



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CAMILA SATIE SAVADA

**“ANÁLISE GENÉTICA E DETERMINAÇÃO DOS
HAPLÓTIPOS DE *CHELONIA MYDAS* (LINNAEUS, 1758)
(TESTUDINES: CHELONIIDAE) RESGATADOS NO LITORAL
DO PARANÁ”**



Universidade Estadual de Londrina
Instituto Agrônomo do Paraná
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Camila Satie Savada

“Análise genética e determinação dos haplótipos de *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) (Testudines: Cheloniidae) resgatados no litoral do Paraná”

Londrina
2017

CAMILA SATIE SAVADA

**“ANÁLISE GENÉTICA E DETERMINAÇÃO DOS
HAPLÓTIPOS DE *CHELONIA MYDAS* (LINNAEUS, 1758)
(TESTUDINES: CHELONIIDAE) RESGATADOS NO LITORAL
DO PARANÁ”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Dra. Fernanda Simões de Almeida

Coorientadora: Dra. Camila Domit

Londrina
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Savada, Camila Satie.

Análise genética e determinação dos haplótipos de *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) (Testudines: Cheloniidae) resgatados no litoral do Paraná / Camila Satie Savada. - Londrina, 2017.
45 f. : il.

Orientador: Fernanda Simões de Almeida.

Coorientador: Camila Domit.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Tartaruga verde - Tese. 2. DNA mitocondrial - Tese. 3. Diversidade genética - Tese. I. Almeida, Fernanda Simões de . II. Domit, Camila. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. IV. Título.

CAMILA SATIE SAVADA

**ANÁLISE GENÉTICA E DETERMINAÇÃO DOS HAPLÓTIPOS DE
CHELONIA MYDAS (LINNAEUS, 1785) (TESTUDINES:
CHELONIIDAE) RESGATADOS NO LITORAL DO PARANÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Fernanda Simões de Almeida
Universidade Estadual de Londrina

Profa. Dra. Thaís Pires Miranda
Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Ana Paula Frederico Rodrigues
Loureiro Bracarense
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 24 de fevereiro de 2017.

Dedico aos meus pais, que durante toda a minha vida me deram o que há de melhor, mostrando o verdadeiro significado de amor, respeito, carinho, justiça e agora saudade.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Londrina e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular por contribuírem na minha formação acadêmica durante a graduação e o mestrado. Incluindo todos os professores, técnicos e servidores dos departamentos que fizeram parte dessa caminhada e possibilitaram a realização desse trabalho.

À CAPES pela concessão da bolsa e pelo apoio financeiro durante o período do mestrado.

À minha orientadora Doutora Fernanda Simões de Almeida, por ter me acolhido durante a graduação e me deixado ficar todos esses anos. Sou eternamente grata pela confiança e profissionalismo em todos os trabalhos realizados e pela paciência e carinho durante esses quase cinco anos. Pelos momentos de apoio nas horas de desespero, pela oportunidade em mim confiada ou pela simples parceria. Muito obrigada, Fer!

À Doutora Thaís Pires Miranda e à Doutora Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense por terem aceitado o convite de participação e avaliação da dissertação, bem como pela disponibilidade e recomendações feitas ao trabalho. E também à Doutora Ana Paula Vidotto Magnoni e ao Doutor Rogério Fernandes de Souza, que aceitaram o convite de membros suplentes e contribuíram com ótimas correções e sugestões na banca de qualificação.

À minha coorientadora Doutora Camila Domit, por ter aceitado esse trabalho em conjunto, permitindo que esse trabalho fosse realizado, mesmo com toda a distância e falta de experiência. Obrigada pela paciência, respostas para as minhas dúvidas e informações importantíssimas. Assim como todos que fazem parte do LEC, muito obrigada pela parceria.

À Doutora Sílvia Helena Sofia, minha segunda chefe do laboratório, que por consideração me guiou e esteve presente em muitos momentos. Agradeço por todo o carinho e atenção que teve comigo durante esses anos.

Aos membros do LAGEA, aqueles que estavam quando eu entrei, que apenas passaram por lá e aos que estão presentes atualmente. Aqueles que devido a convivência se tornaram companheiros e amigos. Obrigada por toda a ajuda nos procedimentos práticos e conceitos teóricos; cada um de vocês me ensinou uma parte do que eu sei hoje, seja nos resultados certo ou nos momentos de correções

dos errados.

Àqueles que Cornélio reuniu em uma caixinha e mandou de presente para mim. Os amigos dos amigos, que hoje considero meus amigos, Raul e Gazal muito obrigada pela parceria em muitos momentos e todos os ensinamentos da zoologia e da microbiologia. E aos meus dois grandes companheiros e amigos desses últimos anos, a convivência diária, muitas vezes de mais de 12 horas seguidas, nos fez um trio simplesmente inseparável... Carol e Wilson, que sempre querem cuidar de mim só porque eu sou a menor, mandam notícias não importa em que cidade estejam, solucionam muitos dos problemas de forma intuitiva e são super ágeis quando se tratam de baratas. Torno público todo o meu agradecimento, carinho e admiração que se tornou enorme durante os nossos momentos mais difíceis e nos mais simples detalhes do dia a dia, saibam que vocês sempre estarão comigo, no mesmo degrau, onde quer que nós estejamos!

Às minhas Migs da graduação, às companheiras do mestrado e a todos os amigos, passamos por muitas coisas juntas e sei que sempre posso contar com vocês. Agradeço por terem compartilhado comigo as mesmas aulas, provas, disciplinas, seminários, viagens, trabalhos, conversas nos corredores e confraternizações com comida.

Sou eternamente grata à minha grande família composta por avós/tios/primos maravilhosos que eu nunca trocaria por nada. Mas principalmente aos meus amados pais e irmão, eles que me deram condições para todas as minhas conquistas e realizações pessoais e profissionais. Agradeço por todos os momentos de amor, conselhos, ensinamentos e alegria; e todas as horas que se privaram de coisas para poder garantir o meu futuro. Vocês serão sempre o meu porto seguro em todos os momentos fáceis e difíceis, amo vocês sempre e para sempre onde quer que vocês estejam, seja na distância de um abraço ou de um céu estrelado.

E por fim, agradeço à Deus por ter me dado essa oportunidade e por ter colocado cada um de vocês no meu caminho direta ou indiretamente durante esse período tão enriquecedor e importante da minha vida. Todos com certeza merecem minha gratidão, com um lugarzinho no meu coração e uns tijolinhos no céu. Que Deus continue abençoando e cuidando de cada um de vocês!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”

Madre Teresa de Calcutá.

AVADA, C. S. **Análise genética e determinação dos haplótipos de *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1785) (Testudines: Cheloniidae) resgatados no litoral do Paraná.** 2017. 45 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

Atualmente, são descritas sete espécies de tartarugas marinhas com distribuição circumblobal, que migram grandes distâncias entre as regiões de alimentação e nidificação. *Chelonia mydas*, também conhecida como tartaruga verde, é uma das cinco espécies que ocorrem no litoral do Brasil. São animais herbívoros que possuem regiões de desova e alimentação no litoral, sendo altamente influenciados pela ação antrópica, como a perda de habitat, poluição e captura acidental em redes de pesca. A região do litoral do estado do Paraná é identificada como uma das regiões de alimentação para essa espécie no Atlântico Sul. Esse trabalho tem como objetivo identificar a diversidade genética de *C. mydas*, definindo os haplótipos que ocorrem na região e comparando com outras regiões de alimentação descritas para o oceano Atlântico. As amostras foram coletadas entre os anos de 2007 a 2014. Foram analisadas 285 amostras, com média de CCC (Comprimento Curvilíneo da Carapaça) de 30,65 cm. Através da amplificação de um fragmento da região controle do DNAm foram identificados doze haplótipos, sendo o haplótipo CM-A8 o mais frequente (195 indivíduos). Dez haplótipos ocorreram com frequência menor que 5%, incluindo os haplótipos CM-A23 e CM-A32 observados uma única vez. Resultados da AMOVA (Análise de Variância Molecular) mostram maior diferença entre os dois grupos principais das populações (Atlântico Norte e Atlântico Sul) quando comparados com as distâncias entre as populações dentro dos grupos. Além disso, considerando os valores de F_{ST} e Φ_{ST} o Paraná possui valores significativos para a maioria das comparações, incluindo todas as áreas da região do Atlântico Norte. A frequência dos haplótipos e os valores de divergência genética destacam as peculiaridades do grupo de indivíduos que formam o estoque misto presente no litoral do Paraná e que sofrem a influência das correntes oceânicas e mudanças climáticas. Com isso, informações obtidas referentes a utilização da área de alimentação do litoral do Paraná pelas tartarugas verdes, confirmam a importância da preservação desse local para manter a diversidade genética das populações e possibilitar a utilização dessas informações para a elaboração de futuros planos de manejo.

Palavras-chave: Tartaruga verde. DNA mitocondrial. Diversidade genética.

SAVADA, C. S. **Genetic analysis and determination of *Chelonia mydas* haplotypes (Linnaeus, 1785) (Testudines: Cheloniidae) rescued on the coast of Paraná.** 2017. 45 p. Dissertation (Master's Degree in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

Currently, there are seven species of marine turtles with circumglobal distribution, which migrate great distances between feeding and nesting regions. *Chelonia mydas*, also known as green turtle, is one of five species that occur on the coast of Brazil. They are herbivorous animals that have rookies and feeding regions, being highly influenced by anthropic action, such as loss of habitat, capture and accidental capture in fishing nets. The region of the coast of Paraná is identified as a feeding region of this species in the South Atlantic. This work aims to identify a genetic diversity of *C. mydas*, defining the haplotypes that occur in the region and comparing with other regions described for the Ocean Atlantic. The samples were collected between the years 2007 and 2014. We analyzed 285 samples, with an average of CCL (Curvilinear Carapace Length) of 30.65 cm. Through the amplification of a fragment control region of the mtDNA, the haplotypes were identified, being the haplotype CM-A8 the most frequent (195 individuals). Ten haplotypes occurred with frequency less than 5%, including CM-A23 and CM-A32 haplotypes with only one sample. Results of the AMOVA (Molecular Variance Analysis) show greater difference between the two main groups of populations (North Atlantic and South Atlantic) when compared to the distances between populations within the groups. In addition, considering the values of F_{ST} and Φ_{ST} Paraná has significant values for most comparisons, including all areas of the North Atlantic region. The frequency of the haplotype and the values of genetic divergence highlight the peculiarities of the group of individuals that form the mixed stock present in coast of Paraná and that suffer the influence of ocean currents and climatic changes. Thus, information related to the use of the feeding area of coast of Paraná by green turtles confirms the importance of preserving this region to maintain the genetic diversity of the populations and to enable the use of this information for the elaboration of future management plans.

Keywords: Green turtle. Mitochondrial DNA. Genetic diversity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Exemplar de *Chelonia mydas* (tartaruga verde), características morfológicas externa. Fonte: Paula Nassar.....8
- Figura 2** - Mapa do litoral do estado do Paraná (Brasil), com a identificação dos locais de coleta. IL: Ilhas; PA: Paranaguá; PP: Pontal do Paraná; MA: Matinhos; GU: Guaratuba. Fonte: Laboratório de Ecologia e Conservação de Mamíferos e Tartarugas Marinhas (LEC/CEM-UFPR).
17
- Figura 3** - Número de indivíduos de cada haplótipo por ano de coleta.....23
- Figura 4** - Rede de haplótipo para as amostras de *C. mydas*. Tamanho dos círculos são proporcionais à frequência dos haplótipos e o número de mutações é representado entre parênteses quando o valor é maior que uma mutação. Barra indica a inserção/deleção de 4 pb para o haplótipo CM-A42. 24

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Estudos realizados nas áreas de alimentação do oceano Atlântico. N = Número de indivíduos. 11
- Tabela 2** - Número de indivíduos de acordo com o local e ano de coleta..... 16
- Tabela 3** - Código de decomposição, características e uso das amostras adaptado de mamíferos marinhos para tartarugas marinhas relacionado apenas ao estudos de DNA de acordo com Geraci e Lounsbury (2005)..... 18
- Tabela 4** - Número de indivíduos de acordo com o tipo de tecido e estágio de decomposição. 22
- Tabela 5** - Identificação dos sítios variáveis para os haplótipos encontrados entre as amostras de *Chelonia mydas*. 22
- Tabela 6** - Número de indivíduos de cada haplótipo em cada ano de coleta. 23
- Tabela 7** - Número de indivíduos por haplótipo, diversidade haplotípica (h) e diversidade nucleotídica (π) de parte da Região Controle do DNAm_t de *C. mydas* presentes em diferentes regiões de alimentação do oceano Atlântico. CN = Carolina do Norte; FL = Flórida; BH = Bahamas; NI = Nicarágua; BB = Barbados; CV = Cabo Verde; AL = Almofala; FN = Fernando de Noronha; AR = Atol das Rocas; BA = Bahia; ES = Espírito Santo; UB = Ubatuba; PR = Paraná; IA = Ilha do Arvoredo; PC = Praia do Cassino; RP = Rio da Prata; ER = El Rincón; N = Número de amostras; N^o hap = Número de haplótipos; h = Diversidade haplotípica; π = Diversidade nucleotídica; Desvio padrão identificado entre parênteses. 25
- Tabela 8** - Valores da AMOVA de acordo com as áreas de alimentação descritas para o oceano Atlântico, considerando diferenças entre os grupos, entre as populações dentro dos grupos e entre populações. 26
- Tabela 9** - F_{ST} de acordo com a frequência dos haplótipos e Φ_{ST} seguindo os parâmetros de distância genética de Kimura 2P entre as áreas de alimentação do oceano Atlântico descritas para *C.*

mydas. F_{ST} na base da tabela e Φ_{ST} na posição superior da tabela, com valores em negrito com * indicando valores significativos ($P \leq 0.05$). CN = Carolina do Norte; FL = Flórida; BH = Bahamas; NI = Nicarágua; BB = Barbados; CV = Cabo Verde; AL = Almofala; FN = Fernando de Noronha; AR = Atol das Rocas; BA = Bahia; ES = Espírito Santo; UB = Ubatuba; PR = Paraná; IA = Ilha do Arvoredo; PC = Praia do Cassino; RP = Rio da Prata; ER = El Rincón.....27

Tabela 10 - Valores da AMOVA das amostras do litoral do Paraná de acordo com os anos de coleta28

Tabela Suplementar 1 - Informações das amostras de *C. mydas* coletadas no litoral do estado do Paraná utilizadas para as análises dos resultados. Id = Identificação da amostra; CCC = Comprimento Curvilíneo da Carapaça; NI = Não identificado..... 39

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	2
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1	SISTEMÁTICA E BIOLOGIA DAS TARTARUGAS MARINHAS.....	4
2.2	AÇÃO ANTRÓPICA E CONSERVAÇÃO DAS TARTARUGAS MARINHAS.....	6
2.3	CHELONIA MYDAS.....	7
2.4	DIVISÕES BIOGEOGRÁFICAS E ECORREGIÕES MARINHAS	9
2.5	LITORAL DO ESTADO DO PARANÁ	12
2.6	DNA MITOCONDRIAL	13
3	OBJETIVOS	15
4	MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1	COLHEITA DE AMOSTRAS	16
4.2	EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO	18
4.3	AMPLIFICAÇÕES E SEQUENCIAMENTO.....	19
4.4	ANÁLISES GENÉTICAS E ESTATÍSTICAS	20
5	RESULTADOS	22
6	DISCUSSÃO	29
7	CONCLUSÃO GERAL	32
8	REFERÊNCIAS	33

1 INTRODUÇÃO

Sendo mais frequente a ocorrência em regiões tropicais e subtropicais, as tartarugas marinhas possuem adaptações que possibilitam a sobrevivência no mar, incluindo modificações morfológicas na carapaça e nas nadadeiras e alterações relacionadas à fisiologia, como por exemplo, a secreção de sal, respiração, orientação, entre outros. Possuem a capacidade de migrar longas distâncias entre as áreas de alimentação e nidificação, retornando à praia natal para a reprodução (MARCOVALDI; SANTOS; SALES, 2011). São representadas nas famílias Cheloniidae e Dermochelyidae, as quais diferem pela presença ou ausência de escudos epidérmicos na carapaça, respectivamente, incluindo as sete espécies de tartarugas marinhas conhecidas até o momento (SANCHES, 1999).

