysis of variation in age structure, body size and life history in three species of Desmognathine salamanders. **Herpetologica**, **58** (2): 181-193.
- BUGONI, L.; L. KRAUSE & M.V. PETRY. 2001. Marine debris and human impacts on sea turtles in southern Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, **42** (12): 1330-1334.
- CAETANO, M.H. 1990. Use and results of skeletochronology in some urodeles (*triturus marmoratus*, Latreille 1800 and *Triturus boscai*, Lataste 1879). **Annales des Sciences Naturelles**, **11**: 197-199.
- CAILLOUET JR., C.W.; M.J. DURONSIET; A.M. LANDRY JR.; D.B. REVERA; D.J. SHAVER; K.M. STANLEY; R.W. HEINLY & E.K. STABENAU. 1991. Sea turtle strandings and shrimp fishing effort in the northwestern Gulf of Mexico, 1986-89. **Fishery Bulletin**, **1991** (89): 712-718.
- CÂMARA, I.G. 1982. Proposta de procedimento internacional para a conservação das tartarugas marinhas. **FBCN**, **1982** (17): 62-69.
- CARR, A. 1952. **Handbook of turtles of the United States, Canada and Baja California**. Ithaca, New York. Comstock Publ. Assoc., Cornell Univ.Press, 542 p.
- _____. 1975. The Ascension Island green turtle colony. **Copeia**, **1975** (3): 547-555.
- _____. 1980. Some problems of sea turtle ecology. **American Zoologist**, **20** (1980): 489-498.
- _____. 1987. New perspectives on the pelagic stage of sea turtle development. **Conservation Biology**, **1** (2): 103-121.
- CARR, A. & D. GOODMAN. 1970. Ecologic implications of size and growth in *Chelonia*. **Copeia**, **1970** (4): 783-786.

- CASTANET, J.; H. FRANCILLON-VIEILLOT & R.C. BRUCE. 1996. Age estimation in Desmognathine salamanders assessed by skeletochronology. **Herpetologica**, **52** (2): 160-171.
- CASTANET, J.; D.G. NEWMAN & H. SAINT GIRONS. 1988. Skeletochronological data on the growth, age and population structure of the tuatara, *Sphenodon punctatus*, on Stephens and Lady Alice Islands, New Zealand. **Herpetologica**, **44** (1): 25-37.
- CASTANET, J. & E. SMIRINA. 1990. Introduction to the skeletochronological method in amphibians and reptiles. **Annales des Sciences Naturelles**, **11**:191-196.
- CERCHIARI, E. & H.A. ANDRADE. 2000. Idade e crescimento da cabrinha *Prionotus punctatus* (Bloch 1797) do sul do Brasil, p. 563-564. *In: Anais da XIII Semana Nacional de Oceanografia*. Itajaí, SC.
- CHALOUPKA, M. & G.R. ZUG. 1997. A poliphasic growth function for the endangered kemp's ridley sea turtle, *Lepidochelys kempii*. **Fishery Bulletin**, **95**: 849-856.
- CHAN, E.H.; H.C. LIEW & A.G. MAZLAN. 1988. The incidental capture of sea turtles in fishing gear in Terengganu, Malaysia. **Biological Conservation**, **1988** (43):1-7.
- COLES, W.C.; J.A. MUSICK & L.A. WILLIAMSON. 2001. Skeletocronology validation from a adult loggerhead (*Caretta caretta*). **Copeia**, **2001** (1): 240-242.
- COLLAZO, J.A.; R. BOULON JR. & T.L. TALLEVAST. 1992. Abundance and growth patterns of *Chelonia mydas* in Culebra, Puerto Rico. **Journal of Herpetology**, **26** (3): 293-300.
- CORMACK, D.H. 1991. **Ham Histologia**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ, 570p.
- DAM, R.P. 1999. Measuring sea turtles growth, p.149-151. *In: ECKERT, K.L.; K.A. BJORNDALE; F.A. ABREU-GROBOIS & M. DONNELLY (Eds.). In: Research and Management Techniques for the Conservation of sea turtles*. IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication No. 4, 235 p.

