

MANUELA DREYER DA SILVA

**BIOMONITORAMENTO DE UMA RESERVA PARTICULAR DO PATRIMÔNIO
NATURAL (RPPN) ATRAVÉS DA APLICAÇÃO DE BIOMARCADORES
BIOQUÍMICOS, MORFOLÓGICOS E GENÉTICOS EM *Astyanax sp.***

**CURITIBA
2008**

MANUELA DREYER DA SILVA

**BIOMONITORAMENTO DE UMA RESERVA PARTICULAR DO PATRIMÔNIO
NATURAL (RPPN) ATRAVÉS DA APLICAÇÃO DE BIOMARCADORES
BIOQUÍMICOS, MORFOLÓGICOS E GENÉTICOS EM *Astyanax sp.***

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre, Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, Área de Concentração em Ecotoxicologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Helena Cristina da Silva de Assis.

Co-orientador: Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro.

**CURITIBA
2008**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que de alguma forma colaboraram com minha vida acadêmica, profissional e pessoal, contribuindo para tornar possível meu projeto (ou os meus projetos de vida) e fazendo dessa escolha uma realização mais plena.

À minha mãe Tânia e ao pai Gerson por todo o apoio não apenas nessa conquista, mas em todas as outras de minha vida. Obrigada também por todo carinho e compreensão extra trabalho. Amo muito vocês!

Ao Le, marido querido e amado, amigo de todas as horas e Biólogo que tanto me ajudou e me faz compreender um pouco mais dessa profissão. Obrigada pela paciência, incentivo nas horas mais complicadas e pelos momentos mágicos.

Aos meus irmãos Diogo, Rosana e Filipe (com 'i') por todos os momentos vividos juntos, companheirismo e amizade, mesmo que em muitas ocasiões a distância aumente tanto as saudades. Ao pitoco Caio, que tantas vezes esteve do meu lado, com seu jeitinho curioso e encantador.

À minha orientadora Helena, pela orientação, conselhos, paciência e amizade, que me fizeram crescer como pessoa e como Bióloga desde a graduação.

Ao co-orientador Ciro, pela força e pelas oportunidades oferecidas.

Às minhas grandes amigas biólogas, amigas de tantos momentos, de tantas conquistas, de tantas descobertas e viagens, amigas da vida.

Às gurias extra facul, que fizeram parte das mais variadas fases da minha vida e, como não poderia deixar de ser, amigas nesse momento também.

Aos amigos de trabalho de todos os dias, pessoas que me fazem compreender como é atuar nessa profissão que tanto amo e que possibilitam a prática de atividades de extensão em comunidades.

A todo o pessoal do laboratório e do departamento, por todos os auxílios, mesmo que corridos, e bate-papos diários. Agradecimento especial à Stéfani, amiga que me ajudou muito nas fases de campo e nas discussões produtivas sobre esse trabalho. Também ao pessoal do Laboratório de Toxicologia Celular e Mutagênese Ambiental, por todo o auxílio nas análises realizadas nesse trabalho.

Aos amigos do mestrado, pelas conversas na cantina e nos corredores, pelo companheirismo nas disciplinas e pela amizade.

Ao pessoal da coordenação e da secretaria da PPGECO, por todas as ajudinhas e conversas nas diferentes horas.

Ao pessoal do laboratório do professor Marcelo Aranha, da UFPR, e do Museu de História Natural Capão da Imbuia, pela ajuda na identificação dos espécimes utilizados nesse trabalho. Também aos amigos de campo que tanto lutam para conservar os fragmentos de Floresta Estacional Semidecidual do Paraná.

Ao pessoal da Usina Vale do Ivaí, por tornarem esse trabalho realidade e pelos auxílios oferecidos. Obrigada especial ao guarda-parque Zaquel, pela paciência e conhecimento apresentados nas fases de campo.

Com carinho, obrigada a todos.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. UNIDADES DE CONSERVAÇÃO E AS RESERVAS PARTICULARES DO PATRIMÔNIO NATURAL	01
1.2. CONTAMINAÇÃO EM AMBIENTES AQUÁTICOS	03
1.2.1. Glifosato	08
1.2.2. Diuron	10
1.3. BIOMONITORAMENTO	11
1.3.1. Biomarcadores	13
1.3.1.1. Biotransformação e Estresse Oxidativo	15
1.3.1.2. Neurotoxicidade	19
1.3.1.3. Histopatologia	20
1.3.1.4. Genotoxicidade	21
2. OBJETIVOS	23
2.1. OBJETIVOS GERAIS	23
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
CAPÍTULO I: APLICAÇÃO DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS, MORFOLÓGICOS E GENÉTICOS EM <i>Astyanax</i> sp. NO BIOMONITORAMENTO DA RESERVA PARTICULAR DO PATRIMÔNIO NATURAL (RPPN) FAZENDA BARBACENA	24
I.1 INTRODUÇÃO	24
I.2 MATERIAL E MÉTODOS	27
I.2.1 ÁREA DE ESTUDO	27
I.2.2 DESENHO EXPERIMENTAL	28
I.2.2.1 Modelo Biológico	31
I.2.2.2 Extração Enzimática	32
I.2.2.3 Histopatologia de Fígado	35

I.2.2.4 Teste do Micronúcleo Písceo _____	35
I.2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA _____	36
I.3 RESULTADOS _____	37
I.3.1 ATIVIDADE DA GLUTATIONA-S-TRANSFERASE _____	37
I.3.2 ATIVIDADE DA CATALASE _____	37
I.3.3 LIPOPEROXIDAÇÃO _____	38
I.3.4 ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE _____	39
I.3.5 COMPARAÇÃO ENTRE ÉPOCA CHUVOSA E ÉPOCA SECA _____	40
I.3.6 HISTOPATOLOGIA DE FÍGADO _____	43
I.3.7 TESTE DO MICRONÚCLEO PÍSCEO _____	47
I.4 DISCUSSÃO _____	49

CAPÍTULO II: BIOMONITORAMENTO COMO FERRAMENTA PARA O INCREMENTO DE PLANOS DE MANEJO EM RESERVAS PARTICULARES DO PATRIMÔNIO NATURAL: CASO DA RPPN FAZENDA BARBACENA _____

II.1 CONTEXTUALIZAÇÃO DAS RPPN E LEVANTAMENTO DA PROBLEMÁTICA DA RPPN FAZENDA BARBACENA _____	59
II.2 BIOMONITORAMENTO AMBIENTAL NA GESTÃO DE RPPN _____	62
II.2.1 ZONAS DE AMORTECIMENTO EM RPPN _____	63
II.2.2 PLANO DE MANEJO DA RPPN FAZENDA BARBACENA _____	67
2.2.1 Subprograma de Monitoramento da Qualidade das Águas e Subprograma de Controle do Entorno _____	67
2.2.2 Programa de Interpretação e Educação Ambiental _____	69
II.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS _____	70

CONCLUSÕES GERAIS _____

72

RESUMO

Dentre as Unidades de Conservação se encontram as Reservas Particulares do Patrimônio Natural (RPPN). Como muitas RPPN estão em áreas sujeitas a diversos impactos, os estudos de biomonitoramento nessas reservas devem ser desenvolvidos. O presente estudo objetivou avaliar o impacto de pesticidas na RPPN Fazenda Barbacena, São Pedro do Ivaí, Paraná, utilizando biomarcadores de contaminação ambiental a fim de contribuir com a elaboração de estratégias de minimização dos possíveis impactos em áreas do entorno das RPPN e/ou no interior dessa unidade. Foram analisados os biomarcadores bioquímicos (atividade da Acetilcolinesterase - AChE, da Glutathione S-transferase - GST, da Catalase - CAT e Peroxidação Lipídica - LPO), morfológicos (histopatologia de fígado) e genético (teste de Micronúcleo Písceo) em *Astyanax* sp. em duas fases de campo: seca (setembro/2006) e chuvosa (março/2007). Foram coletados 30 indivíduos de *Astyanax* sp., em cada ponto amostral: (1) tanque formado na lavoura de cana de açúcar; (2) tanque formado no entorno da área produtiva com a RPPN e (3) no rio no interior da RPPN. Amostras de sangue foram coletadas para realização do teste do micronúcleo, amostras de fígado para análise da GST, CAT, LPO e histopatologia e de músculo para a AChE. Os resultados bioquímicos foram analisados por ANOVA de uma via, seguido do Teste de Tukey para comparação entre os grupos. Os resultados dos índices histopatológicos e das alterações nucleares foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis. Para todos os testes foi considerado nível de significância de 5%. Um aumento na atividade da CAT foi observado na coleta de set/06 no grupo coletado no interior da RPPN quando comparado ao ponto 1 e 2. A LPO aumentou nos peixes coletados no entorno da área produtiva e RPPN em set/06, quando comparado ao interior da RPPN e à área de cana-de-açúcar; e na coleta de mar/07 nesse mesmo ponto em relação aos demais. Também houve aumento da atividade da GST no entorno da reserva na última coleta, quando comparada à cana-de-açúcar. A AChE não apresentou alteração significativa. Foram observados, ainda, em todos os pontos de coleta, alterações hepáticas como presença de melanomacrófagos livres, necrose, infiltração leucocitária, alteração dos núcleos dos hepatócitos e diferenciação tecidual. Na contagem de micronúcleos em eritrócitos foi encontrada diferença entre o entorno e os demais pontos, na coleta de mar/07. Os dados obtidos neste trabalho permitem afirmar que há alteração nos biomarcadores analisados na área produtiva de cana e até mesmo na RPPN, e que essas alterações podem ter sido causadas pela administração de herbicidas como o glifosato e o diuron, mas não se descarta a hipótese de haver exposição múltipla da RPPN a vários xenobiontes provenientes do cultivo de cana-de-açúcar vizinho.