Classificada como uma das espécies da família Cheloniidae, *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1785) (Testudines: Cheloniidae) ou tartaruga verde apresenta quatro pares de placas laterais na carapaça com coloração verde-acinzentada, com apenas um par de escudos pré-frontais e quatro pares de escudos pós-orbitais. Possuem distribuição circumglobal e no Brasil suas principais áreas de desova são em ilhas oceânicas como, por exemplo, Ilha de Trindade, Atol das Rocas e Fernando de Noronha (MARCOVALDI; SANTOS; SALES, 2011).

Jensen, FitzSimmons e Dutton (2013) descrevem que, com base na diferenciação genética obtidas pelo DNA mitocondrial das áreas de nidificação é possível identificar a origem geográfica das tartarugas marinhas, sendo esta metodologia muito utilizada para análises de estoque misto de regiões de forrageamento. Com isso, as áreas de alimentação das tartarugas marinhas se caracterizam por serem áreas de estoque misto, formadas por indivíduos de diferentes populações de origem (NARO-MACIEL et al., 2016). Essas áreas são locais de extrema importância e que possibilitam trabalhos de análise do DNA mitocondrial com o intuito de se obter informações sobre os haplótipos de origem dos indivíduos e também sobre as rotas de migração realizadas por elas, resultando deste modo em um maior conhecimento e definindo possíveis planos de manejo que favoreçam a manutenção da diversidade dessa espécie (BOWEN; KARL, 2007). Alguns estudos que priorizam a caracterização e composição genética de estoques mistos de *C. mydas* em áreas de alimentação tem sido realizado, como os trabalhos desenvolvidos por Proietti et al. (2009) e Prosdocimi et al. (2012).

De acordo com Jordão et al. (2015), essa espécie é encontrada no litoral do estado do Paraná, na região do Complexo Estuarino de Paranaguá, mas utiliza esse local apenas como área de alimentação. Mesmo com a implementação de diversas interferências antrópicas nesta região, com a possível ocorrência de acidentes e captura acidental por redes de pesca, o aumento da poluição, entre outros (SANCHES, 1999).

Considerando a importância da área de alimentação para a manutenção das populações e com a possibilidade do estudo do DNAMt que permite a identificação dos haplótipos de cada indivíduo, este trabalho buscou realizar a caracterização genética de indivíduos de *C. mydas* coletados na região do litoral do estado do Paraná entre os anos de 2007 a 2014. Através do sequenciamento de parte da região controle do DNAMt, realizou-se a definição dos haplótipos presentes de acordo com o banco de dados *Archie Carr Center for Sea Turtle Research* (AACSTR; <http://accstr.ufl.edu/genetics.html>) e a comparação com os resultados de outras áreas de alimentação já publicadas para o oceano Atlântico.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SISTEMÁTICA E BIOLOGIA DAS TARTARUGAS MARINHAS

Atualmente, para a Ordem Testudines são identificadas duas linhagens principais, Pleurodira que retrai a cabeça horizontalmente e possuem aproximadamente 50 espécies e Cryptodira que os quais retraem a cabeça verticalmente com aproximadamente 200 espécies, nesse segundo grupo estão presentes as tartarugas marinhas (ZARDOYA; MEYER, 2001). As tartarugas marinhas são classificadas na superfamília Chelonioidea, na qual se encontra as duas famílias Cheloniidae e Dermochelyidae (KRENZ et al., 2005).

Baseados em estudos evolutivos da morfologia do esqueleto e características anatômicas, as primeiras tartarugas eram terrestres e só depois se adaptaram para ambientes aquáticos (RENOUS et al., 2007). Nessa transição de ambientes ocorreram pequenas modificações no casco e mudanças profundas nas nadadeiras, as quais são utilizadas para a natação e caminhada (PRITCHARD, 1997). Nas nadadeiras houve o alongamento das falanges e a fixação em uma matriz de tecido conjuntivo resistente, resultando em estruturas em forma de remo (MILTON; LUTZ, 2003).

Outras adaptações que as tartarugas marinhas apresentam estão relacionadas à salinidade, pressão, velocidade de correntes marinhas, tipos de sedimentos, controle de temperatura corporal e modificações na respiração, circulação e fisiologia osmótica (RENOUS et al., 2007). As tartarugas marinhas permanecem em áreas pelágicas e oceânicas no início da juventude formando berçários e posteriormente seguindo para área demersal e nerítica para desenvolvimento. Quando adultos permanecem em áreas de alimentação e inter-nidificação (MUSICK; LIMPUS, 1997). São mais ativas durante o dia e menos no período da noite (HAZEL; LAWLER; HAMANN, 2009).

Mesmo sendo predominantemente marinhas, as fêmeas voltam para a terra para a deposição de ovos (MILTON; LUTZ, 2003). Elas rastejam, cavam o ninho na areia com as nadadeiras traseiras, depositam os ovos recobrando-os com areia e retornam para a água. Durante o período de incubação, o ninho corre o risco de ser inundado (maré e chuva), de sofrer com erosão e esmagamento e de ser predado. Além disso, nesses animais o sexo dos filhotes é determinado pela temperatura do ninho, de tal modo que com temperaturas mais elevadas nascem mais fêmeas. Após o nascimento, os filhotes se guiam pela luz natural da lua em direção ao oceano,

sendo a iluminação artificial e a predação fatores de risco durante essa movimentação (ALLISON et al., 2009).

A maioria das espécies de tartarugas marinhas tem uma distribuição circumglobal, com presença em regiões de águas tropical e subtropical (JENSEN; FITZSIMMONS; DUTTON, 2013). As tartarugas marinhas possuem três importâncias principais: ecologicamente, possuem importante papel no ciclo de nutrientes, movendo compostos orgânicos das áreas de forrageamento para áreas de nidificação, que são mais pobres em nutrientes; economicamente, são atrações vinculadas ao turismo, os turistas podem ver as tartarugas na forma de monitoramento ou ajudar em investigações científicas; e culturalmente, sendo espécies incluídas no folclore de muitas culturas (ALLISON et al., 2009).

São excelentes navegadoras (MILTON; LUTZ, 2003), sendo o termo navegação definido pelos fisiologistas como a movimentação por percursos definidos baseados em pistas sensoriais de direção (HILL; WYSE; ANDERSON, 2012). Migram grandes distâncias entre as regiões de forrageamento e nidificação, sendo orientadas pelo campo magnético da Terra (ALCOCK, 2011). As fêmeas ao atingirem a maturidade se dirigem para o mesmo local onde nasceram para depositar os ovos (ALLISON et al., 2009). Essa tendência de permanecerem em sua área de origem ou retornarem à mesma região para se reproduzir é denominada como filopatria natal (HILL; WYSE; ANDERSON, 2012). Mantendo assim uma estrutura com troca genética materna bastante rara considerando estudo com *C. mydas* (Linnaeus, 1785) (Testudines: Cheloniidae), mas devido os diferentes locais de colonização são descritos eventos de infidelidade em relação à praia de nidificação (MEYLAN; BOWEN; AVISE, 1990).

São descritas sete espécies de tartarugas marinhas atuais: *Caretta caretta*, *Chelonia mydas*, *Natator depressus*, *Eretmochelys imbricata*, *Dermodochelys coriacea*, *Lepidochelys olivacea* e *Lepidochelys kempfi* (SANCHES, 1999). Essas espécies podem ser externamente identificadas pelos padrões de escalas da cabeça, a forma dos maxilares, número de garras nos pés e o padrão de palas na carapaça (WYNEKEN; WITHERINGTON, 2001). Elas são separadas em casca de couro (Família Dermodochelyidae), que inclui apenas a espécie *D. coriacea*, e em casca de disco (Família Cheloniidae), que inclui as outras seis espécies e que se separaram há aproximadamente 63 milhões de anos em duas tribos, a Chelonini (*C. mydas* e *N.*

depressus) e a Caretini (*L. olivacea*, *L. kempii*, *C. caretta* e *E. imbricata*) (JESEN; FITZSIMMONS; DUTTON, 2013).

2.2 AÇÃO ANTRÓPICA E CONSERVAÇÃO DAS TARTARUGAS MARINHAS

As interferências humanas, como por exemplo, as mudanças e perda de habitat, diversas fontes de poluição, emaranhamento, pesca e captura acidental (LUTCAVAGE et al., 1997), dificultam a sobrevivência das tartarugas marinhas em qualquer estágio do seu ciclo de vida. No Brasil os impactos antrópicos que se destacam são: ocupação do litoral de maneira irregular; abate e consumo de fêmeas e ovos; trânsito de veículos nas praias de desova; iluminação artificial e desorientação das fêmeas e filhotes nas áreas de desova; captura acidental em redes de pesca; presença de animais domésticos nas praias; poluição dos mares; trânsito de embarcações e extração mineral nas praias (SANCHES, 1999).

Ameaças identificadas também em outros estudos como nos casos de pesca acidental de tartarugas apresentado por Pupo, Soto e Hanazaki (2006) para a região da Ilha de Santa Catarina, casos que dependem muito do tipo da pesca, do local e do tempo de permanência da rede na água. Já o estudo de Bugoni, Krause e Petry (2001) relata uma alta frequência da presença de detritos antropogênicos em tartarugas e casos de óbitos de tartarugas verdes devido à poluição por plástico e óleo na região sul do Brasil. Outro trabalho realizado por Marcovaldi e Dei Marcovaldi (1999) descreve que as tartarugas verdes estão presentes em áreas de alta exposição e influência das atividades humanas devido a sua permanência em áreas de margens rasas onde está localizado também o tráfico de embarcações.

Devido a essas e outras informações e critérios atuais, seis das sete espécies de tartarugas marinhas estão classificadas em alguma categoria de ameaça pela IUCN (International Union for Conservation of Nature): Vulnerável (*C. caretta*, *D. coriacea* e *L. olivacea*); Em perigo (*C. mydas*); Criticamente em perigo (*E. imbricata* e *L. kempii*). E a *N. depressus* classificada como Dados insuficientes. Especificamente para *C. mydas*, Vulnerável de acordo com a Avaliação do Estado de Conservação (MARCOVALDI; SANTOS; SALES, 2011).

Considerando essa classificação, diferentes estudos tentam fornecer informações para a criação de planos de conservação para as espécies de tartarugas marinhas. Como, por exemplo, o trabalho de Wallace et al. (2011) que apresenta um sistema de portfólio que possui a avaliação baseada em pontuações

dos riscos e ameaças das populações, sendo possível a sua utilização para a análise e elaboração de projetos de conservação. Adicionalmente o Plano de ação nacional para a conservação das tartarugas marinhas propõe oito metas principais que tem como objetivo aprimorar as ações de conservação e pesquisas direcionadas as espécies que ocorrem no litoral do país, considerando metas relacionadas à pesca acidental, monitoramento de áreas de alimentação, reprodução e descanso das tartarugas marinhas, e obtenção de informações sobre as espécies (MARCOVALDI; SANTOS; SALES, 2011).

Cinco das sete espécies de tartarugas marinhas ocorrem no litoral brasileiro. Devido a sua presença em locais de litoral e utilização antrópica, e devido à ecologia migratória pelas diferentes regiões de alimentação e nidificação, todos os países devem manter e recuperar as unidades populacionais (MAURY, 2002). Com isso, foi criado pelo governo brasileiro, em 1980, o Programa de Conservação da Tartaruga Marinha Nacional do Brasil (Projeto TAMAR) vinculado ao IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente) (MARCOVALDI; DEI MARCOVALDI, 1999).

2.3 CHELONIA MYDAS

A família Cheloniidae tem algumas características exclusivas como um crânio muito forte, presença de palato secundário, uma ou duas garras em cada nadadeira e carapaça com placas córneas variáveis em número de acordo com a espécie. Atualmente está representada por *Chelonia* e mais quatro gêneros (SANCHES, 1999).

Também conhecida como tartaruga verde, *C. mydas* possui apenas um par de escamas pré-frontais enquanto as demais espécies possuem dois pares. E sua carapaça possui quatro pares de escudos laterais sendo que sua coloração muda de acordo com a idade do indivíduo, de oliva a verde-cinza com possíveis manchas amarelas e marrons quando adultos (WYNEKEN; WITHERINGTON, 2001) (Figura 1).



Figura 1 - Exemplar de *Chelonia mydas* (tartaruga verde), características morfológicas externa. Fonte: Paula Nassar.

É a maior espécie de tartaruga da família Cheloniidae com a medida curvilínea média da carapaça de 120 cm de comprimento, com peso médio de 300 kg (MILTON; LUTZ, 2003), sendo comumente encontradas em profundidades de 20 m, mas com registros de até 110 m (SANCHES, 1999). Possuem um ciclo de vida longo com maturação sexual entre os 26 e 40 anos (DE PAULA ALMEIDA et al., 2011).

Quando filhotes são onívoros, às vezes carnívoros e tornando-se herbívoros quando juvenis e adultos, podendo também consumir salpas, águas-vivas, moluscos, esponjas e ovos de peixes (SANCHES, 1999). Devido a essa dieta em sua grande maioria herbívora e de baixa qualidade nutricional quando adultos, as tartarugas verdes possuem duas adaptações: a primeira é uma digestão eficiente devido à fermentação do alimento e a segunda é um padrão de forrageio seletivo da espécie consumida (BJORNDAL, 1982). Devido à necessidade de procura e consumo de alimentos, as tartarugas são mais ativas durante o dia apresentando mergulhos mais curtos e rasos devido ao aumento da atividade metabólica. No período da noite tornam-se menos ativas com mergulhos mais longos e profundos, os quais estão ligados a uma queda do metabolismo, o que representa um comportamento de descanso (MARCOVALDI; DEI MARCOVALDI, 1999).

Sua principal área de alimentação está nos trópicos e o maior sítio de nidificação no Brasil é a Ilha de Trindade (estado do Espírito Santo), sendo a espécie de maior ocorrência no litoral brasileiro quando considerados os registros “não reprodutivos” que inclui informações de tartarugas encontradas mortas, capturadas pela pesca, apreendidas, em cativeiro e de monitoramento de áreas de alimentação (SANCHES, 1999).

A Ilha de Trindade suporta a maior colônia de nidificação com a ocorrência de 5.000 fêmeas durante o período de desova, a qual pode ser bem utilizada para a pesquisa uma vez que a região é pouco perturbada devido à restrição de acesso público à ilha (MARCOVALDI; DEI MARCOVALDI, 1999). As suas principais áreas de desova no litoral brasileiro estão protegidas por Unidades de Conservação Federais (Reserva Biológica do Atol das Rocas e Parque Nacional Marinho de Fernando de Noronha) e uma Municipal (Ilha de Trindade) (DE PÁDUA ALMEIDA et al., 2011).