- D'AMATO, A.F. 1991. Ocorrência de tartarugas marinhas (Testudines: Cheloniidae, Dermochelyidae) no Estado do Paraná (Brasil). **Acta Biologica Leopoldensia**, **13** (2): 105-110.
- _____. 1992. Ocorrência de *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz, 1829) (Testudines: Cheloniidae) para o Estado do Paraná – Brasil. **Acta Biologica Leopoldensia**, **14** (2): 95-97.
- DAVENPORT, J. & C.R. SCOTT. 1993. Individual growth and allometry of young green turtles (*Chelonia mydas* L.). **Herpetological Journal**, **3**: 19-25.
- ECKERT, S.A. & L. SARTI. 1998. Distant fisheries implicated in the loss of the world's largest leatherback nesting population. **Marine Turtle Newsletter**, (78): 2-7.
- EHRHARDT, N.M. & R. WITHAM. 1992. Analysis of growth of the green sea turtle (*Chelonia mydas*) in the western central Atlantic. **Bulletin of Marine Science**, **50** (2): 275-281.
- EL MOUDEN, E.H.; M. ZNARI & R.P. BROWN. 1999. Skeletochronology and mark-recapture assessments of growth in the North African agamid lizard (*Agama impalearis*). **Journal of Zoology**, **249**: 455-461.
- ENLOW, D.H. The bone of the reptiles, p. 45-80. In: GANS, C.; T.S. PARSONS & A. BELLAIRS (Eds.). **Biology of the Reptilia, morphology, Volume 1**. Academic Press, London, 373p.
- ESTEBAN, M. 1990. Environmental influences on the skeletochronological record among recent and fossil frogs. **Annales des Sciences Naturelles**, **11**: 201-204.
- FERREIRA, M.M. 1968. Sobre a alimentação da aruanã, *Chelonia mydas* Linnaeus, ao longo da costa do estado do Ceará. **Arquivos Estação Biologia Marinha Universidade Federal Ceará**, **8** (1): 83-86.
- FRAZIER, J. 1984. Las tortugas marinas en el oceano Atlantico Sur Occidental. **Serie**

- Divulgacion, Asociacion Herpetologica Argentina, (2): 2-21.**
- FRAZER, N.B. & L.M. EHRHART. 1985. Preliminary growth models for green, *Chelonia mydas* and loggerhead, *Caretta caretta*, turtles in the wild. **Copeia, 1985 (1): 73-79.**
- FRAZER, N.B. & R.C. LADNER. 1986. A growth curve for green sea turtles, *Chelonia mydas*, in the Virgin Islands, 1913-14. **Copeia, 1986 (3): 798-802.**
- GALLO, B.M.G.; S. MACEDO; B.B. GIFFONI; J.H. BECKER & P.C.R. BARATA. 2000. A base do Projeto Tamar-Ibama em Ubatuba (Estado de São Paulo, Brasil): Conservação das tartarugas marinhas em uma área de alimentação, p. 500-502. *In:* **Anais da XIII Semana Nacional de Oceanografia.** Itajaí, SC.
- GARCIA, C.A.E. 1997. Physical Oceanography, p. 94-96. *In:* SEELIEGER, U.; C. ODEBRECHT & J.P. CASTELLO (Eds.). **Subtropical Convergence Environments. The coast and sea in the southwestern Atlantic.** Springer-Verlag Berlin Germany.
- GERMANO, D.J. & R.B. BURY. 1998. Age determination in turtles: evidence of annual deposition of scute rings. **Chelonian Conservation Biology, 3 (1): 123-132.**
- GIBSON, J. & G. SMITH. 1999. Reducing threats to foraging habitats, p.184-188. *In:* ECKERT, K.L.; K.A. BJORN DAL; F.A. ABREU-GROBOIS & M. DONNELLY (Eds.). **Research and Management Techniques for the Conservation of sea turtles.** IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication No. 4, 235p.
- GRAHAM, T.E. 1979. Life history techniques, p. 73-95. *In:* HARLESS, M. & H. MORLOCK (Eds.), **Turtles: perspectives and research.** Wiley Interscience, New York, 695p.
- GREEN, D. 1993. Growth rates of wild immature green turtles in the Galápagos Islands, Ecuador. **Journal of Herpetology, 27 (3): 338-341.**