ABSTRACT

Private Reserves of Natural Heritage (RPPN) are a kind of Protected Areas in which several environmental impacts can occur, therefore biomonitoring studies should be developed in these areas. The present study aimed to evaluate the impact of pesticides in RPPN "Fazenda Barbacena" (Barbacena Farm), in São Pedro do Ivaí, Paraná State, using environmental contamination biomarkers in order to contribute to the development of strategies to minimize the possible impacts in RPPN. The biochemical biomarkers (enzymatic activity of Acetylcholinesterase - AChE, Glutathione S-transferase - GST, Catalase - CAT and Lipid Peroxidation - LPO), the liver histopathology and Piscine Micronucleus Test were analyzed in *Astyanax* sp. in September/2006 and March/2007. The specimens of *Astyanax* sp. (N=30) were collected at each sampling point: (1) sugarcane farming; (2) around the producing area with the RPPN (3) in the interior of RPPN. The blood samples were collected in order to carry out the micronucleus test, liver samples were collected to GST, CAT, LPO analysis and histopathology and muscle samples for AChE activity assay. The biochemical results were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed of Tukey post-test, to comparison among the groups. The results of histopathologic rates and nuclear alterations were analyzed by Kruskal-Wallis test. For all the tests was considered a significance level of 5%. It was observed an increase in CAT activity in Sept/06 sample in group 3, when compared to groups 1 and 2. LPO increased in group 2 in Sept/06 when compared to groups 3 and 1, and in March samples when compared to the others. There was also an increase in GST around the producing area with the RPPN in the last sampling, when compared to sugarcane farming. AChE did not present any significant alteration. It was observed, in all the points, liver alteration as presence of free melano-macrophages, necrosis, leukocyte infiltration, hepatocytes nuclear alterations and tissue differentiation. The erythrocytes micronucleus counting was different in the group 2 compared to the others in March/07 sampling. The results showed a change in sugarcane farming area and in the RPPN. It may have been caused by herbicide administration such as glyphosate and diuron, but there cannot be discarded the hypothesis of multiple exposure of the RPPN to a various xenobiotics from the sugarcane farming in the neighbourhood area.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Movimento dos pesticidas em ambientes aquáticos	06
FIGURA 2 - Fórmula estrutural do Glifosato (C ₃ H ₈ NO ₅ P) - (N-phosphonomethyl)glycine)	08
FIGURA 3 - Fórmula estrutural do Diuron (C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O) - (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea)	10
FIGURA 4 - Representação esquemática das vias de desintoxicação e de possíveis efeitos moleculares decorrentes de uma alteração no sistema biológico	16
FIGURA 5 - Esquema representativo da localização da RPPN Fazenda Barbacena, São Pedro do Ivaí, Paraná, Brasil	28
FIGURA 6 - Imagens da RPPN e dos pontos de coleta na Fazenda Barbacena, São Pedro do Ivaí, Paraná	29
FIGURA 7 - Representação da RPPN e dos pontos de coleta na Fazenda Barbacena, São Pedro do Ivaí, Paraná	30
FIGURA 8 - Atividade específica (AE) da GST (nmol.min ⁻¹ .mgproteína ⁻¹) no fígado de <i>Astyanax</i> sp., nos grupos Cana de Açúcar, Entorno e RPPN	37
FIGURA 9 - Atividade específica (AE) da CAT (μmol.min ⁻¹ .mgproteína ⁻¹) no fígado de <i>Astyanax</i> sp, nos grupos Cana de Açúcar, Entorno e RPPN	38
FIGURA 10 - Concentração de hidroperóxidos (CP) (nmol.mgproteína ⁻¹) no fígado de <i>Astyanax</i> sp, nos grupos Cana de Açúcar, Entorno e RPPN	39
FIGURA 11 - Atividade específica (AE) da AchE (nmol.min ⁻¹ .mgproteína ⁻¹) no músculo de <i>Astyanax</i> sp, nos grupos Cana de Açúcar, Entorno e RPPN	39
FIGURA 12 - Atividade específica da GST (nmol.min ⁻¹ .mgproteína ⁻¹) e CAT (μmol.min ⁻¹ .mgproteína ⁻¹) no <i>Astyanax</i> sp, nos diferentes pontos amostrais (Cana de Açúcar, Entorno e RPPN)	41
FIGURA 13 - Atividade específica da AchE (nmol.min ⁻¹ .mgproteína ⁻¹) e concentração de hidroperóxido (nmol.mgproteína ⁻¹) no <i>Astyanax</i> sp, nos diferentes pontos amostrais (Cana de Açúcar, Entorno e RPPN)	42
FIGURA 14 - Cortes histológicos de fígado de <i>Astyanax</i> sp. coletados em corpos hídricos da Fazenda Barbacena, São Pedro do Ivaí, PR	44
FIGURA 15 - Cortes histológicos de fígado de <i>Astyanax</i> sp. coletados em corpos hídricos da Fazenda Barbacena, São Pedro do Ivaí, PR	45

FIGURA 16 - Índice de Lesão histopatológica em fígado de <i>Astyanax</i> sp., nos grupos Cana de Açúcar, Entorno e RPPN _____	46
FIGURA 17 - Índice de Lesão histopatológica em fígado de <i>Astyanax</i> sp., nos grupos Cana de Açúcar, Entorno e RPPN _____	46
FIGURA 18 - Alterações Nucleares e micronúcleos em eritrócitos de <i>Astyanax</i> sp., nos grupos Cana de Açúcar, Entorno e RPPN _____	47
FIGURA 19 - Eritrócitos de <i>Astyanax</i> sp. coletados na Fazenda Barbacena, São Pedro do Ivaí, PR _____	48
FIGURA 20 - Desenvolvimento da criação de RPPN na Mata Atlântica, de 1998 a 2006 _____	61

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Potencial de risco dos pesticidas glifosato e diuron _____	07
TABELA 2 - Ocorrência de lesões em fígado de <i>Astyanax</i> sp. coletados em setembro de 2006 e março de 2007, Fazenda Barbacena, São Pedro do Ivaí, PR _____	43
TABELA 3 - Representação das RPPN no bioma Mata Atlântica _____	60

LISTA DE ABREVIATURAS

AchE – Acetilcolinesterase
ATC – Iodeto de Acetilcolina
BHT – Hidroxitolueno Butilato
CAT – Catalase
CDNB – 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CHP – Concentração de Hidroperóxido
CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente
DTNB – Ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERO – Espécie(s) Reativa(s) de Oxigênio
FOX – do inglês *Ferrous Oxidation / Xylenol Orange Method*
GSH – Glutathiona Reduzida
GST – Glutathiona S-transferase
H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio
HO• – Radical Hidroxila
IAP – Instituto Ambiental do Paraná
IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICMS – Imposto sobre Circulação de Mercadorias e Serviços
IUCN – União Internacional para Conservação da Natureza
LPO – Peroxidação Lipídica (do inglês *lipid peroxidation*)
MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MMA – Ministério do Meio Ambiente
O₂•- – Ânion Superóxido
RPPN – Reserva Particular do Patrimônio Natural
SEMA – Secretaria do Estado do Meio Ambiente
SNUC – Sistema Nacional de Unidades de Conservação
UC – Unidade de Conservação

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 UNIDADES DE CONSERVAÇÃO E AS RESERVAS PARTICULARES DO PATRIMÔNIO NATURAL

A fragmentação é uma crescente ameaça aos ecossistemas naturais do Brasil, os quais vêm cedendo lugar a diversas atividades, principalmente a agropecuária. Combinado ao processo de fragmentação, ambientes naturais vêm sofrendo diferentes alterações, sendo que muitos distúrbios podem ser atribuídos a contaminantes ambientais, em especial aos pesticidas utilizados nas culturas de soja, milho, cana de açúcar e arroz (SILVA, 2004; ARMAS, 2005).

A interferência dos pesticidas nesses sistemas pode ser observada, também, em áreas protegidas e unidades de conservação. Unidades de Conservação (UC) são “porções do território nacional, incluindo as águas territoriais, com características naturais de relevante valor, de domínio público ou propriedades privadas, legalmente instituídas pelo Poder Público com objetivos e limites definidos, sob regimes especiais de administração e às quais se aplicam garantias de proteção” (FUNATURA, 1989).

Dada a pluralidade dos objetivos de conservação ambiental, faz-se necessário considerar tipos distintos de UC. Essas classes distintas são denominadas categorias de unidades de conservação, cada uma das quais atendendo prioritariamente a determinados objetivos (MILANO, 2000).

Em sua especificidade, as Reservas Particulares do Patrimônio Natural (RPPN) encontram-se inseridas em um quadro bastante complexo, no qual fragmentos vêm sendo protegidos por diversos proprietários rurais, sem, no entanto, possuírem um manejo que integre a área protegida com as características do entorno, em grande parte áreas agrícolas.

As RPPN são áreas privadas, naturais ou pouco alteradas, de tamanhos variáveis, que são oficialmente protegidas para conservação da biodiversidade e/ou outros atributos naturais considerados relevantes. Essas áreas são instituídas por manifestação e destinação dos proprietários, sendo reconhecidas pelo Estado, destinando-se de forma perpétua à conservação dos atributos que tornaram possível seu reconhecimento (SNUC, 2000).

Através do Decreto 4.262, o Estado do Paraná instituiu a categoria de manejo de conservação denominada RPPN (SEMA, 2007). Essa categoria de manejo foi criada em 1990, para legitimar as intenções conservacionistas de proprietários rurais. A Lei 9.985 de 2000, que aprovou o Sistema Nacional de Unidades de Conservação (SNUC), deu mais força às RPPN, tornando-as categoria de unidade de conservação. O decreto estadual nº4.890, de 31 de maio de 2005, dispõe sobre as RPPN como unidade de proteção integral inserida no Sistema Estadual de Unidades de Conservação, estabelecendo critérios e procedimentos administrativos para a sua criação e estímulos para a sua implementação. E em 2007, o decreto estadual nº1529 (chamado Estatuto das Terras Privadas) trouxe força à categoria, com a criação de incentivos à conservação da biodiversidade em áreas privadas.