2.4 DIVISÕES BIOGEOGRÁFICAS E ECORREGIÕES MARINHAS

Devido à distribuição circumglobal e os padrões de migração das tartarugas marinhas, elas utilizam diferentes locais durante o ciclo de vida (MUSICK; LIMPUS, 1997). Essas regiões estão relacionadas aos territórios dos países e as definidas pela biogeografia, essa segunda que classifica a região costeira e as áreas de plataformas com o objetivo de melhorar os padrões de análises de biodiversidade marinha e futuros esforços de gestão e conservação de recursos marinhos (SPALDING et al., 2007).

Seguindo a classificação de Spalding et al. (2007), as maiores unidades espaciais são os reinos, que de acordo com conceitos terrestres inclui regiões costeiras, bentônica e pelágica, apresentando histórias evolutivas com níveis de endemismo. As províncias são grandes áreas que apresentam biotas distintas, mas que possuem alguma coesão em relação aos períodos evolutivos, são unidades coesivas susceptíveis, pois as espécies presentes podem ser móveis e dispersivas. E por último, as ecorregiões que tem a predominância de um conjunto específico e distinto de características topográficas e oceanográficas, formando unidades fortemente coesivas que podem abranger processos ecológicos ou espécies sedentárias.

As áreas de alimentação de tartarugas marinhas são formadas por animais de diferentes áreas de nidificação, denominadas como regiões de estoque misto (NARO-MACIEL et al., 2016). Considerando as regiões de alimentação já estudadas e descritas para *C. mydas* localizadas no oceano Atlântico, elas estão presentes em três reinos e oito províncias. Sendo as dezessete regiões de alimentação identificadas como: Carolina do Norte, Flórida, Bahamas, Nicarágua, Barbados, Cabo Verde, Almofala, Fernando de Noronha, Atol das Rocas, Bahia, Espírito Santo,

Ubatuba, Paraná, Ilha de Ascensão, Praia do Cassino, Rio da Prata e ÉI Rincon (BASS; LAGUEUX; BOWEN, 1998; LAHANAS et al., 1998; BASS; WITZELL, 2000; LUKE et al., 2004; BASS; EPPERLY; BRAUN-MCNEILL, 2006; NARO-MACIEL et al., 2007; MONZÓN-ARGUELLO et al., 2010; NARO-MACIEL et al., 2012; PROIETTI et al., 2012; PRODOSCIMI et al., 2012) (Tabela 1).

Relacionado apenas às áreas de alimentação do litoral do Brasil, essas regiões são influenciadas pelas correntes *Equatorial Atlantic*, *South Central Atlantic* e *Malvinas* (SPALDING et al., 2012). E especificamente o litoral do estado do Paraná, está localizado no reino *Temperate South America*, província *Warm Temperate Southwestern Atlantic* e ecorregião *Southeastern Brazil* (SPALDING et al., 2007), presente na transição entre o sudoeste do Atlântico tropical e temperado com influência das correntes quentes do Brasil com a fria das *Falkland/Malvinas* (MIRANDA; GENZANO; MARQUES, 2015).

Tabela 1 - Estudos realizados nas áreas de alimentação do oceano Atlântico. N = Número de indivíduos.

Reino	Província	Área de alimentação	Período do estudo	N	Autores do estudo
Temperate Northern Atlantic	<i>Warm Temperate Northwest Atlantic</i>	Carolina do Norte (CN)	Setembro a Dezembro de 1995 a 1997	106	Bass; Epperly; Braun-McNeill (2006)
	<i>Warm Temperate Northwest Atlantic</i>	Flórida (FL)	Fevereiro/1992 a Maio/1994	62	Bass; Witzell (2000)
Tropical Atlantic	<i>Tropical Northwestern Atlantic</i>	Bahamas (BH)	Setembro/1992	79	Lahanas et al. (1998)
	<i>Tropical Northwestern Atlantic</i>	Nicarágua (NI)	Março a Maio de 1994 e Outubro/1994	60	Bass; Lagueux; Bowen (1998)
	<i>Tropical Northwestern Atlantic</i>	Barbados (BB)	Março/1999 a Setembro/2000	60	Luke et al. (2004)
	<i>West African Transition</i>	Cabo Verde (CV)	2001, 2007 e 2008	44	Monzón-Arguello et al. (2010)
	<i>Tropical Southwestern Atlantic</i>	Almofala (AL)	Abril/2000 a Julho/2002 (exceto Setembro e Outubro de 2000)	117	Naro-Maciel et al. (2007)
	<i>Tropical Southwestern Atlantic</i>	Fernando de Noronha (FN)	Julho/2004 a Dezembro/2005	117	Naro-Maciel et al. (2012)
	<i>Tropical Southwestern Atlantic</i>	Atol das Rocas (AR)	Dezembro/2004 a Maio/2006	78	Naro-Maciel et al. (2012)
	<i>Tropical Southwestern Atlantic</i>	Bahia (BA)	Agosto/2003 a Outubro/2005	45	Naro-Maciel et al. (2012)
	<i>Tropical Southwestern Atlantic</i>	Espírito Santo (ES)	Julho/2004 a Novembro/2005	157	Naro-Maciel et al. (2012)
Temperate South America	<i>Warm Temperature Southwestern Atlantic</i>	Ubatuba (UB)	Julho/1998 a Fevereiro/2000 (exceto Novembro e Dezembro de 1999)	113	Naro-Maciel et al. (2007)
	<i>Warm Temperature Southwestern Atlantic</i>	Ilha do Arvoredo (IA)	Julho/2005 a Abril/2008	115	Proietti et al. (2012)
	<i>Warm Temperature Southwestern Atlantic</i>	Praia do Cassino (PC)	Janeiro/2005 a Maio/2007	101	Proietti et al. (2012)
	<i>Warm Temperature Southwestern Atlantic</i>	Rio da Prata (RP)	2004 a 2007	78	Prodoscimi et al. (2012)
	<i>Warm Temperature Southwestern Atlantic</i>	El Rincón (ER)	2004 a 2007	15	Prodoscimi et al. (2012)

2.5 LITORAL DO ESTADO DO PARANÁ

A Baía de Paranaguá encontra-se no litoral do estado do Paraná, na região sul do Brasil, sendo ela caracterizada como um sistema estuarino composto por dois principais corpos d'água: Baía de Paranaguá e Antonina, e Baía de Laranjeiras e Pinheiros. É conectado com o sistema da Baía de Iguape-Cananéia do estado de São Paulo e se liga ao mar aberto por três principais canais de maré. Possui uma área de aproximadamente 600 km² com um dos últimos remanescentes de Mata Atlântica sendo considerado pela UNESCO como um Patrimônio Mundial Natural (Natural World Heritage) (LANA et al., 2000). Nesta área estão presentes dois tipos principais de unidades de conservação: de uso restrito (Parque Nacional de Superagui) e de uso sustentável (Área de Proteção Ambiental de Guaraqueçaba) (GUEBERT-BARTHOLO et al., 2011).

É uma região classificada como um estuário parcialmente misto, que possui variação de salinidade e temperatura da água de acordo com os padrões de circulação e estratificação entre as estações do ano e por outros gradientes diferentes (LANA et al., 2000).

O clima da região depende da movimentação das massas do Atlântico Sul e da passagem de massas polares. A estação chuvosa se inicia no final da primavera e permanece até a maior parte do verão, e a seca ocorre durante o outono e inverno, mas é geralmente interrompida por um período chuvoso fraco e curto no início do inverno; sendo a precipitação três vezes maior na estação chuvosa (LANA et al., 2000). É uma área influenciada pelos fenômenos El Niño e La Niña, muito relacionados com a pluviosidade local (VANHONI; MENDONÇA, 2008).

As áreas estuarinas possuem grande importância pelo seu papel ecológico e pelo intenso uso humano, principalmente pela instalação de portos, moradias e pólos industriais. Esses locais favorecem essas implantações por serem regiões de áreas abrigadas que não têm influência direta como as regiões de mar aberto (LAMOUR; SOARES; CARRILHO, 2004). Com isso, em março de 1935 foi inaugurado oficialmente o Porto de Paranaguá, um dos principais pólos de exportação do país, que se tornou o sexto maior porto do mundo e o maior porto graneleiro da América Latina (DE MORAIS MACHADO, 2012).

Mesmo com a interferência antrópica da região do litoral do Paraná, como pela caça, exploração e extração de árvores e madeira, pesca e agricultura, ainda assim é possível encontrar diversos peixes, aves e mamíferos marinhos (LANA et al.,

2000). De acordo com estudos há a presença de algumas dessas espécies que utilizam o litoral do Paraná como área de alimentação, incluindo a *C. mydas* (GUEBERT-BARTHOLO et al., 2011). E devido a isso, essa acaba sendo acidentalmente capturada pelas redes de emalhar de pesca (LÓPEZ-BARRERA; LONGO; MONTEIRO-FILHO, 2012).

2.6 DNA MITOCONDRIAL

De acordo com Hartl e Clark (2010), o genoma mitocondrial consiste em uma molécula circular única com 15-20 kb de comprimento. Possui geralmente herança materna, ausência de recombinação e altas taxas evolutivas quando comparados ao genoma nuclear. Essas características tornaram o DNA mitocondrial (DNAMt) uma fonte importante para estudos evolutivos (MATIOLI; FERNANDES, 2012). Outras características importantes são as rápidas taxas evolutivas do DNAMt, que possui relaxamento da restrição funcional, uma alta taxa de mutação e ausência de histonas complexadas; sendo utilizado também em estudos como marcador filogenético microevolutivo (AVISE, 2000).

A diversidade é manifestada também no DNA dos organismos, determinadas por diferentes sequências em regiões particulares de uma molécula de DNA. No caso do DNAMt, a diversidade pode ser verificada pelo polimorfismo de tamanho em fragmentação de restrição (RFLP), polimorfismo de conformação em fita simples (SSCP) e sequenciamento (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008).

O sequenciamento do DNAMt tem a vantagem de ser uma técnica de amostragem não invasiva, que identifica as taxas de mutação e pode ser usado para estudo da linhagem feminina dos descendentes e seus padrões de migração. Porém, isso se torna uma desvantagem por apenas obter resultados baseados nas unidades maternas. Considerando todos esses pontos é um recurso muito utilizado na resolução de dúvidas taxonômicas, definição de unidades de manejo e obtenção de informações da biologia das espécies (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008).

Segundo Avise (2000), estudos realizados com tartarugas marinhas em suas rotas migratórias ou em áreas de alimentação ajudam a obter informações das suas áreas de nidificação, já que nesses locais estão reunidos indivíduos de múltiplas origens.

Diversos estudos prévios utilizaram o sequenciamento de regiões do DNAMt em tartarugas marinhas para obtenção de informações relativas à conservação das

espécies, como no estudo de Ng et al. (2014) com tartarugas verdes em Hong Kong; a relação da identificação de áreas de nidificação e áreas de migração exemplificado no estudo realizado por Prosdocimi et al. (2014) com tartarugas de couro da Argentina; estudo da composição genética, estrutura populacional e filogeografia da tartaruga cabeçuda com análises das hipóteses de colonização das áreas de nidificação brasileiras realizado por Reis et al. (2010a); casos de híbridos nas tartarugas de pente das regiões de nidificação do Brasil identificados por Lara-Ruiz et al. (2006); e como no estudo de Reis et al. (2010b) que analisa os movimentos de migração da tartaruga oliva pela costa brasileira.

Estudos sobre as diferenças das frequências dos haplótipos do DNAm_t em áreas de nidificação e áreas de alimentação são importantes, pois esses estudos possibilitam relacionar as áreas de alimentação com as áreas de origem dos indivíduos (BJORNDAL et al., 2006; BOWEN; KARL, 2007; PROSDOCIMI et al., 2015). Bem como auxiliam o levantamento de informações de comportamento migratório e permite definir planos para unidades de manejo relacionadas aos impactos de conservação (BOWEN; KARL, 2007).

3 OBJETIVOS

Tendo em vista a importância da obtenção de informações sobre a espécie *C. mydas* e de sua classificação na IUCN e na Avaliação do Estado de Conservação, o presente estudo tem como objetivo avaliar a diversidade genética dos indivíduos presentes na região de alimentação do litoral do estado do Paraná através da utilização do DNAm. E considerando isso pretende:

- Realizar análise e caracterização genética de *C. mydas* coletadas na região por meio da análise do DNAm.
- Levantar dados da literatura sobre haplótipos de *C. mydas* para as regiões de alimentação descritas para o oceano Atlântico.
- Identificar os haplótipos presentes no litoral do Paraná com base nos dados de literatura levantada e no banco de dados genético disponível *online*.
- Comparar as informações obtidas para o litoral do Paraná com os resultados já publicados de outras áreas de alimentação descritas para o oceano Atlântico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLHEITA DE AMOSTRAS

Durante o período de 2007 a 2014, 470 indivíduos de *C. mydas* foram encontrados mortos e encalhados, acidentalmente capturados em redes de pesca ou vivos, na região do litoral do estado do Paraná, pelo Laboratório de Ecologia e Conservação de Mamíferos e Tartarugas Marinhas (LEC), do Centro de Estudos do Mar (CEM) da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Os locais onde esses animais foram encontrados também foram registrados, sendo definidos como Guaratuba (GU), Ilhas (IL), Matinhos (MA), Paranaguá (PA), Pontal do Paraná (PP) e Não Identificados (NI) (Figura 2). Com o número de indivíduos de cada local de acordo com o ano de colheita identificados na Tabela 2.

Tabela 2 - Número de indivíduos de acordo com o local e ano de coleta.