- GUARINO, F.M.; F. ANDREONE & F. ANGELINI. 1998. Growth and longevity by skeletochronological analysis in *Mantidactylus microtypanum*, a rain-forest anuran from Southern Madagascar. **Copeia**, **1998** (1): 194-198.
- GUDYNAS, E. 1980. Notes on the sea turtles of Uruguay. **ASRA Journal**, **1** (3): 69-76.
- GUINEA, M.L. & S. WHITING. 1997. Sea turtle deaths coincide with trawling activities in northern Australia. **Marine Turtle Newsletter**, (77): 11-14.
- HIRAYAMA, R. 1998. Oldest known sea turtle. **Nature**, **392**: 705-708.
- HIRTH, H.F. 1971. Synopsis of biological data on the green turtle *Chelonia mydas* (Linnaeus) 1758. **FAO Fisheries Synopsis** (85): 8:19.
- HOHN, A. & S. FERNANDEZ.. 1999. Biases in dolphin age structure due to age estimation technique. **Marine Mammal Science**, **15** (4): 1124-1132.
- HOHN, A. & J. FRAZIER. 1979. Growth layers in bones and scutes of sea turtles: a possible aging method. **American Zoologist**, **19**: 953.
- HORNER, J.R.; A. RICQLÈS & K. PADIAN. 1999. Variation in dinosaur skeletochronology indicators: implications for age assessment and physiology. **Paleobiology**, **25** (3): 295-304.
- HYKLE, D. 1999. Internacional conservation treaties, p. 228-231. *In*: ECKERT, K.L.; K.A. BJORN DAL; F.A. ABREU-GROBOIS & M. DONNELLY (Eds.) **Research and Management Techniques for the Conservation of sea turtles**. IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication No. 4, 235p.
- IUCN. 2003. **2003 IUCN Red List of Threatened Species**. Disponível em <http://www.redlist.org/> Acesso em 10 de Janeiro de 2004.
- KLINGER, R.C. & J. A. MUSICK. 1992. Annular growth layers in juvenile loggerhead turtles (*Caretta caretta*). **Bulletin of Marine Science**, **51** (2): 224-230.
- LAHANAS, P.N.; K.A. BJORN DAL; A.B. BOLTEN; S.E. ENCALADA; N.M. MIYAMOTO;

- R.A. VALVERDE & B.W. BOWEN 1998. Genetic composition of a green turtle (*Chelonia mydas*) feeding ground population: evidence for multiple origins. **Marine Biology**, **130**: 345-352.
- LECLAIR JR., R. 1990. Relationships between relative mass of the skeleton, endosteal resorption, habitat and precision of age determination in ranid amphibians. **Annales des Sciences Naturelles**, **11**: 205-208.
- LEITE JR., N.O. & M. HAIMOVICI. 2000. Determinação de idades e crescimento do batata, *Lopholatilus villarii* Miranda Ribeiro, 1915 (Teleostei; Malacanthidae) no sul do Brasil. p. 560-562. *In: Anais da XIII Semana Nacional de Oceanografia*. Itajaí, SC.
- LEMA, T. & M.T.S. FERREIRA. 1990. Contribuição ao conhecimento dos Testudines do Rio Grande do Sul (Brasil) - Lista sistemática comentada (Reptilia). **Acta Biologica Leopoldensia**, **12** (1): 125-164.
- LIMPUS, C.J. & D.G. WALTER. 1980. The growth of immature green turtles (*Chelonia mydas*) under natural conditions. **Herpetologica**, **36** (2): 162-165.
- MARCOVALDI, M.A. & A. LAURENT. 1996. A six season study of marine turtle nesting at Praia do Forte, Bahia, Brazil, with implications for conservation and management. **Chelonian Conservation Biology**, **2** (1): 55-59.
- MARCOVALDI, M.A. & G.G. MARCOVALDI. 1999. Marine turtles of Brazil: the history and structure of Projeto TAMAR-IBAMA. **Biological Conservation**, **91**: 35-41.
- MARCOVALDI, M.A.; C. BAPTISTOTTE; J.C. De CASTILHOS; B.G.M. GALLO; E.H.S.M. LIMA; T.M. SANCHES & C.F. VIEITAS. 1998. Activities by Project TAMAR in brasilian sea turtle feeding grounds. **Marine Turtle Newsletter**, (80): 5-7.
- MARCOVALDI, M.A.; A.C.C.D. SILVA; B.M.G. GALLO; C. BAPTISTOTTE; C.F. VIEITAS; C. BELLINI; E.H.S.M. LIMA; J.C. De CASTILHOS; J.C.A. THOMÉ & T.M. SANCHES.