Nesse sentido, as RPPN têm servido cada vez mais como instrumento adicional para o fortalecimento do sistema de conservação da natureza, permitindo em várias situações a manutenção de um grau mais elevado de conectividade da paisagem natural, assim como o incremento da representação de áreas prioritárias para a conservação, ainda não contempladas pela rede de áreas protegidas públicas (SEMA, 2007).

Sendo unidades de dimensões e características tão variáveis, os objetivos de manejo podem variar de RPPN para RPPN. Nas RPPN do Paraná podem ser implementadas atividades de pesquisa, educação ambiental e turismo em áreas naturais, com anuência do proprietário e devidamente autorizadas e licenciadas pelo Instituto Ambiental do Paraná (IAP). O objetivo primordial, contudo, das RPPN sendo interpretadas como de proteção integral no estado, deve ser o de conservação da biodiversidade. Tendo em vista o atendimento desse objetivo, muitas características ambientais devem ser consideradas na conservação das RPPN: a própria preservação da diversidade biológica; a proteção de espécies raras, endêmicas, vulneráveis ou em perigo de extinção; a preservação de recursos de flora e/ou fauna e de recursos hídricos; o incentivo à pesquisa científica; o incentivo à educação ambiental; a contribuição do monitoramento ambiental; entre outros (SNUC, 2000).

O Brasil conta, atualmente, com 800 RPPN cadastradas e averbadas em caráter perpétuo como determina o Decreto Federal nº 1.922/96 (dados de fevereiro de 2008). O Paraná possui 191 delas, perfazendo um total de 37.149,77 hectares de área conservada, distribuídas por 82 municípios (SEMA, 2007). Em sua especificidade, o ecossistema Floresta Estacional Semidecidual, ambiente foco

desse estudo, possui importantes fragmentos conservados como RPPN, entre eles a RPPN Estadual Fazenda Barbacena. A RPPN Fazenda Barbacena possui quase 555 ha, sendo considerado um dos mais importantes fragmentos da região. Está inserida em um mosaico de produção de cana de açúcar, no qual se aplicam, periodicamente, pesticidas recomendados para esse cultivo (glifosato e diuron).

As características citadas acima são suficientes para que as RPPN sejam, de fato, protegidas. A necessidade de compreender e manejar essas áreas é tarefa prioritária, já que, muitas vezes, as demandas sócio-econômicas (atividades industriais, agrícolas, turísticas, entre outras) tendem a colidir com os interesses conservacionistas.

Nesse sentido, o presente estudo visou o biomonitoramento da RPPN Fazenda Barbacena, possivelmente alterada pelo uso de contaminantes ambientais de origem agrícola, através da utilização de biomarcadores bioquímicos, morfológicos e genéticos em peixes, no intuito de contribuir para o desenvolvimento de estratégias efetivas de controle das possíveis alterações.

Embora o projeto tenha sido desenvolvido em uma área-piloto relativamente restrita, os resultados relativos ao manejo integrado da matriz (área de cultivo) com a área protegida são passíveis de utilização em outras porções da Floresta Atlântica, bem como em outros biomas brasileiros, desde que respeitadas suas particularidades.

1.2 CONTAMINAÇÃO EM AMBIENTES AQUÁTICOS

Poluentes são substâncias que causam desvio da composição normal de um ecossistema. Contaminantes ambientais, por sua vez, são substâncias presentes em quantidades maiores que a concentração natural, como um resultado da atividade humana e que apresentam um efeito de prejuízo ao ambiente (ODUM, 1988). Os ecossistemas aquáticos são considerados receptores finais de poluentes liberados no ambiente, estando susceptíveis a ação de contaminantes ou poluentes aéreos, que chegam aos corpos d'água por deposição atmosférica, e contaminantes ou poluentes terrestres, os quais atingem os ambientes aquáticos através do escoamento pelas chuvas.

As principais fontes de impacto ambiental nesses ambientes seriam o escoamento de esgoto proveniente de áreas urbanas, a liberação de diversos produtos químicos (orgânicos e inorgânicos) pela atividade industrial e a agricultura. Em sua especificidade, os rios situados em regiões agropecuárias são susceptíveis aos impactos decorrentes da utilização de pesticidas. Os pesticidas podem ser categorizados consoante o seu objetivo de utilização, sendo os três mais importantes grupos os herbicidas, os inseticidas e os fungicidas (SINDAG, 2003). Para o presente projeto, foi considerada, principalmente, a categoria dos herbicidas.

Existe uma discussão em relação ao próprio nome dado aos produtos utilizados no controle de pragas, doenças e plantas daninhas na agricultura. Segundo as indústrias produtoras dos produtos para este fim, a denominação é produtos fitossanitários ou defensivos agrícolas (SINDAG, 2003). Por ocasião da promulgação da Lei Federal – 7802 de 11 de julho de 1989 sobre o tema instituiu-se o termo agrotóxico. Internacionalmente, contudo, o termo mais utilizado é pesticida.

De acordo com o Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, que regulamenta a Lei nº7802/1989 acima citada, os pesticidas são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias de produtos empregados como desfolhantes, desseccantes, estimuladores e inibidores de crescimento (SINDAG, 2003).

No passado, os organismos indesejáveis à agricultura eram controlados através da aplicação de pequeno número de compostos inorgânicos à base de cobre e arsênico, além de alguns inseticidas de ocorrência natural, como as piretrinas. Até a II Guerra Mundial o desenvolvimento e uso efetivo de compostos orgânicos foram lentos, porém, com a descoberta da propriedade inseticida do dicloro-difenil-tricloroetano, o DDT, iniciou-se a expansão e desenvolvimento de uso, característico dos últimos 40 anos. Em função do modelo de agricultura adotado a partir desse período, baseado no uso intenso de pesticidas, estas substâncias passaram, então, a ser amplamente utilizadas (ANVISA, 2004).

Não se pode negar que esses produtos possibilitaram o aumento da produtividade agrícola, entretanto, seu uso desordenado e excessivo vem provocando diversos impactos sobre o meio ambiente. No ambiente aquático, os pesticidas podem sofrer transformações através de reações fotoquímicas e químicas como oxirredução e hidrólise, além de transformações biológicas ocorridas nos organismos. A transformação desses compostos pode ser mais ou menos tóxica que o produto original (RAND e PETROCELLI, 1985).

A Figura 1, extraída de Tomita (2002), demonstra a movimentação dos pesticidas no ambiente. Processos de lixiviação, precipitação, volatilização e escoamento são conhecidos por influenciar o comportamento dos herbicidas no meio que atuam, sendo que os pesticidas podem alcançar os ambientes aquáticos através da aplicação intencional, deriva e escoamento superficial a partir de áreas onde ocorreram aplicações. O destino de um pesticida é decidido através da combinação de efeitos de processos físico-químicos e biológicos, que causam a transformação e/ou a degradação do produto. Esses processos podem transformar o produto de molécula inicial em uma série de produtos secundários, definindo seu comportamento no ambiente (BLUS,1995). O transporte de pesticidas na água por escoamento superficial ou enxurrada tem sido considerado como um dos maiores meios de contaminação de rios e lagos (GAYNOR *et al.*, 1995).

Os resíduos provenientes dos pesticidas presentes na água podem tornar-se aderidos ao material em suspensão, depositados no sedimento ou absorvidos pelos organismos. Peixes e invertebrados podem acumular pesticidas em grande concentração em relação ao meio em que vivem, pois tais compostos podem se ligar à matéria ingerida ou serem passivamente absorvidos durante as trocas respiratórias. Quanto mais lipofílico, maior a facilidade com que o pesticida será absorvido pelos organismos aquáticos. Tamanho, sexo e idade do organismo podem afetar a taxa de absorção, além disso o mesmo composto pode ser absorvido em diferentes concentrações (RAND e PETROCELLI, 1985).

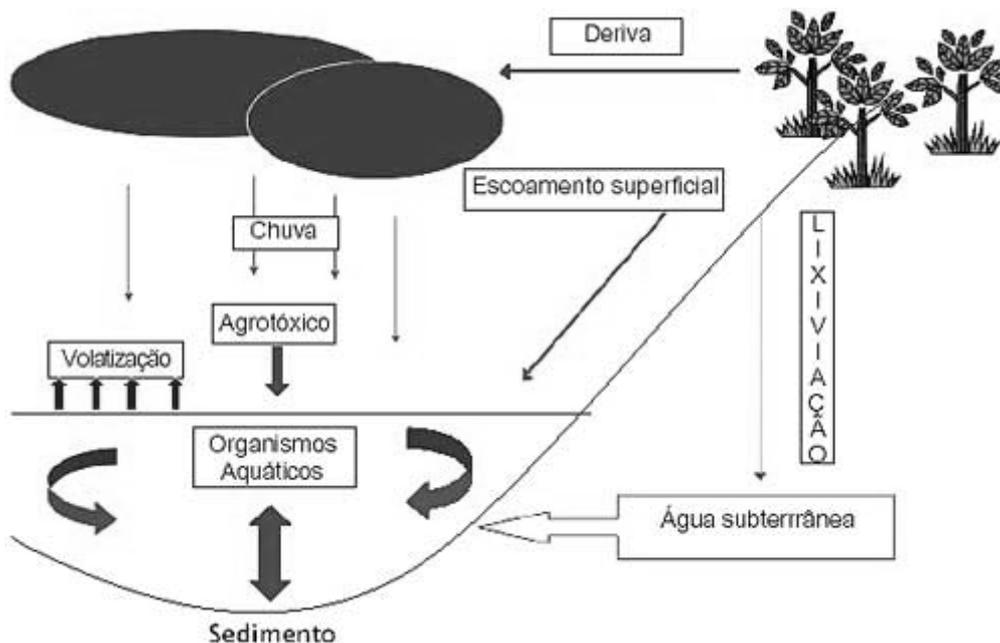


Figura 1 - Movimento dos pesticidas em ambientes aquáticos.
 Fonte: Tomita, R. Y. 2002. O Biológico.