Local	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
Guaratuba (GU)			1	2	1			
Ilhas (IL)	2	3	4	7	7	9	2	51
Matinhos (MA)		4	1	2	6	12	7	3
Paranaguá (PA)			1			5	11	
Pontal do Paraná (PP)	30	26	33	20	32	74	23	39
Não identificado (NI)	1	2	10	4	7	6	9	13
Total	33	35	50	35	53	106	52	106

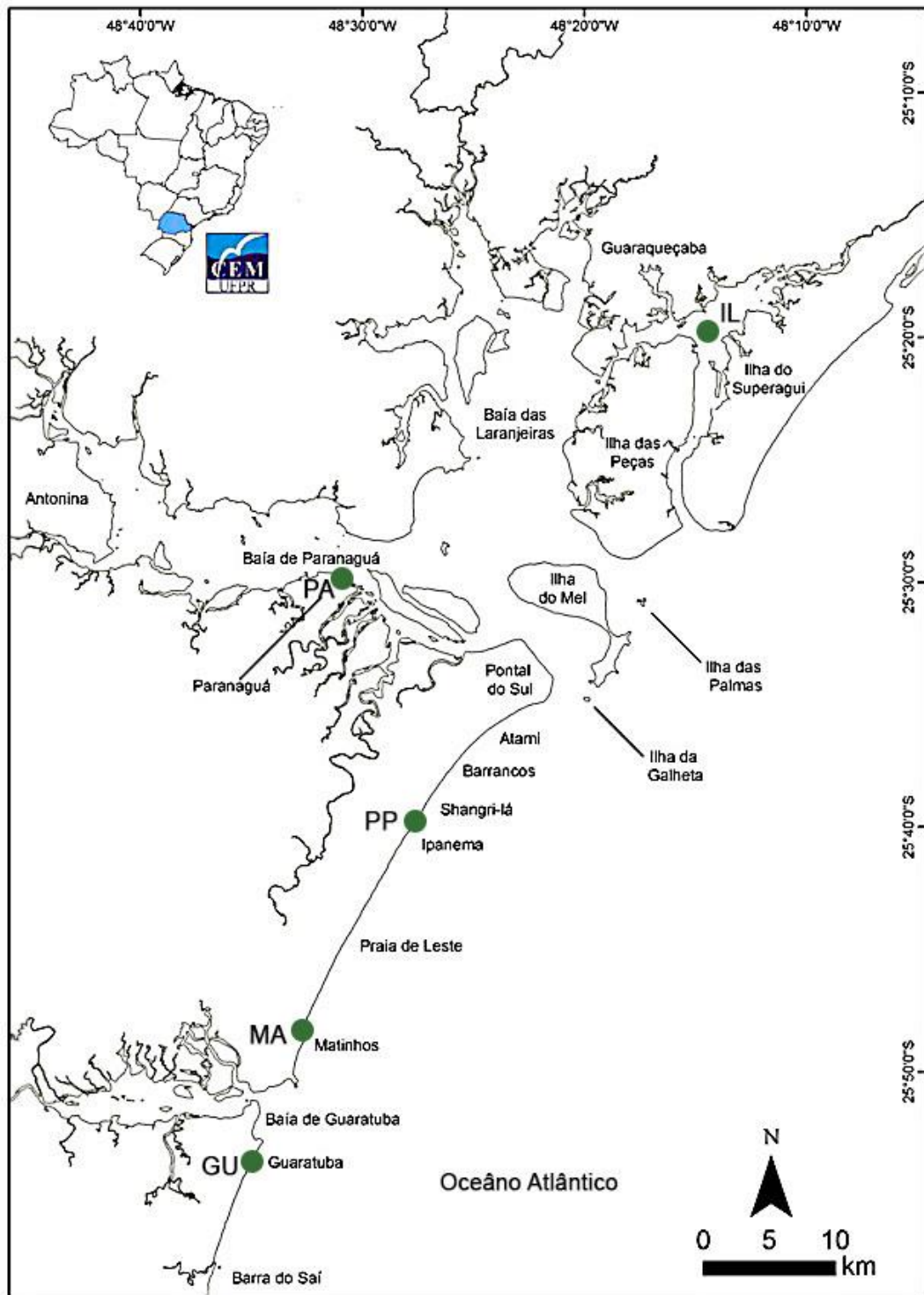


Figura 2 - Mapa do litoral do estado do Paraná (Brasil), com a identificação dos locais de coleta. IL: Ilhas; PA: Paranaguá; PP: Pontal do Paraná; MA: Matinhos; GU: Guaratuba. Fonte: Laboratório de Ecologia e Conservação de Mamíferos e Tartarugas Marinhas (LEC/CEM-UFPR).

Nos animais encalhados ou resgatados foram realizadas mensuração de comprimento curvilíneo da carapaça (CCC), que variou entre 30,0 e 54,5 cm; necropsia e colheita de tecido armazenado em etanol 100%, sendo o tipo de tecido retirado (fígado, músculo ou pele) de acordo com o estado de decomposição do animal. Conforme as condições dos animais encontrados, foi realizada a classificação de acordo com o código de decomposição, sendo que o código varia de 1 ao 5, com diferenças nas características e possíveis usos adaptado de mamíferos marinhos para uso em estudos com tartarugas (GERACI; LOUNSBURY, 2005) (Tabela 3).

Tabela 3 - Código de decomposição, características e uso das amostras adaptado de mamíferos marinhos para tartarugas marinhas relacionado apenas ao estudos de DNA de acordo com Geraci e Lounsbury (2005).

Código de decomposição	Características	Usos
1 (Vivo)	-	Análises de DNA
2 (Fresco)	Aparência normal, geralmente com pouco dano; Cheiro fresco; Músculos firmes; vísceras intactas e bem definidas	Análises de DNA
3 (Decomposto)	Carcaça intacta; Odor característico leve; Músculos moles e mal definidos; Vísceras moles, mas ainda intactas	Análises de DNA
4 (Decomposição avançada)	Carapaça pode estar intacta, mas já com danos; Forte odor; Músculos quase liquefeitos e facilmente rasgados; Vísceras frequentemente identificáveis, mas friáveis, facilmente rasgadas e difíceis de dissecar	Análises de DNA limitada
5 (Carcaça ou Mumificado)	Pele sobre o esqueleto quaisquer tecidos restantes são dessecados	Análises de DNA limitada

4.2 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

Para a extração do DNA genômico foram utilizadas amostras de fígado (18 indivíduos), músculos (284 indivíduos) e pele (168 indivíduos), seguiu o protocolo de extração de Fenol-Clorofórmio de Almeida, Fungaro e Sodré (2001). As amostras de tecidos foram cortadas e colocadas em microtubos contendo 500 µL de tampão de extração TE9+SDS (Tris-HCl pH 8,0 500 mM, EDTA 20 mM, NaCl 10 mM e 1% de SDS), e depois adicionados 5 µL de Proteinase K (20 µg/µL) e incubados *overnight* à 60-65°C para a digestão do material, conforme temperatura ótima da enzima.

O protocolo de lavagens durante a extração consistiu em três etapas: na primeira foi adicionado 500 µL de fenol, homogeneizado e centrifugado por 10 minutos a 12000 rpm em centrífuga refrigerada a 4°C; o sobrenadante foi transferido para um segundo microtubo ao qual foi adicionado 500 µL de clorofane (1 fenol:1 clorofil), seguindo o mesmo processo de homogeneização e centrifugação; novamente o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e adicionado clorofil (24 clorofórmio:1 álcool isoamílico) em um volume de 500 µL, homogeneizados e centrifugados. Para a precipitação do DNA o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, com a adição de 10% do volume de NaCl 3 M e 2 ½ volumes de etanol 100% gelado, invertidos delicadamente e mantidos em freezer -20°C por aproximadamente 2 horas.

Os microtubos foram centrifugados por 15 minutos a 12000 rpm a 4°C, seguido pelo descarte do sobrenadante e realizado uma segunda lavagem com 100 µL de etanol 70%, sendo este descartado logo em seguida. A secagem do álcool ocorreu em temperatura ambiente e o DNA foi diluído em 50 µL de TE (Tris-HCl pH 8,0 10 mM e EDTA 1 mM).

4.3 AMPLIFICAÇÕES E SEQUENCIAMENTO

A quantificação das amostras foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific), seguindo as especificações do fabricante. Quando necessário foi realizada a padronização das concentrações das amostras para aproximadamente 20 ng/µL de DNA.

A amplificação foi realizada com a utilização de um par de *primers* (LCM15382: 5'-GCTTAACCCTAAAGCATTGG-3' e H950: 5'-GTCTCGGATTTAGGGGTTTG-3') descritos para uma parte da Região Controle do DNA mitocondrial, que possui aproximadamente 880 pb, descrito por Abreu-Grobois et al. (2006). As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Multigene™ (Labnet International) com um volume total de 15 µL contendo: 1x de tampão de PCR, 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 0,5 µM de cada *primer*, 3 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen) e 5-50 ng de amostra de DNA. A amplificação foi realizada com uma desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos; seguido por 35 ciclos de 94°C por 40 segundos, 51°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto (correspondentes à desnaturação, pareamento dos *primers* e extensão); e uma extensão final de 9 minutos a 72°C.

Os produtos da amplificação foram verificados em gel de agarose 1% e aqueles que tiveram sucesso na amplificação foram selecionados para o sequenciamento. Destas amostras, 10 µL da reação foi purificada com 0,5 µL de ExoStar (Illustra) de acordo com as especificações do fabricante. O sequenciamento dos produtos das amplificações foi realizado com base na fita *forward* com os reagentes Big Dye Terminator (Applied Biosystems), seguindo as recomendações do fabricante para a utilização do protocolo de montagem da reação e protocolo de temperatura e tempo de amplificação. E posteriormente a leitura foi realizada em sequenciador automático ABI-PRISM 3500 XL (Applied Biosystems).

4.4 ANÁLISES GENÉTICAS E ESTATÍSTICAS

A análise inicial e verificação da qualidade das sequências foram realizadas com o *software online* Electropherogram Quality Analysis (TOGAWA; BRIGIDO, 2003). O alinhamento e a edição das sequências foram efetuados no programa MEGA6 (TAMURA et al., 2013), sendo utilizada uma região interna da Região Controle com aproximadamente 514 pb que é referente ao par de *primers* descrita por Lahanas et al. (1994), pois os bancos de dados possuem mais informações disponíveis referente a esse fragmento.

As amostras presentes nesse trabalho tiveram seus haplótipos identificados de acordo com banco de dados genéticos disponível *online* do grupo de pesquisa Archie Carr Center for Sea Turtle Research (ACCSTR; <http://accstr.ufl.edu/genetics.html>).

Para a comparação com outras regiões de alimentação do Atlântico foram considerados os resultados para o grupo do Atlântico Norte composto por dados da Carolina do Norte (CN, BASS; EPPERLY; BRAUN-MCNEILL, 2006), Flórida (FL, BASS; WITZELL, 2000), Bahamas (BH, LAHANAS et al., 1998), Nicarágua (NI, BASS; LAGUEUX; BOWEN, 1998), Barbados (BB, LUKE et al., 2004) e Cabo Verde (CV, MONZÓN-ARGUELLO et al., 2010). E para o grupo do Atlântico Sul formado pelas áreas de Almofala (AL, NARO-MACIEL et al., 2007), Fernando de Noronha (FN, NARO-MACIEL et al., 2012), Atol das Rocas (AR, NARO-MACIEL et al., 2012), Bahia (BA, NARO-MACIEL et al., 2012), Espírito Santo (ES, NARO-MACIEL et al., 2012), Ubatuba (UB, NARO-MACIEL et al., 2007), Paraná (PR), Ilha do Arvoredo (IA, PROIETTI et al., 2012), Praia do Cassino (PC, PROIETTI et al., 2012), Rio da Prata (RP, PRODOSCIMI et al., 2012) e El Rincón (ER, PROSDOCIMI et al., 2012).

Após a identificação das mutações individuais de cada uma das amostras, a diversidade haplotípica (h), a diversidade nucleotídica (π) e o número de haplótipos foi calculado no programa DnaSP 5.1 (LIBRADO; ROZAS, 2009). Posteriormente, foi realizada a construção da rede de haplótipos pelo programa Network 5.0.0.0 (<http://www.fluxus-engineering.com>). O F_{ST} foi calculado de acordo com a frequência dos haplótipos e Φ_{ST} seguindo os parâmetros de distância genética de Kimura 2P (KIMURA, 1980), bem como a análise da AMOVA (Análise da Variância Molecular) estimando a partição da variação genética entre as populações do oceano Atlântico e os grupos estipulados, com estimativas de significância em 5.000 permutações e $P \leq 0.05$ realizadas no programa Arlequin 3.5.2 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). A análise da AMOVA foi realizada também considerando apenas os indivíduos do litoral do Paraná separados pelos anos de coletas, com os mesmos critérios de estimativas.

O haplótipo mais frequente foi o CM-A8 com 195 indivíduos (69%), seguido pelo CM-A5 com 52 indivíduos (18%). Já os outros 10 haplótipos ocorrem em uma frequência menor que 5%, sendo que os haplótipos CM-A23 e CM-A32 que ocorreram apenas uma vez durante todos os anos (Tabela 6 e Figura 3).

Tabela 6 - Número de indivíduos de cada haplótipo em cada ano de coleta.

	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	Total
CM-A3			1			1			2
CM-A5		7	8	7	5	18	2	5	52
CM-A6				1	2	2	2		7
CM-A8	3	8	24	11	32	46	25	46	195
CM-A9		1				1	2	2	6
CM-A10	1							4	5
CM-A23		1							1
CM-A24			1	1			1	1	4
CM-A32		1							1
CM-A39					1	2			3
CM-A42						4	1	1	6
CM-A46					1		1	1	3
Total	4	18	34	20	41	74	34	60	285
Haplótipos	2	5	4	4	5	7	7	7	

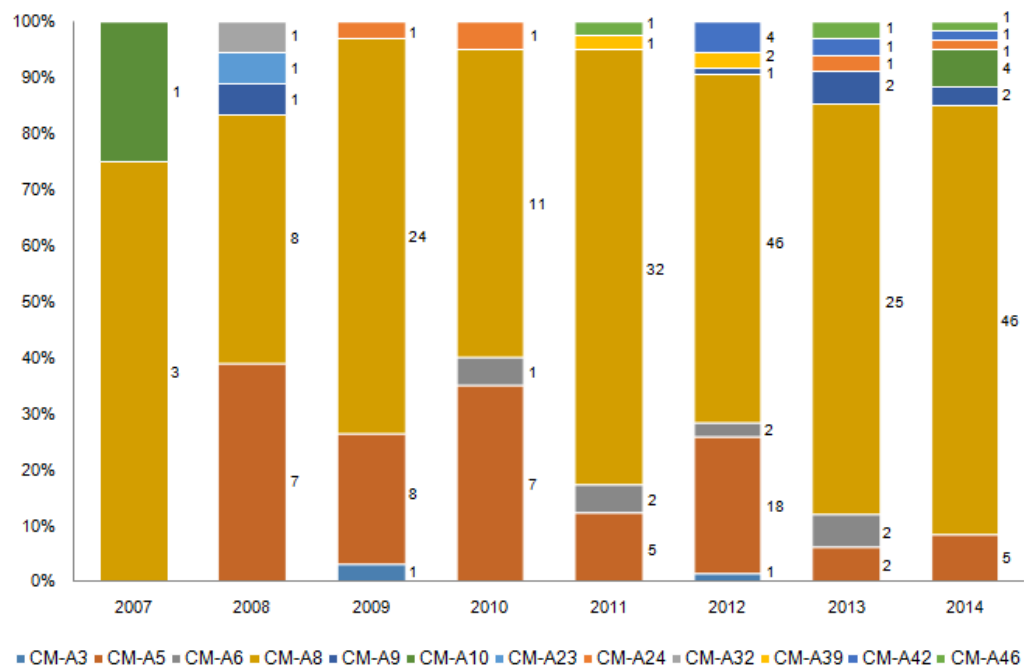


Figura 3 - Número de indivíduos de cada haplótipo por ano de coleta.

A relação proposta na rede de haplótipos confirma que a maioria dos haplótipos derivam do CM-A8 apresentando uma ou duas mutações de diferença, com exceção de CM-A42 que difere do CM-A8 devido a uma inserção/deleção de 4 pb (Figura 4). O haplótipo CM-A3 é o mais distante quando relacionado ao CM-A8, apresentando mais passos mutacionais, sendo um passo entre o haplótipo CM-A9, um entre um possível ancestral não amostrado e mais 6 passos até ele.

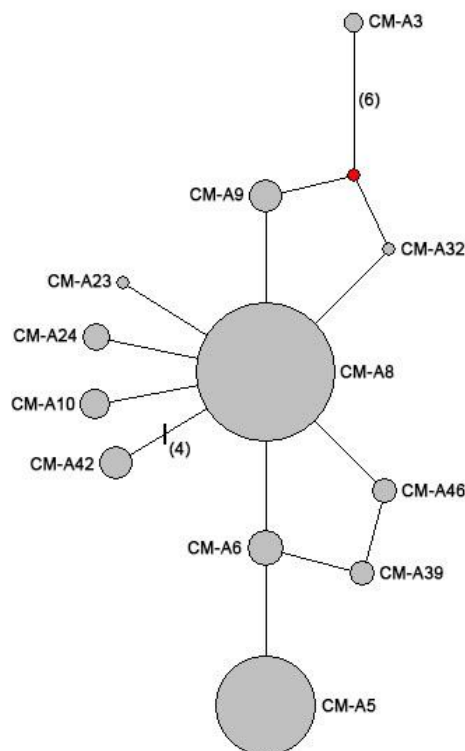


Figura 4 - Rede de haplótipo para as amostras de *C. mydas*. Tamanho dos círculos são proporcionais à frequência dos haplótipos e o número de mutações é representado entre parênteses quando o valor é maior que uma mutação. Barra indica a inserção/deleção de 4 pb para o haplótipo CM-A42.