2000. Atuação do Projeto Tamar-Ibama em áreas de alimentação das tartarugas marinhas no Brasil, p. 497-499. *In: Anais da XIII Semana Nacional de Oceanografia*. Itajaí, SC.
- MÁRQUEZ, R.M. 1990. Sea turtles of the world: an annotated and illustrated catalogue of sea turtle species known to date. **FAO Fisheries Synopsis**, **11** (125): 81.
- MARTINS, M.B.; M.E.M. SILVEIRA. & M.A. DA SILVA. 1996. A ocorrência de tartarugas marinhas no estado do Rio Grande do Sul, p. 189-190. *In: Resumos do XXI Congresso Brasileiro de Zoologia*. Porto Alegre, RS.
- MCMANUS, J.F.A. & MOWRY, R.W. 1960. **Staining methods. Histologic and histochemical**. Medical Division of Harper & Brothers, New York, USA, 423p.
- MEASEY, G.J. 2001. Growth and ageing of feral *Xenopus laevis* (Daudin) in South Wales, U.K. **Journal of Zoology of London**, **255**: 1-9.
- MENDONÇA, M.T. 1981. Comparative growth rates of wild immature *Chelonia mydas* and *Caretta caretta* in Florida. **Journal of Herpetology**, **15** (4): 447-451.
- MEYLAN, A.B. 1995. Sea turtle migration – evidence from tag returns, p. 91-100. *In: K.A. BJORN DAL (Ed.). Biology and Conservation of Sea Turtles*. Washington DC, Smithsonian Institution Press, 615p.
- MEYLAN, A.B.; B.W. BOWEN & J.C. AVISE. 1990. A genetic test of the natal homing versus social facilitation models for green turtle migration. **Science**, **248** (2): 724-727.
- MIAUD, C.; R. GUYETANT & H. FABER. 2000. Age, size and growth of the alpine newt, *Triturus alpestris* (Urodela: Salamandridae), at high altitude and a review of life-history trait variation throughout its range. **Herpetologica**, **56** (2): 135-144.
- MONTORI, A. 1990. Skeletochronological results in the pyrenean newt *Euproctus asper* (Dugés, 1852) from one prepyrenean population. **Annales des Sciences Naturelles**,

11: 209-211.

- MOREIRA, L.; C. BAPTISTOTTE; J. SCALFONE; J.C. THOMÉ & A.P.L.S. DE ALMEIDA. 1995. Occurrence of *Chelonia mydas* on the Island of Trindade, Brazil. **Marine Turtle Newsletter**, (70): 2.
- MORENO, J.A. 1961. **Clima do Rio Grande do Sul**. Secretaria da Agricultura, 42p.
- MORENO, I.B.; D. DANILEWICS; P.H. OTT; M. BORGES-MARTINS; L.R. OLIVEIRA; M. TAVARES; S.B. NAKASHIMA & C.C. TRIGO. 2003. Monitoramento da ocorrência de mamíferos marinhos e tartarugas marinhas no litoral norte do Rio Grande do Sul (1991 a 2003), p. 31. *In: Anais das 2^{as} Jornadas de Conservación y Uso Sustentable de la Fauna Marinha*. Montevideo, Uruguai, 70p.
- MORTIMER, J.A. & A. CARR. 1987. Reproduction and migrations of the Ascension Island green turtle (*Chelonia mydas*). **Copeia**, 1987 (1): 103-113.
- MORTIMER, J.A. & K.M. PORTIER. 1989. Reproductive homing and interesting behavior of the green turtle (*Chelonia mydas*) at Ascension Island, South Atlantic Ocean. **Copeia**, 1989 (4): 962-977.
- MUSICK, J.A. & C.J. LIMPUS. 1997. Habitat utilization and migration in juvenile sea turtles, p. 137-163. *In: LUTZ, P. & MUSICK, J.A. (Eds.). The biology of sea turtles*. Boca Raton FL., CRC Press, 432p.
- NAKASHIMA, S.B.; L.F. DUTRA; F.H. SILVA; C.C. TRIGO; M. BORGES-MARTINS; I.B. MORENO & D. DANIELEWICZ. 2001. Padrões de ocorrência de tartarugas marinhas no litoral norte do Rio Grande do Sul, p. 332. *In: Resumos do V Congresso de Ecologia do Brasil*. Porto Alegre, RS, 486p.
- OTT; P.H.; I.B. MORENO; D. DANILEWICZ; L.R. OLIVEIRA; M. BORGES-MARTINS & G. CAON. 1999. An overview of the coastal fishery interactions with marine mammals, sea turtles and sea birds in the northern Rio Grande do Sul, southern Brazil, p. 51.