Os pesticidas que merecem destaque no presente trabalho são herbicidas comumente utilizados na cultura de cana-de-açúcar: Glifosato e Diuron. Segundo Armas (2005), a cultura da cana-de-açúcar respondeu, em 2002, por 11,5% das vendas de pesticidas no Brasil, atrás somente da soja. Em 2003, a cultura representou 8,0% das vendas, ocupando a 4ª posição, movimentando 251 milhões de dólares.

A cana-de-açúcar (*Sccharum* sp.) pertence à família Poaceae (Gramineae) e sua origem geográfica é atribuída ao Sudoeste Asiático, Java, Nova Guiné e também a Índia. Atualmente a cana-de-açúcar, além de produzir açúcar, álcool e aguardente, tem os subprodutos bagaço, vinhaça e torta de filtro de grande importância socioeconômica na geração de energia, produção de ração animal, produtos aglomerados e fertilizantes.

O surpreendente aumento do plantio de cana-de-açúcar, ocorrido no Brasil no ano de 2001, foi decisivo para mudar radicalmente as perspectivas para o mercado mundial de açúcar, o que significou, em outras palavras, um maior investimento na tecnologia de produção, incluindo o uso de defensivos químicos (SILVA, 2004).

Por outro lado, o sistema de produção da cana de açúcar provoca ainda impactos desconhecidos sobre o meio aquático, mesmo que com um manejo adequado de aplicação de pesticidas. O carreamento de nutrientes e de pesticidas, que podem ser lixiviados e conduzidos para corpos hídricos nas proximidades da

plantação ou mesmo para canais de linhaça, originando a perda de recursos materiais e financeiros, e pode impactar o meio, afetando as populações que fazem uso das águas dos corpos receptores (CAVENAGHI *et al.*, 2002).

A Tabela 1 mostra o potencial de risco dos pesticidas glifosato e diuron, segundo Duarte (2003). Segundo o autor, o diuron possui maior capacidade de mobilidade disperso em água, enquanto que o glifosato possui alto potencial de transporte associado ao sedimento.

TABELA 1 - POTENCIAL DE RISCO DOS PESTICIDAS GLIFOSATO E DIURON

SUBSTÂNCIA	SOLUBILIDADE	K _{oc}	DT ₅₀
Diuron	A (42 mg/l)	N	A (90 dias)
Glifosato	A (900.000 mg/l)	N	A (47 dias)

FONTE: Duarte (2003)

NOTA: N = não atende ao crítico;

A = atende ao crítico como potencial perigoso;

Solubilidade em água: quando A, Sol. em água > 30mg/l (segundo a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos - EPA);

DT₅₀ = meia vida (quando A, o DT₅₀ > 2-3 semanas, segundo EPA);

K_{oc} = coeficiente de adsorção à matéria orgânica do solo (quando A, o K_{oc} < 300-500, segundo EPA).

Em âmbito nacional, não há limites legais estabelecidos para a interação de pesticidas no ambiente. No entanto, a resolução do CONAMA nº357/05 trás os limites para o glifosato em água, apesar de não indicar limites para o diuron. No caso do glifosato, a resolução aponta o limite de 65 µg/L para águas de Classe I (indicadas para consumo humano; recreação de contato primário; irrigação de hortaliças e proteção de comunidades aquáticas) e 280 µg/L para Classe III (irrigação de culturas arbóreas, cerealíferas e forrageiras; pesca amadora; recreação de contato secundário e dessedentação de animais). No caso das águas de Classe I, definidas como aquelas no interior de unidades de conservação de proteção integral (aqui entram as RPPN, portanto) e para abastecimento humano e proteção do equilíbrio natural das comunidades aquáticas, é vedado o lançamento de efluentes ou disposição de agricultura.

No Brasil há, também, normas e critérios para a realização de testes preliminares para a avaliação ecotoxicológica de pesticidas. Estes testes consistem em estudos de biodegradabilidade, adsorção e mobilidade. Estudos que avaliem o comportamento e destino dos pesticidas em solos de regiões tropicais são limitados,

entretanto, existem aqueles efetuados em regiões de clima temperado (AMARANTE e SANTOS, 2002).

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) estabelece limite de 700 µg/L de glifosato em água potável como “limite consultivo de saúde”. A Comunidade Européia, por sua vez, estabelece como “concentração máxima admissível” para pesticidas em água potável, como substâncias individuais, o limite de 0,1 g/L, desde que a concentração total de pesticidas não ultrapasse 0,5 g/L.

1.2.1 Glifosato

O herbicida glifosato (N-(fosfometil)glicina), não-seletivo e sistêmico, representa 60% do mercado mundial de herbicidas não seletivos (SMITH, 1992). Foi criado em 1950 como um potente agente complexo e, a partir de 1971, quando sua ação herbicida foi descoberta, passou a ser largamente utilizado. Desde então, três principais tipos de glifosato vêm sendo comercializados: glifosato-isopropilamônio, glifosato-sesquisódio (patenteados pela empresa Monsanto e vendido como Roundup) e glifosato-trimesium (patenteado pela empresa ICI, atual Syngenta). O glifosato é indicado no controle de monocotiledôneas ou dicotiledôneas, em culturas de arroz irrigado, cana-de-açúcar, café, citros, maçã, milho, pastagens, soja (plantio direto ou indireto), fumo e uva (ANVISA, 2006). Sua fórmula estrutural pode ser vista na Figura 2.

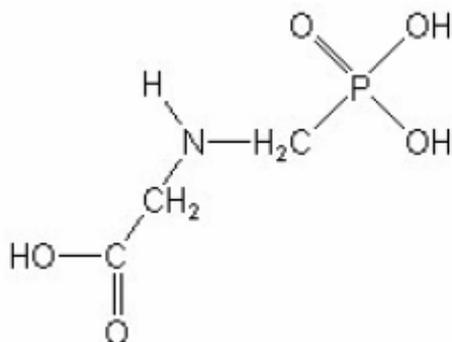


Figura 2 - Fórmula estrutural do Glifosato (C₃H₈NO₅P) - (N-(phosphonomethyl)glycine) – (ANVISA, 2006).

O presente estudo tem como alvo a discussão da marca Roundup, considerando que a Usina Vale do Ivaí, administradora da RPPN foco desse estudo, utiliza tal produto. Além da substância ativa, o glifosato, o Roundup apresenta como ingredientes inertes água e um surfactante, o polioxietilenamina, que ajuda o glifosato a penetrar na folha das plantas, sendo assim um herbicida ativo (PASTRO, 1995). Segundo informações da empresa, eventualmente também se utiliza na produção da cana a marca Milênia (glifosato Trop), que segue as mesmas especificações que o Roundup.

Segundo Pastro (1995), a ação herbicida do Roundup se dá pelo bloqueio da síntese de um aminoácido aromático essencial e do metabolismo de compostos fenólicos, influenciando diretamente a síntese protéica e a formação dos tecidos da planta, resultando em parada do crescimento, disfunção celular e conseqüente morte da planta.

Segundo a ANVISA (2006), o glifosato possui classificação toxicológica IV. Estudos sobre a degradação do princípio ativo glifosato indicam que a taxa de biodegradação pode variar substancialmente, dependendo das condições ambientais em estudo (PASTRO, 1995). Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 1994), o tempo necessário para a biodegradação do glifosato em água, sob condições aeróbias, é inferior a 14 dias, enquanto que em condições anaeróbias esse tempo varia entre 14 e 21 dias. Ainda segundo a WHO (1994), o glifosato é pouco bioacumulável em organismos aquáticos devido a sua alta solubilidade em água e caráter iônico. O estudo de Duarte (2003), por outro lado, mostrou que dependendo das condições do terreno o glifosato pode ficar presente no solo por 47 dias.

Apesar do glifosato ser citado como pouco tóxico, há evidências de efeitos deletérios no ambiente, principalmente devido ao uso prolongado e sistemático do herbicida. Segundo Amarante e Santos (2002), as concentrações mais altas de glifosato e seu metabólito, o ácido aminometilfosfônico (AMPA), têm sido encontradas no solo. A ocorrência de glifosato em água subterrânea é citada com pouca freqüência, mas já foi constatada no estado do Texas, EUA, por Hallberg (1989), mas a concentração medida não foi especificada. Como o glifosato é bastante solúvel em água e em pH próximo à neutralidade se complexa com íons Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} e Cu^{2+} , em corpos hídricos ele é carregado para o fundo onde se adere fortemente às partículas de sedimento (PASTRO, 1995). Para Hallberg (1989)

ainda, a aplicação direta como herbicida em águas superficiais pode ser responsável pela presença de glifosato em água potável.

1.2.2 Diuron

O diuron (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetiluréia) é um herbicida não ionizável, com baixa solubilidade em água (42mg/L a 25°C) e é aplicado em pré-emergência no controle de plantas daninhas associadas principalmente à cultura de cana-de-açúcar (MUSUMECI *et al.*, 1995). É um herbicida do grupo dos derivados da uréia (feniluréias) e tem o 3,4-dicloroanilina como um dos principais produtos do seu metabolismo. Trata-se de metabólito persistente no solo e em ambientes aquáticos (GEISSBUHLER *et al.*, 1975).