A diversidade haplotípica (h) e nucleotídica (π) dos indivíduos foi de 0.469 ± 0.032 e 0.00189 ± 0.00020 , respectivamente (Tabela 7). Considerando as dezessete populações e os dois grandes grupos (Atlântico Norte e Atlântico Sul) das áreas de alimentação presentes no oceano Atlântico, os resultados da AMOVA indicam que a maior diferença está entre os grupos (64,56%), seguida pela diferença entre os indivíduos dentro das populações (27,48%) e por último, com a menor diferença, entre as populações dentro dos grupos (7,96%) (Tabela 8).

Tabela 7 - Número de indivíduos por haplótipo, diversidade haplotípica (h) e diversidade nucleotídica (π) de parte da Região Controle do DNAm de *C. mydas* presentes em diferentes regiões de alimentação do oceano Atlântico. CN = Carolina do Norte; FL = Flórida; BH = Bahamas; NI = Nicarágua; BB = Barbados; CV = Cabo Verde; AL = Almolfa; FN = Fernando de Noronha; AR = Atol das Rocas; BA = Bahia; ES = Espírito Santo; UB = Ubatuba; PR = Paraná; IA = Ilha do Arvoredo; PC = Praia do Cassino; RP = Rio da Prata; ER = El Rincón; N = Número de amostras; N° hap = Número de haplótipos; h = Diversidade haplotípica; π = Diversidade nucleotídica; Desvio padrão identificado entre parênteses.

	Atlântico Norte							Atlântico Sul											
	CN	FL	BH	NI	BB	CV	Total	AL	FN	AR	BA	ES	UB	PR	IA	PC	RP	ER	Total
CM-A1	34	12	2		7	1	56		2	1									3
CM-A2	2	1					3												
CM-A3	43	43	62	54	21	2	225	18	4	8		2	2	2	1				37
CM-A5	5	3	10	6	13	23	60	28	52	21	14	47	14	52	25	20	18	2	293
CM-A6						1	1	3	4	2	2	6		7	2	2	2		30
CM-A8	7		1		14	17	39	53	46	36	23	87	83	195	70	62	48	11	714
CM-A9					1		1	3	7	3	3	6	4	6	5	3	5		42
CM-A10					2		2	4	4	3		3	3	5	2	1		1	26
CM-A15	1						1												
CM-A16	2						2	1											1
CM-A17					1		1		1										1
CM-A18	3	2					5												
CM-A20			1				1												
CM-A21			3				3	1											1
CM-A22	2	1			1		4												
CM-A23									1		2	2		1	3	2			11
CM-A24								1	1		1	2	2	4	3	2	1		17
CM-A25																1			1
CM-A26	2						2												
CM-A27	2						2												
CM-A28	3						3												
CM-A32								1	1			2	2	1	1	3	2		13
CM-A36																2			2
CM-A39														3	1			1	5
CM-A42								2	1					6	1	1	2		13
CM-A44								1					1						2
CM-A45								1							1	2			4
CM-A46													1	3					4
CM-A55													1						1
N	106	62	79	60	60	44		117	117	78	45	157	113	285	115	101	78	15	
N° hap	12	6	6	2	8	5		13	11	7	6	9	10	12	12	12	7	4	
h	0.729 (0.030)	0.485 (0.067)	0.370 (0.065)	0.183 (0.062)	0.773 (0.028)	0.588 (0.045)		0.701 (0.032)	0.642 (0.027)	0.703 (0.037)	0.647 (0.053)	0.603 (0.00095)	0.446 (0.056)	0.469 (0.032)	0.572 (0.045)	0.561 (0.051)	0.537 (0.054)	0.467 (0.148)	
π	0.00530 (0.00078)	0.00331 (0.00103)	0.00642 (0.00113)	0.00381 (0.00129)	0.01027 (0.00036)	0.00419 (0.00107)		0.00655 (0.00073)	0.00415 (0.027)	0.00551 (0.00086)	0.00242 (0.00023)	0.00262 (0.00030)	0.00205 (0.00044)	0.00189 (0.00020)	0.00234 (0.00033)	0.00199 (0.00021)	0.00196 (0.00022)	0.00178 (0.00062)	

Tabela 8 - Valores da AMOVA de acordo com as áreas de alimentação descritas para o oceano Atlântico, considerando diferenças entre os grupos, entre as populações dentro dos grupos e entre populações.

AMOVA	
Entre grupos	27.48%
Entre populações dentro dos grupos	7.96%
Entre populações	64.56%

De acordo com as comparações entre todas as áreas de alimentação 102 de 151 comparações da análise do F_{ST} e 87 de 151 comparações do Φ_{ST} são estatisticamente significativas quando considerado o $P \leq 0.05$ (Tabela 9). E considerando as comparações do litoral do Paraná com as outras áreas de alimentação, ele possui um F_{ST} com valor não-significativo apenas para UB, IA, PC, RP e ER; já quando considerado o Φ_{ST} a comparação não-significativa é identificada com AR, UB, IA, PC, RP e ER

Tabela 9 - F_{ST} de acordo com a frequência dos haplótipos e Φ_{ST} seguindo os parâmetros de distância genética de Kimura 2P entre as áreas de alimentação do oceano Atlântico descritas para *C. mydas*. F_{ST} na base da tabela e Φ_{ST} na posição superior da tabela, com valores em negrito com * indicando valores significativos ($P \leq 0.05$). CN = Carolina do Norte; FL = Flórida; BH = Bahamas; NI = Nicarágua; BB = Barbados; CV = Cabo Verde; AL = Almofala; FN = Fernando de Noronha; AR = Atol das Rocas; BA = Bahia; ES = Espírito Santo; UB = Ubatuba; PR = Paraná; IA = Ilha do Arvoredo; PC = Praia do Cassino; RP = Rio da Prata; ER = El Rincón.

	CN	FL	BH	NI	BB	CV	AL	FN	AR	BA	ES	UB	PR	IA	PC	RP	ER
CN	-	0.04832*	-0.00590	0.03620*	0.23020*	0.73514*	0.57064*	0.73953*	0.64395*	0.76481*	0.79865*	0.77715*	0.83629*	0.78544*	0.78754*	0.78168*	0.72435*
FL	0.06507*	-	0.02679	-0.00617	0.35212*	0.81922*	0.66072*	0.81375*	0.73165*	0.86415*	0.87251*	0.86993*	0.90090*	0.87438*	0.88456*	0.87696*	0.83981*
BH	0.16787*	0.03877*	-	0.00809	0.20367*	0.67557*	0.52953*	0.70266*	0.59373*	0.70080*	0.76703*	0.73244*	0.81499*	0.74232*	0.73876*	0.72976*	0.63564*
NI	0.24401*	0.09810*	0.01343	-	0.30436*	0.76501*	0.61871*	0.77808*	0.68374*	0.80259*	0.83977*	0.82430*	0.87639*	0.83088*	0.83545*	0.82553*	0.75325*
BB	0.05503*	0.13103*	0.18186*	0.27902*	-	0.32753*	0.14645*	0.37235*	0.21585*	0.33626*	0.45238*	0.36539*	0.51753*	0.38581*	0.36448*	0.37134*	0.23391*
CV	0.27769*	0.43270*	0.48096*	0.59643*	0.12231*	-	0.09570*	-0.01396	0.05324*	-0.03035	0.00683	0.10847*	0.07009*	0.01205	-0.02966	0.00882	0.02874
AL	0.19327*	0.30512*	0.34087*	0.41797*	0.05419*	0.05428*	-	0.09228*	0.00343	0.08005*	0.11288*	0.05175*	0.10606*	0.05942*	0.03622*	0.07315*	0.02494
FN	0.26233*	0.39279*	0.42752*	0.50732*	0.11051*	-0.00940	0.03520*	-	0.04527*	-0.01836	0.00637	0.07376*	0.04556*	0.00570	-0.02287	0.00567	0.01804
AR	0.21361*	0.34459*	0.39034*	0.47796*	0.07083*	0.04290*	-0.00464	0.02490*	-	0.01993	0.04248*	-0.00866	0.01138	-0.01232	-0.04492	0.00477	-0.02642
BA	0.27135*	0.43090*	0.48707*	0.59264*	0.12351*	0.03327	0.01187	0.01563	-0.00308	-	-0.01482	0.09478*	0.03998*	0.01252	0.00529	0.00221	0.05780
ES	0.29830*	0.43096*	0.46541*	0.53585*	0.14773*	0.05119*	0.01908*	0.03136*	0.00717	-0.01064	-	0.05569*	0.01473*	-0.00353	-0.02433	-0.00942	0.00651
UB	0.37569*	0.52883*	0.57126*	0.64876*	0.24937*	0.21737*	0.08079*	0.16262*	0.07996*	0.07014*	0.05047*	-	0.01306	0.02195	0.01856	0.03656*	-0.02689
PR	0.37084*	0.49934*	0.52877*	0.58776*	0.23065*	0.16037*	0.06056*	0.12100*	0.05546*	0.03577*	0.02429*	0.00199	-	-0.00061	-0.00974	0.00147	-0.02318
IA	0.30735*	0.44978*	0.49191*	0.56738*	0.16606*	0.10014*	0.02736*	0.06917*	0.01869*	0.00168	0.00152	0.01657*	0.00203	-	-0.01648	-0.00680	-0.00842
PC	0.30733*	0.45348*	0.49871*	0.57670*	0.16984*	0.10955*	0.03076*	0.07657*	0.02421*	0.00696	0.00514	0.01275	0.00060	-0.00770	-	-0.01512	-0.00042
RP	0.31125*	0.46442*	0.51259*	0.59907*	0.16973*	0.09820*	0.02906*	0.06753*	0.01787	0.00010	-0.00047	0.01815	0.00160	-0.00851	-0.00799	-	0.00313
ER	0.32720*	0.51755*	0.59172*	0.73805*	0.19213*	0.17341*	0.04773	0.12119*	0.04583	0.03599	0.02207	-0.02901	-0.02327	-0.00950	-0.01212	-0.00494	-

Já considerando a ocorrência dos haplótipos em relação aos anos de coleta, observa-se que o ano de 2012 apresentou o maior número de amostras (n=74) com sete haplótipos encontrados e o ano de 2007 o menor número de amostras (n=4) com apenas dois haplótipos identificados (Tabela 6). De acordo com os valores da análise da AMOVA entre os anos a diferença foi de 3,44% e dentro do período total dos anos apresentam 96,56% (Tabela 10). Apenas o CM-A8 é encontrado em todos os anos com o maior número de indivíduos também em todos os anos. Há a ocorrência única dos haplótipos CM-A23 e CM-A32, que foram amostrados no ano de 2008.

Tabela 10 - Valores da AMOVA das amostras do litoral do Paraná de acordo com os anos de coleta

AMOVA	
Entre anos de coleta	3.44%
Dentro dos anos de coleta	96.56%

6 DISCUSSÃO

A determinação dos haplótipos em tartarugas tem sido utilizada para estudos relacionados às áreas de alimentação, local que segundo Naro-Maciel et al. (2016), é formado por um estoque misto (*mixed stocks*). Neste estudo dozes haplótipos foram identificados em tartarugas encontradas no litoral do estado do Paraná.

O estudo de Monzón-Argüello et al. (2010) confirma que as migrações dos indivíduos das regiões da América do Sul ocorram pelo oceano Atlântico Norte e Atlântico Sul, levantando a hipótese de que eles utilizam áreas de alimentação que são mais próximas as suas áreas de origem natal (*closest-to-home*). Esse comportamento de deslocamento para regiões próximas embasa a ocorrência do maior número de indivíduos pertencentes ao haplótipo CM-A8 na costa do Brasil e pode ser observada no presente estudo na região do litoral do Paraná que apresenta 69% desse haplótipo. Bjorndal et al. (2006) também descrevem uma maior presença do haplótipo CM-A8 em três áreas de nidificação descritas para o litoral do país, Ilha de Trindade, Atol das Rocas e Fernando de Noronha. Esse haplótipo tem ocorrência em regiões de nidificação da África de acordo com estudos de Formia et al. (2006).

As análises do F_{ST} e Φ_{ST} indicam que o litoral do Paraná possui valores significativos de diferenciação genética quando comparado com todas as áreas do grupo do Atlântico Norte, segundo a escala de Wright (1978) a maioria das comparações com diferença muito alta (de 0,25 a 1,00) ou alta (de 0,15 a 0,25). Mas considerando as áreas do Atlântico Sul possui valores significativos de F_{ST} para AL, FN, AR, BA e ES, e Φ_{ST} para AL, FN, BA e ES, valores com diferenciação genética moderada (de 0,05 a 0,15) e pequena (de 0 a 0,05) (HARTL; CLARK, 2010).

Os valores não-significativos obtidos quando comparados com áreas de alimentação mais próximas, podem ser resultado dos haplótipos que colonizaram as diferentes regiões já que Encalada et al. (1996) propõem que a origem das populações do Atlântico foi formada por dois clusters diferentes (Caribe Ocidental e Mediterrâneo, e Caribe Oriental, Atlântico Sul e África Ocidental). Considerando as áreas com distâncias mais próximas do estado do Paraná, Prosdocimi et al. (2012) no estudo nas regiões de alimentação da Argentina também apresentam que há diferença significativa dessas áreas quando comparadas a outras cinco áreas de alimentação do nordeste do Atlântico e com apenas uma de quatro áreas do sudoeste do Atlântico. De acordo com Proietti et al. (2012), as duas áreas de alimentação localizadas no Rio Grande do Sul também possuem diferença genética

quando comparadas as áreas do Atlântico Norte, mas não apresentam essa divergência em relação a Ubatuba e Atol das Rocas, ambas localizadas na costa brasileira. Assim como no presente estudo, ambos apresentando valores não-significativos quando comparados com as áreas de alimentação mais próximas das estudadas.

A maior diferença está entre os grupos do Atlântico Norte e Atlântico Sul (AMOVA entre grupos de 64,56%), e essa diferença pode estar relacionada com as distâncias entre essas áreas de alimentação e a influência das correntes marinhas, pois a corrente do Brasil forma uma frente direta com a água fria da corrente das Malvinas (TOMCZAK; GODFREY, 2003). Isso pode interferir na composição do estoque misto na região de alimentação, já que mudanças de local de alimentação para as tartarugas verdes foram descritas por Carman et al. (2012), que identificou que durante o verão e outono indivíduos permanecem na costa da Argentina e Uruguai, e no inverno migram para o sul do Brasil onde as águas são mais quentes.

Considerando os dez haplótipos identificados com baixa frequência no estudo (CM-A3, CM-A6, CM-A9, CM-A10, CM-A23, CM-A24, CM-A32, CM-A39, CM-A42 e CM-A46) eles também ocorrem em menor frequência nos trabalhos previamente realizados no litoral do Brasil ($\leq 16\%$) (NARO-MACIEL et al., 2007; NARO-MACIEL et al., 2012; PROIETTI et al., 2012; JORDÃO et al., 2015). Levando em consideração os valores de h e π , o litoral do Paraná apresenta resultados próximos às outras áreas de alimentação de todo o Atlântico.