- In: Proceedings of the Symposium “Ecosystem effects of fishing”*. Montpellier, França.
- PANELLA, G. 1971. Fish otoliths: daily growth layers and periodical patterns. **Science**, **173**: 1124-1127.
- PARHAM, J.F.; C.K. DODD JR. & G.R. ZUG. 1996. Skeletochronological age estimates for the red hills salamander, *Phaeognathus hubrichti*. **Journal of Herpetology**, **30** (3): 401-404.
- PARHAM, J.F. & G.R. ZUG. 1998. Age and growth of loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) of coastal Georgia: an assessment of skeletochronological age-estimates. **Bulletin of Marine Science**, **61** (2): 287-304.
- PETERS, A. & K.J.F. VERHOEVEN. 1994. Impact of artificial lighting on the seaward orientation of hatchling loggerhead turtles. **Journal of Herpetology**, **28** (1): 112-114.
- PINEDO, M.C.; R. CAPITOLI; A.S. BARRETO & A.L.V. ANDRADE. 1996. Occurrence and feeding of sea turtles in southern Brazil, p. 117-118. *In: Proceedings of the Sixteenth Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation*. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-412, 158p.
- PINEDO, M.C. & A. HOHN. 2000. Growth layer patterns in teeth from the franciscana, *Pontoporia blainvillei*: developing a model for precision in age estimation. **Marine Mammal Science**, **16** (1): 1-27.
- POUGH, F.H.; R.M. ANDREWS; J.E. CADLE; M.L. CRUMP; A.H. SAVITZKY & K.D. WELLS. 1998. **Herpetology**. New Jersey, USA. Prentice -Hall, Inc., 577p.
- PREECE, A. 1972. **A manual for histologic technicians**. Little, Brown and Company, Boston, USA, 428 p.
- PRITCHARD, P.C.H. 1969. Sea turtles of the Guianas. **Bulletin of the Florida State**

- Museum**, **13** (2): 84-141.
- _____. 1979. **Encyclopedia of turtles**. T.H.F. Publications, Inc. Ltda, 895p.
- _____. 1997. Evolution, phylogeny, and current status, p. 1-28. *In*: LUTZ, P. & J.A. MUSICK, (Eds.). **The biology of sea turtles**. Boca Raton, FL., CRC Press, 432p.
- PRITCHARD, P.C.H. & J.A. MORTIMER. 1999. Taxonomy, external morphology, and species identification, p. 21-38. *In*: ECKERT, K.L.; K.A. BJORNDALE; F.A. ABREU-GROBOIS & M. DONNELLY (Eds.) **Research and Management Techniques for the Conservation of sea turtles**. IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication No. 4, 235p.
- PRITCHARD, P.C.H. & P. TREBBAU. 1984. **The turtles of Venezuela**. Society for the Study of Amphibians and Reptiles, 414 p.
- RAMBO, B. 1994. **A Fisionomia do Rio Grande do Sul**. Editora Unisinos, Porto Alegre, RS, 473 p.
- ROSAS, F.C.W.; A.S. BARRETO. & E.L.A. MONTEIRO-FILHO. 2003. Age and growth of the estuarine dolphin (*Sotalia guianensis*) (Cetacea, Delphinidae) on the Paraná coast, southern Brazil. **Fishery Bulletin**, **101**: 377-383.
- ROSSEL JR., C.R. & J.L. SHEENAN. 1998. Comparison of histological staining procedures for skeletochronological studies. **Herpetological Review**, **29** (2): 95.
- SAGOR, E.S.; M. OUELLET; E. BARTEN & D.M. GREEN. 1998. Skeletochronology and geographic variation in age structure in the wood frog, *Rana sylvatica*. **Journal of Herpetology**, **32** (4): 469-474.
- SANCHES, T.M. & C. BELLINI. 1999. Juvenile *Eretmochelys imbricata* and *Chelonia mydas* in the Archipelago of Fernando de Noronha, Brazil. **Chelonian Conservation and Biology**, **3** (2): 308-311.