Segundo Rao e Davidson (1982), o diuron possui tempo de meia-vida no solo (DT₅₀) de 328 + 212 dias, enquanto que para Duarte (2003) esse período é de 90 dias. Sua ação como herbicida se dá por inibir a reação de Hill do fotossistema II, bloqueando a fluência elétrica do acceptor primário Q, para a proteína D1 (TEISSEIRE e VERNET, 2000). Sua fórmula estrutural pode ser vista na Figura 3.

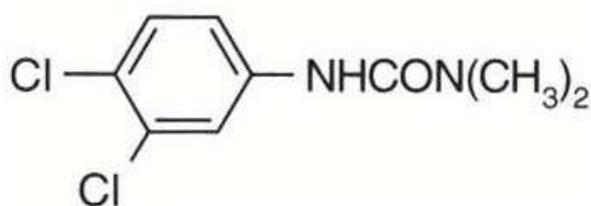


Figura 3 - Fórmula estrutural do Diuron (C₉H₁₀Cl₂N₂O) - (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea) - (ANVISA, 2006).

Segundo Silva (2004), o diuron sendo analisado pelo potencial de lixiviação, segundo o critério de Goundwater Ubiquity Score – GUS (índice de GUS, pelo qual os pesticidas podem ser classificados em função dos (a) produtos que possuem potencial não lixiviador - valor de GUS=1,8; (b) intermediário - valor de 1,8<GUS<2,8; e (c) lixiviador - GUS=2,8); apresenta-se com potencial intermediário de lixiviação, com GUS=2,58.

Outra característica relatada do diuron é sua possível toxicidade a organismos do solo e a organismos aquáticos. Nebeker e Schuyttema (1998) estudaram o efeito crônico do diuron em peixes e invertebrados e constataram que a sobrevivência e reprodução de *Daphnia pulex* foi reduzida significativamente quando a concentração de diuron na água era de 7,7 mg/L.

1.3 BIOMONITORAMENTO

Segundo Shugart *et al.* (1992), biomonitoramento consiste no monitoramento de uma área possivelmente impactada através do estudo de uma ou mais espécies (bioindicadores). Através de programas de monitoramento é possível identificar e acompanhar impactos antropogênicos em determinadas áreas ao longo do tempo (LANGE *et al.*, 1996).

Inicialmente, os estudos de monitoramento focavam a detecção de contaminantes no compartimento abiótico de ambientes aquáticos (coluna d'água e sedimento) (RAINBOW *et al.*, 1995; VAN DER OOST *et al.*, 1996; SILVA *et al.*, 2001). Posteriormente, começou-se a avaliar a presença de xenobiontes nos componentes bióticos desses ecossistemas (KEHRIG *et al.*, 1998; SCHMITT *et al.*, 1999; WATANABE *et al.*, 1999). Estudos de biomonitoramento direcionados a detecção e avaliação de efeitos em organismos vivos são, portanto, bem mais recentes (DORAN *et al.*, 2001; NASCI *et al.*, 2002; MONTEIRO *et al.*, 2005).

A utilização de parâmetros biológicos nesses estudos possibilita a avaliação de áreas impactadas, através de estudos com biomarcadores. Van Der Oost *et al.* (2003), caracterizou o termo biomarcador como “qualquer resposta biológica correspondente a uma exposição, efeito, ou susceptibilidade dos indivíduos aos agentes químicos e/ou estressores ambientais”. Peakall (1999) já havia também definido biomarcador como qualquer resposta biológica a químicos ambientais em um indivíduo ou em parte dele, a qual demonstre uma alteração do estado normal do organismo. Os biomarcadores permitem detectar, portanto, uma contaminação ambiental, avaliar a magnitude da contaminação e identificar espécies ou populações em risco de contaminação (WALKER *et al.*, 1996).

Por outro lado, o termo bioindicador foi definido como as informações retiradas de um organismo que revelam as condições ambientais medidas no seu

habitat natural, ou mesmo o organismo como um todo (SHUGART *et al.*, 1992; VAN DER OOST *et al.*, 2003).

A utilização de bioindicadores se vê necessária quando valores atuais ou valores de entrada de um dado sistema se diferem de valores considerados padrões. Nisso baseia-se a principal diferença entre o monitoramento de parâmetros físicos e químicos do uso de bioindicadores de fatores ambientais (WALKER *et al.*, 1996).

Determinadas características devem ser consideradas na utilização de bioindicadores: (1) a espécie deve ser representativa da área de estudo; (2) deve possuir hábito preferencialmente sedentário ou de baixa mobilidade, para que possa refletir as condições da região em estudo (RADTKE, 1979); (3) os organismos bioindicadores devem ser de fácil identificação e coleta e (4) o nível trófico da espécie a ser utilizada também deve ser avaliado, pois espécies que ocupam níveis tróficos superiores geralmente são mais representativas, uma vez que podem fornecer informações relacionadas aos fenômenos de bioacumulação e biomagnificação (OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 1999).

Segundo Silva Filho *et al.* (2000), vários trabalhos utilizam os peixes como bioindicadores, na tentativa de avaliar efeitos tóxicos de diversos contaminantes, dentre eles os pesticidas de forma geral (SILVA *et al.*, 2001; NASCI *et al.*, 2002; SVÄRDH, 2003; OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2005; AMADO *et al.*, 2006; ZANETTE *et al.*, 2006).

Os diferentes padrões de alterações, inerentes a cada composto e a cada organismo, possibilitam que os efeitos de vários pesticidas possa ser distintamente analisados em organismos, por meio de uma resposta biológica desses em relação aos poluentes, considerando que estes efeitos são precedidos por mudanças sub-letais em moléculas e células. Assim, a utilização de parâmetros biológicos (bioindicadores) possibilita a avaliação de ambientes aquáticos ditos impactados e o biomonitoramento de áreas protegidas, através de estudos com biomarcadores. O bioindicador escolhido para esse estudo foi o lambari do gênero *Astyanax* sp.

Apesar da importância dessas ferramentas, há escassez de trabalhos que relacionam diferentes biomarcadores, bioindicadores tropicais e efeitos de contaminantes, em especial nos peixes (OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2000).

Existem três principais situações que requerem biomonitoramento: (1) onde existam razões para se acreditar que espécies nativas estão sendo ameaçadas; (2) quando há implicações para a saúde humana quanto ao consumo de organismos

potencialmente afetados e (3) quando existe o interesse em conhecer a qualidade ambiental (DA SILVA *et al.*, 2003).

O presente projeto realizou um estudo de campo, na região noroeste do estado do Paraná, Brasil, avaliando a possibilidade de danos causados pela administração de pesticidas no entorno imediato de uma área natural protegida, a RPPN Fazenda Barbacena, mais especificamente alterações causadas sobre grupos de lambari.

1.3.1 Biomarcadores

Segundo Giesy e Graney (1989) existem muitos níveis de organização que podem ser afetados por poluentes, sendo que, em cada um destes níveis, existem processos que podem ser empregados para monitorar ou prever os efeitos destes poluentes nos organismos. Dentre estes processos ou mecanismos, pode-se pensar que os biomarcadores devam ser empregados como respostas sensíveis e/ou específicas das alterações que acontecem nas diferentes espécies.

Durante décadas os efeitos de poluentes sobre o ambiente aquático foram avaliados pelo monitoramento de mudanças ambientais em cada nível de organização do ecossistema como, populações, comunidades e o ecossistema propriamente dito. Entretanto, estes estudos eram limitados, pois vários efeitos importantes podiam ocorrer simultaneamente. A toxicologia ambiental passou a estudar o ambiente de uma forma mais complexa, utilizando marcadores para cada nível de organização. Estes marcadores, bioquímicos, fisiológicos, genéticos, histológicos e comportamentais, devem apresentar habilidade de medir diferentes respostas em relação à presença de estressores distintos (HUGGETT *et al.*, 1992).

De acordo com Van Der Oost *et al.* (2003) existem dois tipos de biomarcadores: aqueles que indicam um efeito direto na exposição do organismo a uma substância química (biomarcadores específicos) e aqueles que indicam qualquer alteração diferente do normal, não se podendo correlacionar exclusivamente com exposição a uma determinada substância (biomarcadores inespecíficos). Os primeiros podem também ser classificados como biomarcadores de efeito, e os segundos, como biomarcadores de exposição. A especificidade dos

biomarcadores aos químicos varia grandemente e tanto os específicos como os não específicos têm sua importância na avaliação do risco ambiental.

Como comentado, a avaliação de contaminação de ambientes aquáticos através de biomarcadores tem sido bastante utilizada em estudos de biomonitoramento (STURM *et al.*, 1999; LIONETTO *et al.*, 2003; GALLOWAY *et al.*, 2004; ZANETTE *et al.*, 2006). A utilização de biomarcadores pertencentes a dois ou mais níveis de organização biológica como realizado por Amado *et al.* (2006) e Camargo e Martinez (2006), vem também crescendo nos últimos anos, possibilitando a obtenção de diferentes tipos de respostas que podem ser comparadas e confrontadas. Este tipo de abordagem proporciona um diagnóstico mais preciso e confiável da situação da área estudada e representa a tendência atual em estudos de biomonitoramento.

Por detectarem alterações enzimáticas, os biomarcadores bioquímicos são considerados como sistemas de aviso precoce, indicando a contaminação do ambiente antes que ocorram danos mais severos aos organismos e, possivelmente, ao ecossistema (MCCARTHY e SHUGART, 1990). Dentre os biomarcadores bioquímicos que merecem destaque neste projeto estão a atividade da GST (Glutathione S-transferase), da CAT (Catalase), da AchE (Acetilcolinesterase) e também a lipoperoxidação (LPO).