Em trabalho realizado na região entre 2005 a 2008 por Jordão et al. (2015), seis haplótipos são encontrados em ambos os trabalhos, seis novos haplótipos foram identificados para a região (CM-A3, CM-A9, CM-A23, CM-A24, CM-A39, CM-A42), e apenas um não foi amostrado novamente (CM-A1). Observando certa estabilidade na ocorrência dos indivíduos de diferentes haplótipos na região, mas com um aumento no número de haplótipos encontrados no período desse trabalho.

Considerando apenas os indivíduos do Paraná por anos de coleta (Tabela 6 e Figura 3), podemos observar que há peculiaridades, como por exemplo, a presença do CM-A8 em todos os anos, um segundo haplótipo mais frequente com a ocorrência em todos os anos exceto 2007 (CM-A5) e a baixa ocorrência (menor que 5%) de dez haplótipos. Nota-se que três haplótipos ocorreram mais no litoral do Paraná do que em todas as outras áreas de alimentação descritas para o oceano Atlântico, em destaque o haplótipo CM-A42 com seis indivíduos identificados, o CM-

A39 que era descrito com uma ocorrência única na Ilha do Arvoredo (PROIETTI et al., 2012) e o CM-A46 também com apenas um indivíduo em Ubatuba (NAROMACIEL et al., 2007).

Essas diferenças na ocorrência dos haplótipos podem ser influenciadas pelas características destacadas pela biogeografia e das condições climáticas e oceânicas, já que o clima da região é classificado como Subtropical Úmido – Mesotérmico e tem a atuação de massas polares durante o inverno e tropical atlântica durante o verão (VANHONI; MENDONÇA, 2008). Além disso, a região sofre mudanças relacionadas à dinâmica entre o El Niño e as Oscilações Sul (TOMCZAK; GODFREY, 2003) e Vanhoni e Mendonça (2008) sugerem que a maior pluviosidade em alguns anos pode estar diretamente relacionada aos registros do El Niño.

Considerando as amostras do litoral do Paraná relacionadas aos anos de coleta, a maior variação dentro dos anos pode ser verificada devido a algumas peculiaridades de alguns haplótipos, o número de indivíduos por haplótipos ou mesmo o número de haplótipos definidos para cada ano de coleta, o qual variou de dois a sete haplótipos/ano. Dentre essa variação entre os anos, observa-se a identificação única dos haplótipos CM-A23 e CM-A32, que tem regiões exclusivas de nidificação (CM-A23: Ilha da Ascensão e Atol das Rocas/Fernando de Noronha; CM-A32: Atol das Rocas, Ilha de Ascensão e Trindade) (PROIETTI et al., 2012).

A média do CCC, número de haplótipos encontrados e diversidade dos haplótipos nas amostras da região do litoral do Paraná confirmam que tartarugas verdes de diferentes regiões de nidificação utilizam esse local como área de alimentação (JORDÃO et al., 2015). A maioria delas é de origem do Atlântico Sul e possui a predominância de um haplótipo que se destaca em número e presença contínua durante os diferentes anos e estações e a ocorrência de haplótipos com baixa frequência (menos que 5%).

7 CONCLUSÃO GERAL

O cuidado e a conservação desses indivíduos são importantes para a manutenção dos diferentes estoques reprodutivos de origens variadas que utilizam a área do litoral do estado do Paraná para a alimentação, como também a conservação do local se torna necessária, garantindo assim um ambiente com boas condições ambientais e com disponibilidade de recursos alimentares.

Entretanto, estudo com outros marcadores moleculares devem ser realizados para essa espécie de tartaruga marinha presente na região, como por exemplo, estudo que visem obter informações relacionadas às características de ambos os parentais, informações de parentesco e dados de outros genomas e regiões gênicas. Pois essas informações possibilitam o desenvolvimento de melhores planos de conservação que podem manter a diversidade genética da espécie *Chelonia mydas* em todas as áreas de nidificação e alimentação, e permitem a elaboração de medidas de manutenção do litoral do estado do Paraná, local onde já ocorre a instalação de diversos empreendimentos e residências que alteram a dinâmica natural da região.

8 REFERÊNCIAS

- ABREU-GROBOIS, A.; HORROCKS, J.; FORMIA, A.; DUTTON, P.; LEROUX, R.; VÉLEZ-ZUAZO, X.; SOARES, L.; MEYLAN, P. New mtDNA Dloop primers which work for a variety of marine turtle species may increase their solution of mixed stock analyses. In: **Proceedings of the 26th annual symposium on sea turtle biology**. Island of Crete, Greece: ISTS. 2006. p. 179.
- ALCOCK, J. **Comportamento animal**: Uma abordagem evolutiva. 9. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.
- ALLISON, D.; GRIFFIN, E.; MILLER, K. L.; RIDER, S. **US sea turtles**: A comprehensive overview of six troubled species. Oceana, 2009.
- ALMEIDA, F. S.; FUNGARO, M. H. P.; SODRÉ, L. M. K. RADP and isoenzyme analysis of genetic variability in three allied species of catfish (Siluriformes: Pimelodidae) from the Tibagi river. **Journal of Zoology**, v. 253, n. 1, p. 113-120, 2001.
- AVISE, J. C. **Phylogeography**: the history and formation of species. Harvard University Press, 2000.
- BASS, A. L.; EPPERLY, S. P.; BRAUN-MCNEILL, J. Green turtle (*Chelonia mydas*) foraging and nesting aggregations in the Caribbean and Atlantic: impact of currents and behavior on dispersal. **Journal of Heredity**, v. 97, n. 4, p. 346-354, 2006.
- BASS, A. L.; LAGUEUX, C. J.; BOWEN, B. W. Origin of green turtles, *Chelonia mydas*, at "Sleeping Rocks" off the northeast coast of Nicaragua. **Copeia**, v. 1998, n. 4, p. 1064-1069, 1998.
- BASS, A. L.; WITZELL, W. N. Demographic composition of immature green turtles (*Chelonia mydas*) from the east central Florida coast: evidence from mtDNA markers. **Herpetologica**, v. 56, n. 3, p. 357-367, 2000.
- BJORNDAL, K. A. The consequences of herbivory for the life history pattern of the Caribbean Green turtle, *Chelonia mydas*. **Biology and conservation of sea turtles**, p. 111-116, 1982.
- BJORNDAL, K. A.; BOLTEN, A. B.; MOREIRA, L.; BELLINI, C.; MARCOVALDI, M. Â. Population structure and diversity of Brazilian green turtle rookeries based on mitochondrial DNA sequences. **Chelonian Conservation and Biology**, v. 5, n. 2, p. 262-268, 2006.
- BOWEN, B. W.; KARL, S. A. Population genetics and phylogeography of sea turtles. **Molecular Ecology**, v. 16, n. 23, p. 4886-4907, 2007.
- BUGONI, L.; KRAUSE, L.; PETRY, M. V. Marine debris and human impacts on sea turtles in southern Brazil. **Marine pollution bulletin**, v. 42, n. 12, p. 1330-1334, 2001.

CARMAN, V. G.; MANDIOLA, A.; ALEMANY, D.; DASSIS, M.; PON, J. S.; PROSDOCIMI, L.; PONCE DE LEÓN, A.; MIANZAN, H.; ACHA, E. M.; RODRÍGUEZ, D.; FAVERO, M.; COPELLO, S. Distribution of megafaunal species in the Southwestern Atlantic: key ecological areas and opportunities for marine conservation. **ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil**, p. fsw019, 2016.

DE MORAIS MACHADO, E. A formação e a trajetória do maior porto agroexportador do Brasil–Paranaguá. **Revista de Ciências Humanas**, v. 46, n. 1, p. 233-252, 2012.

DE PÁDUA ALMEIDA, A.; SANTOS, A. J. B.; THOMÉ, J. C. A.; BELINI, C.; BAPTISTOTTE, C.; MARCOVALDI, M. A.; DOS SANTOS, A. S.; LOPEZ, M. Avaliação do estado de conservação da tartaruga marinha *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) no Brasil. **Biodiversidade Brasileira**, n. 1, p. 12-19, 2011.

ENCALADA, S. E.; LAHANAS, P. N.; BJORN DAL, K. A.; BOLTEN, A. B.; MIYAMOTO, M. M.; BOWEN, B. W. Phylogeography and population structure of the Atlantic and Mediterranean green turtle *Chelonia mydas*: a mitochondrial DNA control region sequence assessment. **Molecular Ecology**, v. 5, n. 4, p. 473-483, 1996.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular ecology resources**, v. 10, n. 3, p. 564-567, 2010.

FORMIA, A.; GODLEY, B. J.; DONTAINE, J. F.; BRUFORD, M. W. Mitochondrial DNA diversity and phylogeography of endangered green turtle (*Chelonia mydas*) populations in Africa. **Conservation Genetics**, v. 7, n. 3, p. 353-369, 2006.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos de genética da conservação**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2008.

Geraci, J. R.; Lounsbury, V. J. **Marine mammals ashore: a field guide for strandings**. National Aquarium in Baltimore, 2005.

GUEBERT-BARTHOLO, F. M.; BARLETTA, M.; COSTA, M. F.; MONTEIRO-FILHO, E. L. A. Using gut contents to assess foraging patterns of juvenile Green turtles *Chelonia mydas* in the Paranaguá Estuary, Brazil. **Endangered Species Research**, v. 13, n. 2, p. 131-143, 2011.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Princípios de genética de populações**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2010.

HAZEL, J.; LAWLER, I. R.; HAMANN, M. Diving at the shallow end: Green turtle behavior in near-shore foraging habitat. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 371, n. 1, p. 84-92, 2009.

HILL, R. W.; WYSE, G. A.; ANDERSON, M. **Fisiologia animal**. 2. ed. Porto Alegre: Arnet, 2012.

JENSEN, M. P.; FITZSIMMONS, N. N.; DUTTON, P. H. Molecular genetics of sea turtles. In: WYNEKEN, J.; LOHMANN, K. J.; MUSICK, J. A. **The biology of sea turtles**. Flórida: CRC Press, 2013. v. 3.

JORDÃO, J. C.; BONDIOLI, A. C. V.; GUEBERT, F. M.; THOISY, B. D.; TOLEDO, L. F. D. A. Green turtle (*Chelonia mydas*) genetic diversity at Paranaguá Estuarine Complex feeding grounds in Brazil. **Genetics and molecular biology**, v. 38, n. 3, p. 346-352, 2015.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of molecular evolution**, v. 16, n. 2, p. 111-120, 1980.

KRENZ, J. G.; NAYLOR, G. J.; SHAFFER, H. B.; JANZEN, F. J. Molecular phylogenetics and evolution of turtles. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 37, n. 1, p. 178-191, 2005.

LAHANAS, P. N.; BJORNDAL, K. A.; BOLTEN, A. B.; ENCALADA, S. E.; MIYAMOTO, M. M.; VALVERDE, R. A.; BOWEN, B. W. Genetic composition of a green turtle (*Chelonia mydas*) feeding ground population: evidence for multiple origins. **Marine Biology**, v. 130, n. 3, p. 345-352, 1998.

LAHANAS, P. N.; MIYAMOTO, M. M.; BJORNDAL, K. A.; BOLTEN, A. B. Molecular evolution and population genetics of Greater Caribbean green turtles (*Chelonia mydas*) as inferred from mitochondrial DNA control region sequences. **Genetica**, v. 94, n. 1, p. 57-66, 1994.

LAMOUR, M. R.; SOARES, C. R.; CARRILHO, J. C. Mapas de parâmetros textuais de sedimentos de fundo do Complexo Estuarino de Paranaguá – PR. **Boletim Paranaense de Geociências**, v. 55, p. 77-82, 2004.

LANA, P. C.; MARONE, E.; LOPES, R. M.; MACHADO, E. C. The subtropical Estuarine Complex of Paranaguá Bay, Brazil. In: SEELIGER, U.; KJERFVE, B. **Coastal marine ecosystems of Latin America**. Springer Science & Business Media, 2000.

LARA-RUIZ, P.; LOPEZ, G. G.; SANTOS, F. R.; SOARES, L. S. Extensive hybridization in hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) nesting in Brazil revealed by mtDNA analyses. **Conservation Genetics**, v. 7, n. 5, p. 773-781, 2006.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, n. 11, p. 1451–1452, 2009.

LÓPEZ-BARRERA, E. A.; LONGO, G. O.; MONTEIRO-FILHO, E. L. A. Incidental capture of Green turtle (*Chelonia mydas*) in gillnets of small-scale fisheries in the Paranaguá Bay, Southern Brazil. **Ocean & Coastal Management**, v. 60, p. 11-18, 2012.

LUKE, K.; HORROCKS, J. A.; LEROUX, R. A.; DUTTON, P. H. Origins of green turtle (*Chelonia mydas*) feeding aggregations around Barbados, West Indies. **Marine Biology**, v. 144, n. 4, p. 799-805, 2004.

LUTCAVAGE, M. E.; PLOTKIN, P.; WITHERINGTON, B.; LUTZ, P. L. Human impacts on sea turtle survival. In: LUTZ, P. L.; MUSICK, J. A. **The biology of sea turtle**. Flórida: CRC Press, 1997. v. 1.

MARCOVALDI, M. Â.; DEI MARCOVALDI, G. G. Marine turtles of Brazil: the history and structure of Projeto TAMAR-IBAMA. **Biological Conservation**, v. 91, n. 1, p. 35-41, 1999.

MARCOVALDI, M. Â.; SANTOS, A. S.; SALES, G. **Plano de Ação Nacional para Conservação das Tartarugas Marinhas**. Brasília: ICMBio. 2011.

MATIOLI, S. R.; FERNANDES, F. M. C. **Biologia molecular e evolução**. 2. ed. Ribeirão Preto: Holos, 2012.

MAURY, C. M. **Biodiversidade brasileira: avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros**. Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Biodiversidade e Florestas. 2002.

MEYLAN, A. B.; BOWEN, B. W.; AVISE, J. C. A genetic test of the natal homing versus social facilitation models for Green turtle migration. **Science**, v. 248, n. 4956, p. 724-727, 1990.

MILTON, S.; LUTZ, P. Sea turtle taxonomy and distribution. In: SHIGENAKA, G.; MILTON, S. **Oil and sea turtle: Biology, planning, and response**. National Oceanic and Atmospheric Administration, NOAA's National Ocean Service, Office of Response and Restoration, 2003.

MIRANDA, T. P.; GENZANO, G. N.; MARQUES, A. C. Areas of endemism in the Southwestern Atlantic Ocean based on the distribution of benthic hydroids (Cnidaria: Hydrozoa). **Zootaxa**, v. 4033, n. 4, p. 484-506, 2015.

MONZÓN-ARGÜELLO, C.; LÓPEZ-JURADO, L. F.; RICO, C.; MARCO, A.; LÓPEZ, P.; HAYS, G. C.; LEE, P. L. M. Evidence from genetic and Lagrangian drifter data for transatlantic transport of small juvenile green turtles. **Journal of Biogeography**, v. 37, n. 9, p. 1752-1766, 2010.

MUSICK, J. A.; LIMPUS, C. J. Habitat utilization and migration in juvenile sea turtles. In: LUTZ, P. L.; MUSICK, J. A. **The biology of sea turtle**. Florida: CRC Press, 1997. v. 1.