- SANDER, P.M. 1990. Skeletochronology in the small Triassic reptile *Neusticosaurus*. **Annales des Sciences Naturelles**, **11**: 213-217.
- SANTOS, M.C.O.; S. ROSSO & R.M.A. RAMOS. 2003. Age estimation of marine tucuxi dolphins (*Sotalia fluviatilis*) in south-eastern Brazil. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, **83**: 233-236.
- SAZIMA, I. & M. SAZIMA. 1983. Aspectos de comportamento alimentar e dieta da tartaruga marinha, *Chelonia mydas*, no litoral norte paulista. **Boletim Instituto Oceanográfico**, **32** (2): 199-203.
- SHAVER, D.J. 1994. Relative abundance, temporal patterns, and growth of sea turtles at the Mansfield Channel, Texas. **Journal of Herpetology**, **28** (4): 491-497.
- SHEEHAN, D.C. & B.B. HRAPCHAK. 1973. **Theory and practice of histotechnology**. The C. V. Mosby Company, Saint Louis, USA, 218p.
- SILVA, K.G. & E. ALMEIDA. 1998. Monitoramento da ocorrência de tartarugas marinhas no litoral do Rio Grande do Sul (1996), p. 264-266. *In*: **Resumos da XI Semana Nacional de Oceanografia**. Rio Grande, RS, 709p.
- SHOOP, C.R. & C. RUCKDESCHEL. 1982. Increasing turtle strandings in the southeast United States: a complicating factor. **Biological Conservation**, **23**:213-215.
- SOTO, J.M.R. & R.C.P. BEHEREGARAY. 1997a. New records of *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz, 1829) and *Eretmochelys imbricata* (Linnaeus, 1766) in the southwest Atlantic. **Marine Turtle Newsletter**, (77): 8-10.
- _____. 1997b. *Chelonia mydas* in the northern region of the Patos Lagoon, South Brazil. **Marine Turtle Newsletter**, (77): 10-11.
- STEVENS, A. 1977. The haematoxylin, p. 85-98. *In*: BRANCROFT, J.D. & A. STEVENS (eds.). **Theory and practice of histological techniques**. Churchill Livingstone, London, Great Britain, 436 p.

- SULLIVAN, B.K. & P.J. FERNANDEZ. 1999. Breeding activity, estimated age-structure, and growth in Sonoran Desert anurans. **Herpetologica**, **55** (3): 334-343.
- TRIGO, C.C.; L.F. DUTRA; S.B. NAKASHIMA; F.H. SILVA; M. BORGES-MARTINS; I.B. MORENO & D. DANIELEWICZ. 2001. Padrões de ocorrência da tartaruga marinha *Caretta caretta* no litoral norte do Rio Grande do Sul, p. 9. *In: Resumos do V Congresso de Ecologia do Brasil*. Porto Alegre, RS, 486p.
- TRIGO, C.C. & M. BORGES-MARTINS. 2001. Padrões de ocorrência da tartaruga marinha *Chelonia mydas* no litoral norte do Rio Grande do Sul e verificação da presença de marcas de crescimento em ossos longos, p. 11. *In: Resumos do I Simpósio da Sociedade Brasileira de Herpetologia*. São Paulo, SP.
- TUCKER, A.D. & C.J. LIMPUS. 1992. Annuli on carapacial scutes of hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) at Heron Island Reef, p. 249. *In: Proceedings of the Twelfth Annual Workshop on Sea Turtle Biology and Conservation*. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-361, 274p.
- VARELLA, C.F.D. & M.R. CABRERA. 2000. Testing skeletochronology in black tegu lizards (*Tupinambis merianae*) of known ages. **Herpetological Review**, **31** (4): 224-226.
- WAYE, H.L. 1999. Size and age structure of a population of western terrestrial garter snakes (*Thamnophis elegans*). **Copeia**, **1999** (3): 819-823.
- WILSON, D.S.; C.R. TRACY & C.R. TRACY. 2003. Estimating age of turtles from growth rings: a critical evaluation of the technique. **Herpetologica**, **59** (2):178-194.
- WITHAM, R. 1980. The “lost year” question in young sea turtles. **American Zoologist**, **20** (1980): 525-530.
- WITHERINGTON, B.E. 1993. Some “lost-year” turtles found, p. 194-197. *In: Proceedings of the Thirteenth Annual Symposium on Sea Turtle Biology and*