Os biomarcadores morfológicos, por sua vez, auxiliam na detecção da presença de xenobiontes em ambientes aquáticos, sendo altamente recomendada sua utilização em estudos de biomonitoramento ambiental e diagnóstico de áreas impactadas (AKAISHI *et al.*, 2004). Nesse trabalho, a histopatologia de fígado foi utilizada para complementar o estudo do bioindicador *Astyanax* sp.

A interferência de compostos tóxicos na integridade e funcionamento do DNA, além da formação de adutos de DNA e anomalias nucleares, vêm sendo cada vez mais utilizada em estudos de biomonitoramento (AL-SABTI, 1986; MINISSI *et al.*, 1996; OBE *et al.*, 2002; FERRARO *et al.*, 2004; CESTARI *et al.* 2004). Sendo assim, o presente estudo utilizou o Teste de Micronúcleo Píscico como biomarcador genético, no intuito de relacionar os danos fisiológicos causados por pesticidas com aqueles sofridos no material genético dos indivíduos.

As alterações histopatológicas, juntamente com os parâmetros bioquímicos e genéticos, permitem analisar, portanto, respostas agudas e crônicas aos agentes estressores, assim como estabelecer o grau de toxicidade dos contaminantes.

1.3.1.1 Biotransformação e Estresse Oxidativo

A transformação metabólica (biotransformação) dos compostos químicos nos organismos é essencial para alterar a atividade biológica do composto e, conseqüentemente, cessar a interação entre o elemento químico e a célula. A biotransformação inclui numerosos sistemas enzimáticos diferentes, os quais atuam em diversos tipos de substratos. Muitas destas enzimas têm em comum a função de converter estruturas tóxicas para menos tóxicas, e converter químicos lipofílicos em estruturas hidrofílicas, que são mais rapidamente excretadas (HANG *et al.*, 2004).

Os biomarcadores bioquímicos mais amplamente utilizados em programas de monitoramento ambiental são as enzimas envolvidas na biotransformação de xenobióticos e seus metabólitos (enzimas de biotransformação e enzimas antioxidantes). Em peixes, como nos demais vertebrados, o fígado é o órgão mais comumente envolvido na desintoxicação desses compostos (VERMEULEN *et al.*, 2002). Sabe-se, ainda, que o fígado é o principal órgão responsável pelo metabolismo de xenobióticos em vertebrados. Isso porque as células do parênquima hepático, os hepatócitos, tornaram-se especializadas na remoção de substâncias tóxicas; na sua biotransformação e no lançamento dos produtos de biotransformação na circulação para posterior excreção (RODRIGUES, 2003).

O oxigênio é indispensável para a vida da maioria dos organismos, sendo utilizado como substrato de muitas enzimas. Muitas das reações nas quais esse elemento é utilizado geram as chamadas espécies reativas de oxigênio (ERO ou ROS). Uma condição para o desenvolvimento da vida aeróbica é a presença de mecanismos de desintoxicação das ERO (STOREY, 1996). A produção excessiva e desregulada de ERO pode ter graves conseqüências às células, contudo, em baixas concentrações, as ERO (e ainda as ERN: espécies reativas de nitrogênio) têm importante papel no contexto biológico. Elas são importantes reguladores fisiológicos na sinalização celular, participando de processos envolvidos na proliferação celular, relaxamento endotelial, destruição de patógenos, apoptose, etc. (PALMER *et al.*, 1987; MANNICK e SCHONHOFF, 2002).

Muitos tipos de defesas estão envolvidos nesses processos, constituindo o chamado Sistema de Defesas Antioxidantes (SDA). Estes sistemas têm funções de prevenção, reparação e interceptação das ERO e podem ou não ser catalisados por enzimas. Um SDA do tipo enzimático inclui a Catalase (CAT).

Já o estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio intracelular entre a geração e os níveis normais que formam os mecanismos de defesa aos agentes oxidantes numa dada espécie (SIES, 1985). O aumento na concentração das ERO pode levar a um aumento ou a inibição na atividade dos sistemas enzimáticos de proteção.

O estresse oxidativo pode estar relacionado a danos em diversos níveis tais como: mutagênese, carcinogênese, lipoperoxidação e a oxidação e fragmentação de proteínas e carboidratos (SIES, 1985). Vários estudos de biomonitoramento ambiental relacionam o grande aporte de diversas classes de poluentes com a geração dessas ERO destacando inúmeras conseqüências aos organismos aquáticos e aos seus respectivos ecossistemas (MALINS *et al.*, 1988; BAINY *et al.*, 1996; TORRES *et al.*, 2002). Os efeitos mediados pela oxidação, assim como suas respostas adaptativas, como o aumento da atividade de enzimas antioxidantes e concentração de componentes não enzimáticos, são potentes biomarcadores (VERMEULEN *et al.*, 2002). A Figura 4 traz uma representação das vias de desintoxicação e de possíveis efeitos decorrentes de uma alteração nesse sistema.

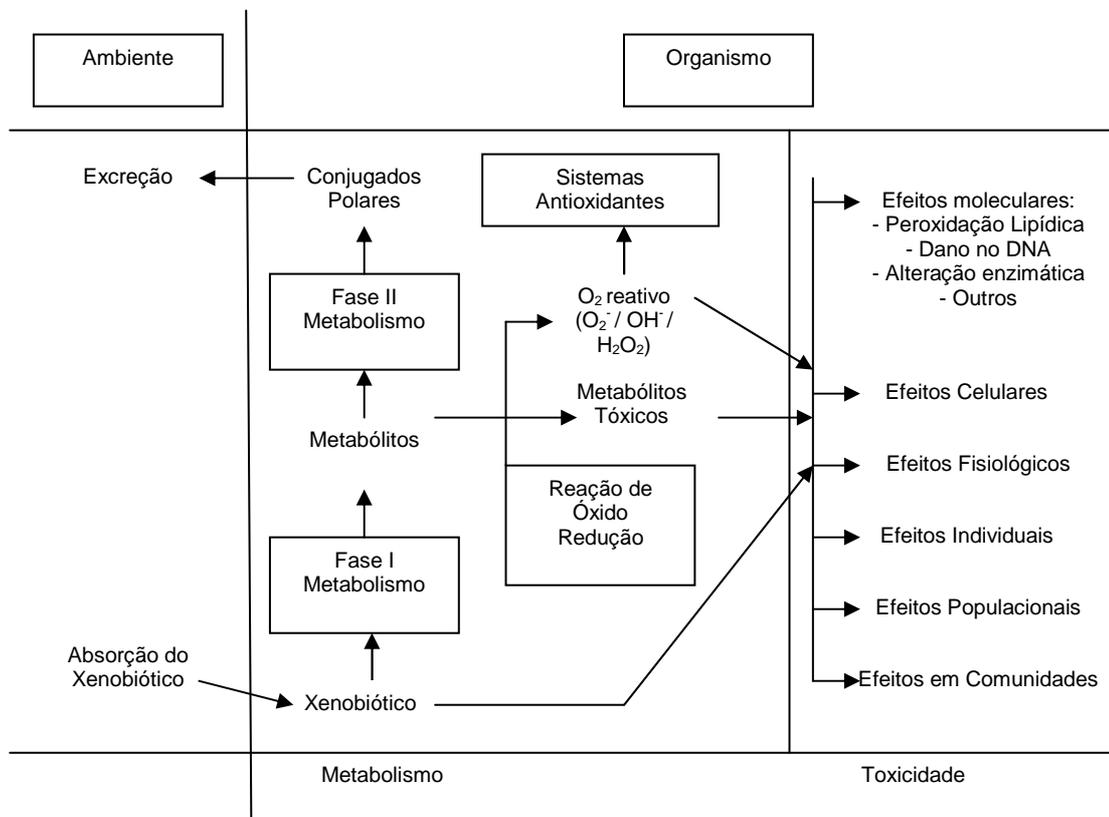


Figura 4 - Representação esquemática das vias de desintoxicação e de possíveis efeitos moleculares decorrentes de uma alteração no sistema biológico.

FONTE: Van Der Oost *et al.* 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment. *Envir. Toxicol. Pharmacol.*

Glutathione S-transferase (GST)

A enzima Glutathione S-transferase (GST) pertence à fase II do metabolismo sendo responsável pela conjugação de componentes eletrofílicos ou oriundos da fase I com GSH (VERMEULEN *et al.*, 2002). A reação de conjugação realizada pela GST é importante às células, pois atua na hidrólise de substâncias lipofílicas, às quais podem ser excretadas como substâncias inertes no organismo. Essa superfamília de enzimas ocorre em seres procarióticos, plantas, moluscos, crustáceos, insetos, anfíbios, répteis, peixes e mamíferos (VAN DER OOST *et al.* 2003).

As GST são classificadas como alfa, mi, pi, e teta, de acordo com suas propriedades físicas, químicas e imunológicas. Cada classe de GST pode ser diferentemente induzida por poluentes ambientais. A família destas enzimas é caracterizada por ter uma ampla especificidade de substrato com baixa afinidade. Esta baixa eficiência catalítica teve importante papel na evolução das GST como agente desintoxicador de amplo espectro, tanto de componentes endógenos, quanto exógenos (TEW *et al.*, 1999).

A estimulação da enzima GST envolve reações de conjugação na presença de glutathione. O quociente entre a glutathione reduzida e a oxidada (GSH/GSSG) na célula é um bom indicador dos níveis de estresse oxidativo. A GST catalisa a conjugação da glutathione reduzida (GSH) com diversos tipos de xenobióticos ou componentes celulares danificados por espécies reativas de oxigênio (STOREY, 1996).

Animais aquáticos que habitam ambientes poluídos podem estar expostos a xenobióticos, os quais sofrem desintoxicação mediada pela glutathione na sua forma reduzida, catalisada pela enzima glutathione S-transferase. Esta enzima de biotransformação tem sido estudada em trabalhos de campo no monitoramento de poluentes de origem industrial e agrícola (CHO *et al.*, 1999). Induções da GST no tecido hepático de peixes foram observadas por George (1993).