NARO-MACIEL, E.; BECKER, J. H.; LIMA, E. H.; MARCOVALDI, M. A.; DESALLE, R. Testing dispersal hypotheses in foraging green sea turtles (*Chelonia mydas*) of Brazil. **Journal of Heredity**, v. 98, n. 1, p. 29-39, 2007.

NARO-MACIEL, E.; BONDIOLI, A. C. V.; MARTIN, M.; DE PÁDUA ALMEIDA, A.; BAPTISTOTTE, C.; BELLINI, C.; MARCOVALDI, M. A.; SANTOS, A. J. B.; AMATO, G. The interplay of homing and dispersal in green turtles: a focus on the southwestern Atlantic. **Journal of Heredity**, v. 103, n. 6, p. 792-805, 2012.

NARO-MACIEL, E.; HART, K. M.; CRUCIATA, R.; PUTMAN, N. F. DNA and dispersal models highlight constrained connectivity in a migratory marine megavertebate. **Ecography**, 2016.

NG, C. K.; DUTTON, P. H.; CHAN, S. K.; CHEUNG, K.; QIU, J.; SUN, Y. Characterization and conservation concerns of Green turtles (*Chelonia mydas*) nesting in Hong Kong, China. **Pacific Science**, v. 68, n. 2, p. 231-243, 2014.

PRITCHARD, P. C. H. Evolution, phylogeny, and current status. In: LUTZ, Peter L.; MUSICK, J. A. **The biology of sea turtle**. Flórida: CRC Press, 1997. v. 1.

PROIETTI, M. C.; LARA-RUIZ, P.; REISSER, J. W.; PINTO, L. D. S.; DELLAGOSTIN, O. A.; MARINS, L. F. Green turtles (*Chelonia mydas*) foraging at Arvoredo Island in Southern Brazil: Genetic characterization and mixed stock analysis through mtDNA control region haplotypes. **Genetics and molecular biology**, v. 32, n. 3, p. 613-618, 2009.

PROIETTI, M. C.; REISSER, J. W.; KINAS, P. G.; KERR, R.; MONTEIRO, D. D. S.; MARINS, L. F.; SECCHI, E. R. Green turtle *Chelonia mydas* mixed stocks in the western South Atlantic, as revealed by mtDNA haplotypes and drifter trajectories. **Marine Ecology Progress Series**, v. 447, p. 195-209, 2012.

PROSDOCIMI, L.; BUGONI, L.; ALBAREDA, D.; REMIS, M. I. Are stocks of immature loggerhead sea turtles always mixed?. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 466, p. 85-91, 2015.

PROSDOCIMI, L.; CARMAN, V. G.; ALBAREDA, D. A.; REMIS, M. I. Genetic composition of green turtle feeding grounds in coastal waters of Argentina based on mitochondrial DNA. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 412, p. 37-45, 2012.

PROSDOCIMI, L.; DUTTON, P. H.; ALBAREDA, D.; REMIS, M. I. Origin and genetic diversity of leatherbacks (*Dermochelys coriacea*) at Argentine foraging grounds. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 458, p. 13-19, 2014.

PUPO, M. M.; SOTO, J. M. R.; HANAZAKI, N. Captura incidental de tartarugas marinhas na pesca artesanal da Ilha de Santa Catarina, SC. **Biotemas**, v. 19, n. 4, p. 63-72, 2006.

REIS, E. C.; SOARES, L. S.; VARGAS, S. M.; SANTOS, F. R.; YOUNG, R. J.; BJORNDALE, K. A.; BOLTEN, A. B.; LÔBO-HAJDU, G. Genetic composition, population structure and phylogeography of the loggerhead sea turtle: colonization hypothesis for the Brazilian rookeries. **Conservation Genetics**, v. 11, n.4, p. 1467-1477, 2010a.

REIS, E. C.; MOURA, J. F. D.; LIMA, L. M.; RENNÓ, B.; SICILIANO, S. Evidence of migratory movements of olive ridley turtles (*Lepidochelys olivacea*) along the Brazilian coast. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 58, n. 3, p. 255-259, 2010b.

RENOUS, S.; DE BROIN, F. L.; DEPECKER, M.; DAVENPORT, J.; BELS, Vincent. Evolution of locomotion in aquatic turtles. In: WYNEKEN, J.; GODFREY, M. H.; BELS, V. **Biology of turtle: From structures to strategies of life**. Florida: CRC Press, 2007.

SANCHES, T. M. Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da zona costeira e marinha: Tartarugas marinhas. **Termo de referência**, n. 155/98, 1999.

SPALDING, M. D.; AGOSTINI, V. N.; RICE, J.; GRANT, S. M. Pelagic provinces of the world: a biogeographic classification of the world's surface pelagic waters. **Ocean & coastal management**, v. 60, p. 19-30, 2012.

SPALDING, M. D.; FOX, H. E.; ALLEN, G. R.; DAVIDSON, N.; FERDANA, Z. A.; FINLAYSON, M. A. X.; HALPERN, B. S.; JORGE, M. A.; LOMBANA, A.; LOURIE, S. A.; MARTIN, K. D.; MCMANUS, E.; MOLNAR, J.; RECCHIA, C. A.; ROBERTSON, J. Marine ecoregions of the world: a bioregionalization of coastal and shelf areas. **BioScience**, v. 57, n. 7, p. 573-583, 2007.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.

TOGAWA, R. C.; BRÍGIDO, M. M. PHPH: Web based tool for simple electropherogram quality analysis. In: **1 st International Conference on Bioinformatics and Computational Biology-IcoBiCoBi**. Ribeirão Preto. 2003.

TOMCZAK, M.; GODFREY, J. S. **Regional oceanography: an introduction**. 2. ed. Delhi: Daya Publishing House, 2003.

VANHONI, F.; MENDONÇA, F. O clima do litoral do estado do Paraná. **Revista Brasileira de Climatologia**, v. 3, p. 49-63. 2008.

WALLACE, B. P.; DIMATTEO, A. D.; BOLTEN, A. B.; CHALOUKKA, M. Y.; HUTCHINSON, B. J.; ABREU-GROBOIS, F. A.; MORTIMER, J. A.; SEMINOFF, J. A.; AMOROCHO, D.; BJORNDALE, K. A.; BOURJEA, J.; BOWEN, B. W.; DUEÑAS, R. B.; CASALE, P.; CHOUDHURY, B. C.; COSTA, A.; DUTTON, P. H.; FALLABRINO, A.; FINKBEINER, E. M.; GIRARD, A.; GIRONDOT, M.; HAMANN, M.; HURLEY, B. J.; LÓPEZ-MENDILAHARSU, M.; MARCOVALDI, M. A.; MUSICK, J. A.; NEI, R.; PILCHER, N. J.; TROËNG, S.; WITHERINGTON, B.; MAST, R. B. Global conservation priorities for marine turtles. **PLoSOne**, v. 6, n. 9, p. e24510, 2011.

Wright, S. **Evolution and the genetics of populations: a treatise in four volumes: Vol. 4: variability within and among natural populations**. Chicago: University of Chicago Press, 1978.

WYNEKEN, J.; WITHERINGTON, D. **The anatomy of sea turtles**. Southeast Fisheries Science Center, National Marine Fisheries Service, National Oceanic and Atmospheric Administration, US Department of Commerce, 2001.

ZARDOYA, R.; MEYER, A. The evolutionary position of turtles revised. **Naturwissenschaften**, v. 88, n. 5, p. 193-200, 2001.

Tabela Suplementar 1. Informações das amostras de *C. mydas* coletadas no litoral do estado do Paraná utilizadas para as análises dos resultados. Id = Identificação da amostra; CCC = Comprimento Curvilíneo da Carapaça; NI = Não identificado.

Id	Data de coleta	Local geral	CCC	Tecido extraído	Estágio de decomposição	Haplótipo
302	01/07/2007	Pontal do Paraná	47	Músculo	2	CM-A10
307	07/07/2007	Pontal do Paraná	54,5	Músculo	2	CM-A8
375	18/10/2007	Pontal do Paraná	40	Músculo	2	CM-A8
429	29/12/2007	Pontal do Paraná	33	Músculo	2	CM-A8
438	19/04/2008	Pontal do Paraná	41,5	Músculo	2	CM-A8
472	24/07/2008	Pontal do Paraná	32	Músculo	2	CM-A8
473	26/07/2008	Pontal do Paraná	32	Músculo	2	CM-A5
494	14/09/2008	NI	31	Músculo	2	CM-A5
509	25/09/2008	Pontal do Paraná	37	Músculo	2	CM-A32
535	21/10/2008	NI	31,5	Músculo	3	CM-A5
536	21/10/2008	Matinhos	35,5	Músculo	3	CM-A8
540	04/10/2008	Ilhas	40,5	Músculo	3	CM-A8
542	28/10/2008	Pontal do Paraná	32,5	Músculo	3	CM-A8
543	06/11/2008	Pontal do Paraná	40,5	Músculo	3	CM-A9
544	11/11/2008	Pontal do Paraná	45,5	Músculo	2	CM-A23
546	14/11/2008	Pontal do Paraná	39,5	Músculo	2	CM-A8
547	14/11/2008	Pontal do Paraná	34	Músculo	2	CM-A5
548	15/11/2008	Pontal do Paraná	45,5	Músculo	3	CM-A8
552	22/11/2008	Pontal do Paraná	46	Fígado	3	CM-A8
553	11/11/2008	Pontal do Paraná	31	Músculo	3	CM-A5
555	27/11/2008	Pontal do Paraná	53,5	Músculo	4	CM-A5
556	10/12/2008	Ilhas	37	Músculo	3	CM-A5
561	18/01/2009	Ilhas	43	Músculo	2	CM-A8
564	20/01/2009	Pontal do Paraná	40,5	Músculo	2	CM-A8
567	30/01/2009	Pontal do Paraná	49	Fígado	2	CM-A8
571	25/03/2009	Pontal do Paraná	49,5	Fígado	2	CM-A3
573	18/01/2009	Ilhas	39,5	Fígado	3	CM-A5
574	21/04/2009	Pontal do Paraná	37	Fígado	2	CM-A5
575	21/04/2009	Pontal do Paraná	36	Músculo	2	CM-A8
576	21/04/2009	Pontal do Paraná	33	Fígado	2	CM-A5
577	21/05/2009	Pontal do Paraná	39	Músculo	3	CM-A5
578	22/05/2009	NI	43,5	Fígado	2	CM-A8
584	01/06/2009	NI	37	Fígado	NI	CM-A8
585	31/05/2009	Pontal do Paraná	36	Músculo	3	CM-A5
589	16/06/2009	Pontal do Paraná	37	Fígado	4	CM-A8
597	24/06/2009	Pontal do Paraná	36	Fígado	4	CM-A8
598	24/06/2009	Matinhos	32	Fígado	NI	CM-A8
613	06/07/2009	Pontal do Paraná	37,5	Pele	2	CM-A24
615	08/07/2009	Pontal do Paraná	31	Pele	4	CM-A8
617	10/07/2009	Pontal do Paraná	42,5	Pele	NI	CM-A8
618	12/07/2009	Pontal do Paraná	37	Pele	4	CM-A8
619	17/07/2009	Pontal do Paraná	40	Pele	4	CM-A8
622	17/07/2009	NI	NI	Pele	4	CM-A8

624	17/07/2009	Ilhas	37	Pele	2	CM-A8
625	19/07/2009	Pontal do Paraná	33	Pele	3	CM-A8
626	20/07/2009	Pontal do Paraná	35	Pele	4	CM-A8
629	31/07/2009	Pontal do Paraná	38	Pele	NI	CM-A8
631	07/08/2009	Pontal do Paraná	35	Pele	4	CM-A8
641	25/08/2009	Pontal do Paraná	35	Pele	3	CM-A5
646	13/09/2009	Pontal do Paraná	35	Pele	2	CM-A5
658	04/11/2009	Pontal do Paraná	37	Músculo	4	CM-A8
659	04/11/2009	Pontal do Paraná	40	Músculo	2	CM-A8
660	11/11/2009	NI	36	Músculo	2	CM-A8
661	11/11/2009	Pontal do Paraná	35	Músculo	NI	CM-A8
668	14/12/2009	Pontal do Paraná	41	Músculo	2	CM-A5
673	30/12/2009	Pontal do Paraná	36	Músculo	3	CM-A8
678	29/01/2010	Pontal do Paraná	37,5	Músculo	3	CM-A6
679	fev/10	Guaratuba	33,5	Pele	4	CM-A8
683	18/05/2010	Pontal do Paraná	39	Pele	4	CM-A8
688	20/06/2010	NI	32,5	Músculo	2	CM-A5
689	25/07/2010	Pontal do Paraná	33	Músculo	2	CM-A5
690	07/07/2010	NI	36	Músculo	2	CM-A5
691	08/07/2010	Ilhas	41	Músculo	4	CM-A8
699	11/07/2010	Pontal do Paraná	36	Músculo	1	CM-A5
711	28/07/2010	NI	33,5	Músculo	3	CM-A8
712	29/07/2010	Matinhos	37,5	Músculo	4	CM-A8
716	05/08/2010	Pontal do Paraná	37,5	Músculo	4	CM-A8
730	20/09/2010	Pontal do Paraná	34,5	Fígado	4	CM-A5
732	25/09/2010	Ilhas	35	Pele	2	CM-A5
733	25/09/2010	Ilhas	43,5	Pele	2	CM-A8
737	27/09/2010	Pontal do Paraná	NI	Fígado	5	CM-A5
740	22/10/2010	Matinhos	43	Músculo	3	CM-A8
752	17/11/2010	Pontal do Paraná	32	Pele	4	CM-A8
754	20/11/2010	Ilhas	31	Pele	5	CM-A8
758	28/11/2010	Pontal do Paraná	38	Músculo	4	CM-A24
759	10/12/2010	Pontal do Paraná	40	Pele	4	CM-A8
762	03/01/2011	NI	30	Pele	2	CM-A8
764	jan/11	NI	45	Músculo	2	CM-A39
765	11/01/2011	NI	34	Músculo	2	CM-A8
768	01/02/2011	Pontal do Paraná	38,5	Músculo	2	CM-A46
769	07/02/2011	Ilhas	62	Músculo	2	CM-A8
770	07/02/2011	Ilhas	55,5	Músculo	4	CM-A8
771	09/02/2011	Pontal do Paraná	53	Músculo	4	CM-A8
772	10/02/2011	Pontal do Paraná	34	Músculo	4	CM-A6
773	18/02/2011	NI	41	Músculo	4	CM-A5
776	03/03/2011	Pontal do Paraná	33	Músculo	2	CM-A8
778	08/02/2011	NI	38	Músculo	2	CM-A5
780	06/05/2011	Matinhos	40	Músculo	2	CM-A8
781	11/05/2011	Guaratuba	38	Músculo	3	CM-A5