- Conservation.** NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-341, 281p.
- _____. 1999. Reducing threats to nesting habitat, p.179-183. *In:* ECKERT, K.L.; K.A. BJORN DAL; F.A. ABREU-GROBOIS & M. DONNELLY (Eds.). **Research and Management Techniques for the Conservation of sea turtles.** IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication No. 4, 235p.
- WOOD, J.R. & F.E. WOOD. 1980. Reproductive biology of captive green sea turtles *Chelonia mydas*. **American Zoologist**, **20** (1980): 499-505.
- WOOD, F. & J. WOOD. 1993. Growth curve for captive-reared green sea turtles, *Chelonia mydas*. **Herpetological Journal**, **3**: 49-54.
- ZUG, G.R. 1990. Age determination of long-lived reptiles: some techniques for seaturtles. **Annales des Sciences Naturelles**, **11**: 219-222.
- _____. 1991. Estimates of age and growth in *Lepidochelys kempii* from skeletochronological data, p.285-286. *In:* **Proceedings of the Tenth Annual Workshop on Sea Turtle Biology and Conservation.** NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFC-278, 286p.
- ZUG, G.R. & G.H. BALAZS. 1985. Skeletochronological age estimates for Hawaiian green turtles. **Marine turtle newsletter**, (33): 9-10.
- ZUG, G.R.; G.H. BALAZS & J.A. WETHERALL. 1995. Growth in juvenile loggerhead seaturtles (*Caretta caretta*) in the north Pacific pelagic habitat. **Copeia**, **1995** (2): 484-487.
- ZUG, G.R.; G.H. BALAZS; J.A. WETHERALL; D.M. PARKER & S.K.K. MURAKAWA. 2002. Age and growth of Hawaiian green seaturtles (*Chelonia mydas*): an analysis based on skeletochronology. **Fishery Bulletin**, **100**: 117-127.
- ZUG, G.R. & R.E. GLOR. 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. **Canadian Journal of Zoology**, **76**: 1497-1506.
- ZUG, G.R.; H.J. KALB & S.J. LUZAR. 1997. Age and growth in wild kemp's ridley seaturtles *Lepidochelys kempii* from skeletochronological data. **Biological Conservation**, **80**: 261-268.
- ZUG, G.R. & J.F. PARHAM. 1996. Age and growth in leatherback turtles, *Dermochelys coriacea* (Testudines: Dermochelyidae): a skeletochronological analysis. **Chelonian Conservation and Biology**, **2** (2): 244-249.
- ZUG, G.R.; A.H. WYNN & C. RUCKDESCHEL. 1986. Age determination of loggerhead sea turtles, *Caretta caretta*, by incremental growth marks in the skeleton. **Smithsonian Contributions to Zoology**, (427): 1-34.

Anexo I– Caracterização da amostra de *Chelonia mydas* coletada no litoral do Estado do Rio Grande do Sul, entre março de 1994 e setembro de 2003. Número de registro nos catálogos de campo do GEMARS, para cada indivíduo, com seu respectivo número de registro na Coleção de Anexos do Laboratório de Herpetologia do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS (MCPAN), data de coleta, comprimento curvilíneo da carapaça (ccc), presença ou ausência de úmero.

Nº GEMARS	Nº MCPAN	Data/Ano	ccc (cm)	Úmero
09	238	1994	33,0	Ausente
18	784	1994	-	Presente
20	325	1994	-	Presente
27	326	1994	38,0	Presente
32	320	1994	34,5	Presente
33	783	1994	45,0	Presente
38	322	1995	35,0	Presente
39	327	1995	42,0	Presente
40	328	1995	34,5	Presente
76	782	1996	-	Ausente
77	774	1997	35,5	Presente
80	778	1997	37,0	Presente
85	781	1996	-	Presente
86	777	1997	36,0	Presente
87	769	1997	35,0	Presente
88	761	1997	39,0	Presente
89	785	1997	37,5	Presente
90	768	1997	38,5	Presente
91	772	1997	-	Presente
92	776	1997	35,0	Presente
97	-	1997	37,5	Ausente
98	-	1997	37,0	Ausente
99	-	1997	38,0	Ausente
101	771	1997	38,0	Presente
106	992	1997	39,0	Presente
109	990	1997	41,5	Presente
110	993	1997	44,0	Presente
111	991	1997	35,0	Presente
112	981	1997	42,0	Presente

N° GEMARS	N° MCPAN	Data /Ano	ccc (cm)	Úmero
113	763	1997	39,0	Presente
114	779	1997	39,0	Presente
115	762	1997	33,0	Presente
116	767	1997	39,0	Presente
117	979	1997	40,0	Presente
118	995	1997	35,0	Presente
120	978	1997	36,0	Presente
122	985	1997	38,5	Presente
125	982	1997	43,0	Presente
126	-	1997	-	Ausente
127	984	1997	43,5	Presente
128	980	1997	40,0	Presente
129	986	1997	40,5	Presente
130	996	1997	36,0	Presente
131	987	1997	37,0	Presente
133	1044	1997	29,0	Presente
134	988	1997	40,0	Presente
135	983	1997	40,0	Presente
136	1043	1997	48,0	Presente
137	770	1997	33,0	Presente
138	773	1997	41,5	Presente
139	764	1997	-	Presente
146	765	1998	34,5	Presente
147	955	1998	40,0	Presente
148	959	1998	39,0	Presente
149	960	1998	38,5	Ausente
150	775	1998	38,0	Presente
152	780	1998	40,0	Presente
163	957	1998	37,0	Presente
164	1038	1998	38,0	Presente
169	-	1999	42,5	Presente
171	963	1999	35,0	Presente
172	962	1999	35,0	Presente
174	1075	1999	42,0	Presente
176	958	1999	43,0	Presente
181	-	2000	40,0	Ausente
182	-	2000	-	Ausente