Catalase (CAT)

Catalases são enzimas intracelulares localizadas nos peroxissomos, com a função de facilitar a remoção do peróxido de hidrogênio (H₂O₂), o qual se transforma

em oxigênio molecular (O_2) e água (H_2O) (reação: $H_2O_2 + O_2^{\bullet-} \rightarrow OH^- + HO^{\bullet} + O_2$) (STEGEMAN *et al.*, 1992). As catalases também são citadas como enzimas envolvidas na desintoxificação de alguns substratos, como fenol, alcoóis, ácido fórmico e formaldeído (NORDBERG e ARNÉR, 2001; ALBERTS *et al.*, 2002).

Um dos papéis antioxidantes das CAT é reduzir o risco de formação do radical hidroxila (HO^{\bullet}) a partir do H_2O_2 , via reação de Fenton ($H_2O_2 + Cu^+/Fe^{2+} \rightarrow OH^- + Cu^{2+}/Fe^{3+} + HO^{\bullet}$) (NORDBERG e ARNÉR, 2001) ou por reação com ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Apesar da baixa capacidade de difusão, o radical hidroxila é, provavelmente, a espécie reativa de oxigênio capaz de causar mais danos aos sistemas biológicos, segundo Diplock *et al.* (1998); Betteridge (2000); Nordberg e Arnér (2001).

Contudo, de acordo com Van Der Oost *et al.* (2003), pesquisas ainda são necessárias para elucidar melhor o mecanismo da CAT em peixes, o que não retira a importância dessa enzima como biomarcador de exposição em estudos de biomonitoramento.

Peroxidação Lipídica (LPO)

A peroxidação lipídica, lipoperoxidação ou oxidação de ácidos graxos polinsaturados é um processo fisiológico regular, considerando sua importância na maturação celular (SCHEWE *et al.*, 1986; MATSUI *et al.* 1997; VAN LEYEN *et al.*, 1998) e mobilização de lipídios (FEUSSNER *et al.*, 1995; 2001). Determinadas classes de contaminantes, contudo, podem acarretar em efeitos deletérios nesse processo (BENZIE, 1996; SEVANIAN e URSINI, 2000), levando a um comprometimento no funcionamento celular (KOZAR *et al.*, 1994; BAKER e KRAMER, 1999), destituição da função das membranas celulares e das organelas essenciais, tais como o processo de transporte, a manutenção de gradiente de metabólitos e íons e a transdução de sinais mediada por receptores (MEAGHER e FITZGERALD, 2000), com conseqüentes modificações estruturais dos complexos lipoprotéicos das membranas celulares (MASON *et al.*, 1997; GIROTTI, 2002).

A lipoperoxidação como conseqüência negativa do estresse oxidativo tem sido extensamente investigada (STEGEMAN *et al.*, 1992). Esse processo ocorre por uma reação em cadeia e demonstra a habilidade de um único radical propagar

reações bioquímicas deletérias (VERMEULEN *et al.*, 2002). Durante a lipoperoxidação os grupos hidroperóxidos ligam-se aos sítios hidrofóbicos dos ácidos graxos insaturados, tendo este processo uma dupla consequência: perturbação nas interações lipídicas, que levam a alterações estruturais das biomembranas e das lipoproteínas; e a formação de espécies reativas de oxigênio, que podem induzir a modificação secundária de outros constituintes da membrana (GIROTTI, 2002).

A lipoperoxidação tem se mostrado um potencial biomarcador de contaminação ambiental (STEGEMAN *et al.*, 1992), sendo relacionado com danos causados por estresse oxidativo (KAPPUS, 1987; REGOLLI *et al.*, 2005).

1.3.1.2 Neurotoxicidade

Acetilcolinesterase (AChE)

O termo colinesterase é normalmente utilizado para referir-se a soma da atividade da “pseudocolinesterase”, ou butirilcolinesterase, com a atividade da acetilcolinesterase, ou “colinesterase verdadeira”. Estas enzimas diferem na afinidade pelo substrato, bem como na velocidade de degradação deste e diferem na localização e concentração numa mesma espécie (SILVA DE ASSIS, 1998). Peixes possuem somente AChE no cérebro, enquanto no músculo ambas são encontradas (STURM *et al.*, 1999). A AChE está envolvida na desativação da acetilcolina na fenda sináptica, prevenindo o estímulo contínuo do neurônio, o que é vital para o funcionamento normal do sistema sensorial e motor (MURPHY, 1986).

A medida da atividade da AChE é muito utilizada para diagnosticar exposição a tóxicos anticolinesterásicos em peixes, e pode ser considerada um dos mais antigos biomarcadores (SILVA DE ASSIS, 1998; STURM, *et al.*, 1999). Van Der Oost *et al.* (2003), indicam que peixes expostos a pesticidas podem apresentar redução da atividade da acetilcolinesterase proporcional à concentração e ao tempo de exposição. A medida enzimática da colinesterase possibilita a detecção de efeitos toxicológicos subletais, principalmente de compostos organofosforados e carbamatos, mesmo sem a presença de sintomatologia clínica.

Além dos chamados inseticidas anticolinérgicos, outras classes de contaminantes ambientais, incluindo outros pesticidas, tem o potencial de inibir a

AchE (DAVIES e COOK,1993; GILL *et al.*, 1990a,b). Reddy *et al.* (1992), observaram em um estudo com exposição ao diuron (60 dias) uma modificação comportamental em peixes, com diminuição na movimentação dos opérculos e redução da locomoção. Os autores atribuíram essas mudanças a uma possível diminuição da atividade da AchE. Entretanto, ainda poucos trabalhos relatam a influência de exposição a herbicidas na atividade da AchE.

1.3.1.3 Histopatologia

Técnicas morfológicas como microscopia de luz têm sido utilizadas em trabalhos de toxicologia, já que permitem avaliar possíveis efeitos de xenobiontes em órgãos e tecidos alvos. Segundo Fent (1996), os efeitos nas estruturas das células e tecidos constituem um importante parâmetro a ser considerado na avaliação do potencial tóxico de contaminantes sobre os organismos vivos.

Wester e Canton (1991) relatam que através da morfologia é possível tanto revelar os órgãos alvos mais afetados quanto detectar a sensibilidade do organismo em relação aos níveis tóxicos dos contaminantes aos quais foram expostos. A histopatologia permite, ainda, diferenciar lesões promovidas por doenças daquelas induzidas por outros fatores ambientais como a exposição a poluentes (SCHWAIGER *et al.*, 1997).

O órgão alvo desse trabalho foi o fígado. O fígado, por representar o principal órgão responsável pelos mecanismos de biotransformação e bioativação de xenobiontes lipossolúveis, apresenta-se como um excelente alvo para estudos de danos resultantes da exposição a diferentes contaminantes (OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2002b, 2005; DAMEK-PROPRAWA e SAWICKA-KAPUSTA, 2003; PADROS *et al.*, 2003; AKAISHI *et al.*, 2004; RABITTO *et al.*, 2005).

O fígado desempenha variadas funções metabólicas, de estoque e de distribuição nos vertebrados. Genericamente, pode ser tratado como a maior glândula por produzir substâncias exócrinas não enzimáticas (GUILLOUSO *et al.*, 1990). É considerado o principal órgão que metaboliza e excreta substâncias xenobióticas, sendo, portanto, um dos primeiros órgãos a entrar em contato com os contaminantes após exposição trófica.

O fígado de teleósteos, de maneira geral, é formado por células do parênquima hepático (com forma oval até polígonos irregulares) que se encontram dispostas de forma concêntrica ao redor de capilares sanguíneos, os sinusóides. Seus núcleos são geralmente esféricos. Há regiões especializadas de membranas, com dois a quatro hepatócitos, que formam canalículos biliares que são canais intercelulares que recebem a bile por secreção celular. Vários canalículos formam o ducto biliar. Esses ductos convergem, por sua vez, para um ducto hepático que pode se abrir no duodeno ou alimentar a vesícula biliar, dependendo da espécie de peixe (TAKASHIMA e HIBIYA, 1995).

1.3.1.4 Genotoxicidade

Teste de Micronúcleo Písceo e Alterações Morfológicas Nucleares

O estudo de danos no DNA em nível cromossômico é uma parte essencial da genética toxicológica, uma vez que a mutação cromossômica é um evento importante na carcinogênese (RIBEIRO, 2003). Dentre as ferramentas para avaliação genotóxica, o Teste de Micronúcleo Písceo, com a análise das alterações nucleares, constituem ferramentas importantes devido à resposta clara e de rápida interpretação (HEDDLE *et al.*, 1991; BOMBAIL *et al.*, 2001).

Micronúcleos são formados pela condensação de fragmentos cromossômicos acêntricos ou por cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal durante a anáfase. Apesar do pouco conhecimento sobre os mecanismos que relacionam a formação dos micronúcleos em peixes com contaminantes ambientais, a contagem de micronúcleos e o registro de alterações morfológicas nucleares fornecem dados importantes nas avaliações de genotoxicidade em função da sua capacidade de detecção da presença de substâncias clastogênicas na água (AL-SABTI e METCALFE, 1995).

O teste do micronúcleo foi originalmente desenvolvido por Schimd (1975) para células da medula óssea de camundongos e foi adaptada por Hooftman e Raat (1982) para o estudo de células sanguíneas de peixes mantidos em laboratórios. O ensaio do micronúcleo em sangue periiférico é considerado, atualmente, um dos mais estabelecidos ensaios citogenéticos *in vivo* no campo da genética toxicológica

(FENECH, 2000). A técnica vem sendo cada vez mais usada em análises ambientais por demonstrar a sensibilidade dos peixes frente a diversos contaminantes, inclusive de origem orgânica (GRISOLIA e CORDEIRO, 2000; AYLLON e GARCIA-VAZQUEZ, 2003; AMADO *et al.*, 2006).