782	12/05/2011	Pontal do Paraná	41	Músculo	2	CM-A8
783	23/05/2011	NI	58	Músculo	2	CM-A8
784	23/05/2011	Matinhos	36,5	Músculo	3	CM-A8
790	17/06/2011	Pontal do Paraná	41	Músculo	3	CM-A6
797	28/06/2011	Pontal do Paraná	NI	Pele	5	CM-A8
799	28/06/2011	Pontal do Paraná	38,5	Músculo	4	CM-A8
800	29/06/2011	Ilhas	36,5	Músculo	4	CM-A8
801	13/07/2011	Pontal do Paraná	46,5	Músculo	4	CM-A8
802	14/07/2011	Pontal do Paraná	37,5	Músculo	3	CM-A8
803	20/07/2011	Pontal do Paraná	38,5	Músculo	2	CM-A8
804	20/07/2011	Pontal do Paraná	37,5	Músculo	2	CM-A8
807	12/09/2011	Matinhos	46,5	Músculo	3	CM-A8
808	01/08/2011	Pontal do Paraná	45,5	Músculo	4	CM-A8
809	03/08/2011	Pontal do Paraná	35,2	Músculo	5	CM-A8
811	19/08/2011	Pontal do Paraná	38	Músculo	3	CM-A8
813	27/08/2011	NI	37,5	Músculo	2	CM-A8
815	27/08/2011	Pontal do Paraná	32	Músculo	NI	CM-A8
816	27/08/2011	Pontal do Paraná	37,5	Músculo	4	CM-A5
817	27/08/2011	Pontal do Paraná	42,5	Músculo	NI	CM-A8
820	14/09/2011	Matinhos	37,3	Músculo	3	CM-A8
824	04/10/2011	Ilhas	40,5	Pele	NI	CM-A8
825	19/10/2011	Pontal do Paraná	NI	Pele	5	CM-A5
827	01/11/2011	Pontal do Paraná	NI	Pele	5	CM-A8
829	12/11/2011	Matinhos	36,4	Músculo	4	CM-A8
832	11/11/2011	Matinhos	37,5	Músculo	2	CM-A8
833	03/12/2011	Pontal do Paraná	59	Músculo	4	CM-A8
834	06/12/2011	Pontal do Paraná	35,5	Músculo	NI	CM-A8
838	20/12/2011	Pontal do Paraná	40,5	Músculo	3	CM-A8
839	04/01/2012	Pontal do Paraná	40	Músculo	4	CM-A8
841	27/01/2012	Pontal do Paraná	42	Pele	4	CM-A8
842	13/02/2012	NI	36	Pele	2	CM-A8
845	13/03/2012	Pontal do Paraná	39,3	Músculo	4	CM-A9
846	30/03/2012	Paranaguá	51	Músculo	3	CM-A8
850	17/04/2012	Pontal do Paraná	31	Músculo	4	CM-A5
851	24/04/2012	Paranaguá	43	Músculo	3	CM-A8
853	08/05/2012	Pontal do Paraná	40	Pele	3	CM-A8
855	24/05/2012	Pontal do Paraná	39,5	Músculo	4	CM-A6
856	24/05/2012	Pontal do Paraná	37,6	Músculo	3	CM-A8
857	29/05/2012	Pontal do Paraná	41,9	Músculo	4	CM-A8
858	18/06/2012	Pontal do Paraná	NI	Músculo	3	CM-A5
859	18/06/2012	Ilhas	NI	Pele	5	CM-A5
860	18/06/2012	Ilhas	NI	Pele	5	CM-A8
862	19/06/2012	Matinhos	37	Pele	5	CM-A5
863	19/06/2012	Matinhos	34,5	Músculo	4	CM-A5
865	22/06/2012	Pontal do Paraná	36	Músculo	4	CM-A8
867	24/06/2012	Paranaguá	33,5	Músculo	3	CM-A5

868	29/06/2012	Pontal do Paraná	39,6	Músculo	4	CM-A8
869	29/06/2012	Pontal do Paraná	36,4	Músculo	5	CM-A5
872	29/06/2012	Pontal do Paraná	35,3	Músculo	3	CM-A5
876	29/06/2012	Ilhas	48	Músculo	5	CM-A42
877	29/06/2012	Ilhas	46	Músculo	4	CM-A8
878	29/06/2012	Ilhas	34	Músculo	5	CM-A8
879	03/07/2012	Pontal do Paraná	38	Músculo	3	CM-A8
880	03/07/2012	Pontal do Paraná	50	Músculo	4	CM-A8
881	03/07/2012	Pontal do Paraná	39,5	Músculo	4	CM-A5
882	04/07/2012	Pontal do Paraná	50	Músculo	5	CM-A5
885	04/07/2012	Pontal do Paraná	40,5	Músculo	4	CM-A5
886	04/07/2012	Pontal do Paraná	NI	Músculo	5	CM-A8
887	04/07/2012	Pontal do Paraná	30,5	Pele	4	CM-A5
888	04/07/2012	Matinhos	37,8	Músculo	5	CM-A8
889	05/07/2012	Pontal do Paraná	35,1	Músculo	5	CM-A8
891	11/07/2012	Pontal do Paraná	34,8	Músculo	4	CM-A8
896	17/07/2012	Paranaguá	42,1	Músculo	NI	CM-A8
897	19/07/2012	Pontal do Paraná	33,7	Músculo	5	CM-A5
899	20/07/2012	Pontal do Paraná	38	Músculo	2	CM-A8
900	23/07/2012	Pontal do Paraná	42,5	Músculo	4	CM-A8
901	23/07/2012	Pontal do Paraná	39,7	Pele	4	CM-A8
902	23/07/2012	Pontal do Paraná	34,8	Músculo	NI	CM-A5
903	23/07/2012	Pontal do Paraná	37,2	Músculo	4	CM-A8
905	23/07/2012	Pontal do Paraná	35,6	Músculo	4	CM-A8
906	23/07/2012	Pontal do Paraná	39,4	Músculo	4	CM-A8
908	30/7/201	Pontal do Paraná	32,5	Músculo	3	CM-A5
910	06/08/2012	Pontal do Paraná	34,5	Músculo	4	CM-A5
914	07/08/2012	NI	41,2	Músculo	5	CM-A8
915	07/08/2012	NI	41,5	Músculo	5	CM-A8
916	09/08/2012	Pontal do Paraná	44,5	Músculo	5	CM-A8
917	10/08/2012	NI	34,7	Músculo	4	CM-A6
918	14/08/2012	Pontal do Paraná	38,8	Músculo	3	CM-A8
919	15/08/2012	Pontal do Paraná	36,8	Músculo	4	CM-A42
924	17/08/2012	Matinhos	79	Pele	5	CM-A8
925	18/08/2012	Pontal do Paraná	31,6	Pele	5	CM-A5
927	20/08/2012	Pontal do Paraná	41,8	Músculo	NI	CM-A8
930	25/08/2012	Pontal do Paraná	NI	Músculo	3	CM-A8
931	30/08/2012	Pontal do Paraná	38,8	Músculo	4	CM-A8
932	29/08/2012	Pontal do Paraná	37,1	Músculo	NI	CM-A8
934	30/08/2012	Pontal do Paraná	35,7	Pele	4	CM-A8
936	31/08/2012	Paranaguá	62,7	Pele	1	CM-A8
937	03/09/2012	Pontal do Paraná	39,5	Músculo	3	CM-A39
938	04/09/2012	Pontal do Paraná	56,8	Músculo	3	CM-A8
939	07/09/2012	NI	37,1	Músculo	4	CM-A8
940	13/09/2012	Pontal do Paraná	43	Músculo	3	CM-A39
942	13/09/2012	Pontal do Paraná	35,2	Músculo	3	CM-A3

943	13/09/2012	Matinhos	45,6	Músculo	3	CM-A8
947	08/10/2012	Pontal do Paraná	40	Músculo	5	CM-A5
949	10/10/2012	Pontal do Paraná	35,9	Músculo	4	CM-A42
952	10/10/2012	Matinhos	36,3	Músculo	NI	CM-A8
956	25/10/2012	Pontal do Paraná	37	Pele	5	CM-A8
958	08/11/2012	Pontal do Paraná	40	Músculo	4	CM-A8
959	08/11/2012	Pontal do Paraná	38,6	Músculo	4	CM-A8
961	12/11/2012	Pontal do Paraná	48,7	Músculo	NI	CM-A42
962	10/11/2012	Pontal do Paraná	33,4	Músculo	4	CM-A8
963	25/11/2012	Pontal do Paraná	32,8	Músculo	2	CM-A8
971	05/02/2013	Matinhos	42,5	Músculo	NI	CM-A8
974	07/03/2013	Pontal do Paraná	34,4	Músculo	2	CM-A8
975	15/03/2013	Pontal do Paraná	41,3	Músculo	2	CM-A8
978	28/03/2013	Paranaguá	43	Músculo	2	CM-A8
979	28/03/2013	Paranaguá	39,5	Músculo	2	CM-A8
981	17/02/2013	Matinhos	34,5	Pele	2	CM-A8
983	28/03/2013	Paranaguá	41,2	Músculo	3	CM-A8
996	17/06/2013	Paranaguá	44,2	Músculo	3	CM-A8
1008	27/03/2013	Pontal do Paraná	40	Músculo	4	CM-A8
1010	03/07/2013	Pontal do Paraná	49,1	Músculo	4	CM-A8
1011	03/07/2013	Pontal do Paraná	31,8	Músculo	4	CM-A42
1012	03/07/2013	Pontal do Paraná	34,6	Músculo	4	CM-A5
1013	03/07/2013	Pontal do Paraná	44,3	Músculo	4	CM-A9
1014	03/07/2013	Pontal do Paraná	39,8	Músculo	4	CM-A8
1015	03/07/2013	Pontal do Paraná	31,9	Músculo	4	CM-A8
1016	03/07/2013	Pontal do Paraná	32,3	Músculo	4	CM-A46
1021	10/07/2013	NI	36,5	Músculo	4	CM-A8
1022	10/07/2013	NI	36	Músculo	4	CM-A6
1030	24/07/2013	NI	39,6	Músculo	4	CM-A8
1032	31/07/2013	NI	55,3	Músculo	4	CM-A24
1033	31/07/2013	NI	35,2	Músculo	3	CM-A8
1035	09/08/2013	Pontal do Paraná	27,4	Pele	4	CM-A5
1037	04/07/2013	Paranaguá	46,4	Músculo	2	CM-A8
1038	18/07/2013	Paranaguá	37,6	Músculo	2	CM-A6
1039	30/07/2013	Paranaguá	40,5	Músculo	2	CM-A8
1046	28/08/2013	Ilhas	37,3	Músculo	2	CM-A8
1047	28/08/2013	Ilhas	37	Músculo	5	CM-A8
1056	2013	NI	40	Músculo	4	CM-A8
1057	02/10/2013	Pontal do Paraná	43	Músculo	4	CM-A8
1066	16/10/2013	Pontal do Paraná	47,1	Músculo	4	CM-A8
1067	16/10/2013	Pontal do Paraná	44	Músculo	4	CM-A8
1068	16/10/2013	Pontal do Paraná	32,5	Pele	5	CM-A8
1077	30/10/2013	Matinhos	39,6	Pele	5	CM-A8
1078	05/11/2013	Matinhos	47,7	Músculo	2	CM-A9
1099	27/04/2014	Ilhas	32,4	Pele	1	CM-A5
1100	28/04/2014	Ilhas	34,8	Pele	1	CM-A8

1101	29/04/2014	Ilhas	38,7	Pele	1	CM-A8
1105	29/04/2014	Ilhas	40,7	Pele	1	CM-A8
1107	29/04/2014	Ilhas	38,1	Pele	1	CM-A8
1108	29/04/2014	Ilhas	43,2	Pele	1	CM-A9
1109	30/04/2014	Ilhas	42,5	Pele	1	CM-A8
1110	30/04/2014	Ilhas	38,9	Pele	1	CM-A8
1111	30/04/2014	Ilhas	38,5	Pele	1	CM-A8
1112	30/04/2014	Ilhas	38	Pele	1	CM-A8
1113	30/04/2014	Ilhas	32,8	Pele	1	CM-A8
1114	30/04/2014	Ilhas	39,4	Pele	1	CM-A10
1116	30/04/2014	Ilhas	37,8	Pele	1	CM-A8
1117	30/04/2014	Ilhas	40,2	Pele	1	CM-A8
1118	01/05/2014	Ilhas	41,8	Pele	1	CM-A10
1119	01/05/2014	Ilhas	45	Pele	1	CM-A8
1120	01/05/2014	Ilhas	35,4	Pele	1	CM-A5
1121	01/05/2014	Ilhas	48,2	Pele	1	CM-A8
1122	01/05/2014	Ilhas	44,9	Pele	1	CM-A8
1123	01/05/2014	Ilhas	44	Pele	1	CM-A8
1124	01/05/2014	Ilhas	42,3	Pele	1	CM-A8
1125	01/05/2014	Ilhas	39,7	Pele	1	CM-A8
1126	01/05/2014	Ilhas	51,5	Pele	1	CM-A8
1128	01/05/2014	Ilhas	40,2	Pele	1	CM-A8
1129	01/05/2014	Ilhas	41,5	Pele	1	CM-A8
1130	02/05/2014	Ilhas	44,5	Pele	1	CM-A5
1132	02/05/2014	Ilhas	45	Pele	1	CM-A8
1133	02/05/2014	Ilhas	42,7	Pele	1	CM-A8
1134	02/05/2014	Ilhas	32,2	Pele	1	CM-A8
1135	03/05/2014	Ilhas	44,7	Pele	1	CM-A8
1137	03/05/2014	Ilhas	47,6	Pele	1	CM-A8
1138	03/05/2014	Ilhas	43,5	Pele	1	CM-A9
1139	03/05/2014	Ilhas	43	Pele	1	CM-A46
1140	03/05/2014	Ilhas	47,4	Pele	1	CM-A10
1142	03/05/2014	NI	NI	Músculo	NI	CM-A8
1143	03/05/2014	Ilhas	38,4	Músculo	2	CM-A8
1145	05/05/2014	NI	56,1	Músculo	2	CM-A8
1148	07/05/2014	Pontal do Paraná	36,9	Pele	2	CM-A8
1149	07/05/2014	NI	38	Músculo	2	CM-A8
1151	14/05/2014	Pontal do Paraná	44,5	Músculo	2	CM-A8
1153	14/05/2014	Pontal do Paraná	34	Pele	2	CM-A8
1155	14/05/2014	Ilhas	40,2	Músculo	1	CM-A42
1156	14/05/2014	Ilhas	40,1	Pele	1	CM-A8
1157	17/05/2014	NI	37,4	Músculo	2	CM-A8
1160	20/05/2014	Ilhas	44	Pele	1	CM-A8
1163	27/05/2014	NI	40,5	Músculo	2	CM-A8
1165	28/05/2014	Pontal do Paraná	42,4	Músculo	2	CM-A8
1166	29/05/2014	Ilhas	32	Músculo	2	CM-A5

1167	01/06/2014	Pontal do Paraná	38,8	Músculo	2	CM-A10
1175	04/06/2014	Pontal do Paraná	41,5	Músculo	4	CM-A8
1176	05/06/2014	Pontal do Paraná	NI	Pele	1	CM-A5
1180	11/06/2014	Pontal do Paraná	NI	Pele	5	CM-A8
1184	11/06/2014	Pontal do Paraná	48,1	Músculo	4	CM-A8
1188	25/06/2014	Pontal do Paraná	NI	Músculo	5	CM-A8
1197	14/07/2014	Ilhas	41,3	Músculo	2	CM-A8
1248	12/08/2014	NI	38,6	Músculo	3	CM-A8
1255	20/08/2014	Pontal do Paraná	NI	Músculo	4	CM-A8
1258	20/08/2014	Pontal do Paraná	NI	Músculo	4	CM-A8
1288	10/09/2014	Pontal do Paraná	55	Músculo	5	CM-A24
1295	25/09/2014	Pontal do Paraná	42	Músculo	1	CM-A8