Nº GEMARS	Nº MCPAN	Data /Ano	ccc (cm)	Úmero
185	-	2000	-	Ausente
200	975	2000	45,5	Presente
204	1060	2000	38,5	Presente
237	-	2002	35,0	Presente
238	-	2002	40,0	Ausente
239	-	2002	45,0	Ausente
240	-	2002	38,0	Ausente
241	-	2002	38,5	Ausente
242	-	2002	34,0	Ausente
243	-	2002	35,	Ausente
252	-	2002	52,0	Presente
253	-	2002	37,4	Presente
256	-	2002	38,2	Presente
258	-	2002	51,2	Presente
259	-	2003	43,5	Presente
262	-	2003	45,5	Presente
263	-	2003	40,0	Presente
267	-	2003	-	Presente
268	-	2003	-	Ausente
269	-	2003	41,6	Presente
273	-	2003	40,3	Presente
275	-	2003	35,2	Presente
276	-	2003	36,2	Presente
278	-	2003	39,9	Presente
279	-	2003	45,0	Presente
281	-	2003	40,5	Presente

Anexo II – Fórmulas de preparo das soluções utilizadas na análise histológica

- Fórmula de preparo de Formalina 10%

Formol 40% 10 ml
Água destilada..... 90 ml

- Fórmula de preparo de Formalina 4%

Formol 40% 4 ml
Água destilada..... 96 ml

- Fórmula de preparo de Ácido Clorídrico (Fonte: BEHMER *et al.*, 1976)

Ácido clorídrico 4 ml
Cloreto de sódio sol. aquosa saturada 100 ml
Água destilada 100 ml

- Fórmula de preparo de Ácido Fórmico (Fonte: BEHMER *et al.*, 1976)

Ácido fórmico 5-10 ml
Aldeído fórmico (37 a 40%) 5 ml
Água destilada 100 ml

- Fórmula de preparo de Ácido Nítrico 5% (Fonte: BEHMER *et al.*, 1976)

Ácido nítrico 5 ml
Água destilada 95 ml

- Fórmula de preparo Albumina de ovo de Mayer (Fonte: BEHMER *et al.*, 1976)

Clara de ovo “batida em neve” 50 ml
Glicerina 50 ml

Misturar bem e filtrar em papel-filtro. Adicionar cristais de timol como conservante.

- Fórmula de preparo Hematoxilina de Harris (Fonte: BEHMER *et al.*, 1976)

Hematoxilina cristalizada	5 g
Álcool 95%	100 ml
Sulfato de alumínio e amônio (alume amoniacal ou de potássio)	20 g
Água destilada	1000 ml
Ácido acético	2-4 ml
Óxido de mercúrio (vermelho)	3 g

Dissolver a Hematoxilina no álcool. Dissolver o sulfato em água quente. Juntar as duas soluções, ferver rapidamente e juntar o óxido de mercúrio, fervendo novamente a solução, até ela tornar-se de cor vermelho-escuro. Esfriar rapidamente e, adicionar o ácido acético. Filtrar antes do uso.

- Fórmula de preparo Eosina (Fonte: BEHMER *et al.*, 1976)

Eosina	10 g
Água destilada	100 ml

Triturar em um molar e ir adicionando água destilada até completa dissolução.

Solução de uso:

Solução de estoque 10%	10 ml
Álcool 95%	100 ml

- Fórmula de preparo Hematoxilina de Ehrlich (Fonte: BEHMER *et al.*, 1976)

Hematoxilina cristalizada	2 g
Álcool absoluto	100 ml
Sulfato de alumínio e potássio ou de amônio (alume de potássio)	3 g

Água destilada	100 ml
Ácido acético glacial	10 ml
Glicerina	100 ml

Dissolver a Hematoxilina em 10 ml de álcool e adicionar o ácido acético. Dissolver separadamente a glicerina no restante do álcool absoluto. Misturar as duas soluções. Dissolver o sulfato de potássio ou de amônio em água destilada quente. Esfriar e misturar com a solução de Hematoxilina. Expor à luz, em ambiente quente, ocasional agitação facilita a oxidação. Esta solução está pronta para uso quando se tornar cor vinho do porto.