Ayllon e Garcia-Vazquez (2001) indicam que além da identificação de micronúcleos, a análise de anomalias nucleares deve ser incluída nos estudos de genotoxicidade em peixes por apresentar resultados mais confiáveis e completos, considerando que muitas vezes o micronúcleo pode ter baixa sensibilidade devido à baixa e também variável frequência de micronúcleos em peixes silvestres.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Biomonitorar a RPPN Fazenda Barbacena e área do entorno (região possivelmente alterada pelo uso de contaminantes aquáticos) através da aplicação de biomarcadores bioquímicos, morfológicos e genéticos em peixes.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar possíveis danos causados por contaminantes ambientais na RPPN Fazenda Barbacena através da medida da atividade da Glutathione S-transferase (GST) em *Astyanax* sp.;
- Avaliar possíveis danos causados por contaminantes ambientais na RPPN Fazenda Barbacena através da medida da atividade da Acetilcolinesterase (AChE) em *Astyanax* sp.;
- Avaliar possíveis danos causados por contaminantes ambientais na RPPN Fazenda Barbacena através da medida da atividade da Catalase (CAT) em *Astyanax* sp.
- Avaliar possíveis danos causados por contaminantes ambientais na RPPN Fazenda Barbacena através da concentração de Peroxidação Lipídica (LPO) em *Astyanax* sp.;
- Avaliar possíveis danos causados por contaminantes ambientais através da morfologia de células do fígado em *Astyanax* sp.;
- Avaliar possíveis danos causados por contaminantes ambientais através do Teste de Micronúcleo em *Astyanax* sp.;
- Contribuir com a elaboração de estratégias de minimização das possíveis alterações causadas por pesticidas em áreas do entorno das RPPN e/ou no interior dessa unidade a partir da discussão de instrumentos de gestão em áreas protegidas.

CAPÍTULO I: APLICAÇÃO DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS, MORFOLÓGICOS E GENÉTICOS EM *Astyanax* sp. NO BIOMONITORAMENTO DA RESERVA PARTICULAR DO PATRIMÔNIO NATURAL (RPPN) FAZENDA BARBACENA

I.1 INTRODUÇÃO

A fragmentação ameaça todos os ecossistemas nacionais, sendo que a Floresta Estacional Semidecidual do Paraná, ecossistema onde se encaixa essa proposta, não foge a esta regra, tendo cedido lugar a diversas atividades, principalmente às atividades agropecuárias. Combinado ao processo de fragmentação, esses ambientes vêm sofrendo diferentes alterações do seu estado natural, sendo que muitos distúrbios podem ser atribuídos a contaminantes ambientais, em especial aos pesticidas utilizados nas culturas de soja, milho e cana de açúcar (SILVA, 2004; ARMAS, 2005).

A interferência dos pesticidas nos sistemas naturais pode ser observada, também, em unidades de conservação. Em sua especificidade, as Reservas Particulares do Patrimônio Natural encontram-se inseridas em um quadro bastante complexo, no qual fragmentos vêm sendo protegidos por diversos proprietários rurais, sem, no entanto, possuírem um manejo que integre a área protegida com as características do entorno (em sua maioria áreas produtoras agrícolas, no caso do Paraná).

Os ambientes aquáticos inseridos em complexos agrícolas podem ser afetados diretamente pelo carreamento de pesticidas utilizados nessas áreas. Na RPPN Fazenda Barbacena, considerada um dos mais importantes fragmentos da Floresta Estacional Semidecidual do estado do Paraná, o entorno é composto por um mosaico de produção de cana de açúcar (no qual se aplicam, periodicamente, diferentes pesticidas recomendados para esse cultivo, em especial o glifosato e o diuron) combinada a nascentes que formam importantes corpos hídricos da região. A utilização de parâmetros biológicos nesses estudos de biomonitoramento possibilita a avaliação de áreas impactadas, através de estudos com biomarcadores (VAN DER OOST *et al.*, 2003).

Devido, portanto, à ampla utilização de contaminantes no entorno dessas áreas e a possibilidade de impactos nas UC (BUSCHBACHER, 2000) é de suma importância o desenvolvimento de estudos de biomonitoramento nas RPPN. Combinado a isso, a falta de dados referentes a bioindicadores e biomarcadores das condições ambientais no Brasil também demonstra a necessidade da realização de trabalhos que visem o monitoramento das regiões protegidas. Vale ressaltar que, apesar da importância desses estudos, existem poucos dados sobre os efeitos de tóxicos na fauna e flora, sendo escassos, ainda, dados à respeito da toxicidade de pesticidas em peixes (objeto de estudo desse trabalho), principalmente quando se trata de espécies brasileiras (COSTA, 2001). Há escassez, também, de trabalhos que relacionam as atividades fisiológicas, bioquímicas e genéticas em peixes tropicais com efeitos de contaminantes, em especial de estudos que sugerem o uso de diferentes biomarcadores em conjunto (OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2000).

O uso de biomarcadores bioquímicos em programas de monitoramento oferece algumas vantagens, pois são, normalmente, os primeiros a serem alterados, apresentam boa sensibilidade, relativa especificidade e baixo custo de análise quando comparados com análises químicas. A medida enzimática da acetilcolinesterase (AChE), considerada um dos mais antigos biomarcadores, possibilita a detecção de efeitos toxicológicos subletais, principalmente de compostos organofosforados e carbamatos, sendo atualmente outros pesticidas descritos como potenciais inibidores da AChE (DAVIES e COOK, 1993; GILL *et al.*, 1990a,b). Van Der Oost *et al.* (2003) indicam que peixes expostos a diferentes pesticidas podem apresentar redução da atividade da acetilcolinesterase proporcional à concentração e ao tempo de exposição.

A catalase (CAT), por sua vez, possui a capacidade de degradar rapidamente o peróxido de hidrogênio (formado por oxidação metabólica) em oxigênio e água. A reação de conjugação realizada pela enzima glutathione S-transferase (GST) é importante às células, pois atua na hidrólise de substâncias lipofílicas, às quais podem ser excretadas como substâncias inertes no organismo. Induções da GST e da CAT no tecido hepático já foram observadas em diversas espécies de peixes expostas a xenobiontes (GEORGE, 1993), sendo que as atividades dessas enzimas vêm sendo utilizadas com maior frequência como biomarcadores bioquímicos (VAN DER OOST *et al.*, 2003; FATIMA *et al.*, 2006).

O estresse oxidativo, que pode ocorrer quando essas enzimas chamadas antioxidantes (no caso a CAT) têm suas funções alteradas; ou quando o índice de produção de espécies reativas de oxigênio é alto; pode causar a peroxidação dos ácidos graxos existentes nas membranas celulares. A presença de xenobióticos, responsável por essa alteração, pode, portanto, levar a um aumento de peroxidação lipídica ou peroxidação (LPO) e danificar estruturas celulares (REGOLLI *et al.*, 2005).

Lesões histopatológicas e alterações genéticas, como aberrações nucleares, são também efeitos relatados em estudos prévios em organismos aquáticos em áreas impactadas (AKAISHI *et al.*, 2004; MOUCHET *et al.*, 2006). A ocorrência de danos celulares e teciduais em fígado de peixes ambientalmente expostos a pesticidas, metais pesados, esgoto e efluentes industriais tem sido descrita por vários autores (STENTIFORD *et al.*, 2003; NORENA-BARROSO *et al.*, 2004; OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2005).

Nesse sentido, o presente projeto vem contribuir para o desenvolvimento de pesquisas de biomonitoramento em Unidades de Conservação no estado do Paraná, em especial as Reservas Particulares do Patrimônio Natural. A proposta foi realizar o biomonitoramento da RPPN Fazenda Barbacena, possivelmente alterada pelo uso de contaminantes ambientais de origem agrícola, através da utilização de biomarcadores bioquímicos, morfológicos e genéticos em em *Astyanax* sp.

I.2 MATERIAL E MÉTODOS

I.2.1 ÁREA DE ESTUDO

O presente projeto foi conduzido em uma área-piloto localizada na região noroeste do Estado do Paraná, inserida na Fazenda Barbacena, município de São Pedro do Ivaí, a RPPN Estadual Fazenda Barbacena, de propriedade de Jayme Watt Longo (Figura 5). Segundo IBGE (2007), esta região está recoberta pela Floresta Estacional Semidecidual, comunidade vegetal onde 20 a 50% dos indivíduos do estrato arbóreo superior perdem as folhas na estação desfavorável, por condições periódicas de seca ou frio.

Atualmente, esta cobertura vegetal encontra-se seriamente comprometida pelas atividades agropecuárias ali desenvolvidas (MIKICH *et al.*, 2002, MIKICH e OLIVEIRA, 2003). O clima da região é do tipo Cfa, com tendência de concentração das chuvas nos meses de verão e temperatura média do mês mais quente acima dos 22°C e do mês mais frio abaixo dos 18°C (MIKICH e OLIVEIRA, 2003).

A RPPN Fazenda Barbacena foi criada em 2004 e preserva mata nativa de Floresta Estacional Semidecidual. A área possui também importante papel na preservação hidrográfica (Bacia do Ivaí) – (SEMA, 2007).

As atividades realizadas atualmente na área protegida abrangem turismo ecológico, educação ambiental e pesquisa científica. A área é, hoje, administrada pela empresa Vale do Ivaí. No entorno da RPPN há a produção de cana de açúcar, também gerida pela empresa citada, a qual utiliza, periodicamente, diferentes tipos de pesticidas recomendados para esse tipo de cultivo, em especial o glifosato e o diuron.

A pulverização é realizada por maquinários específicos e eventualmente por meio de pulverização manual.

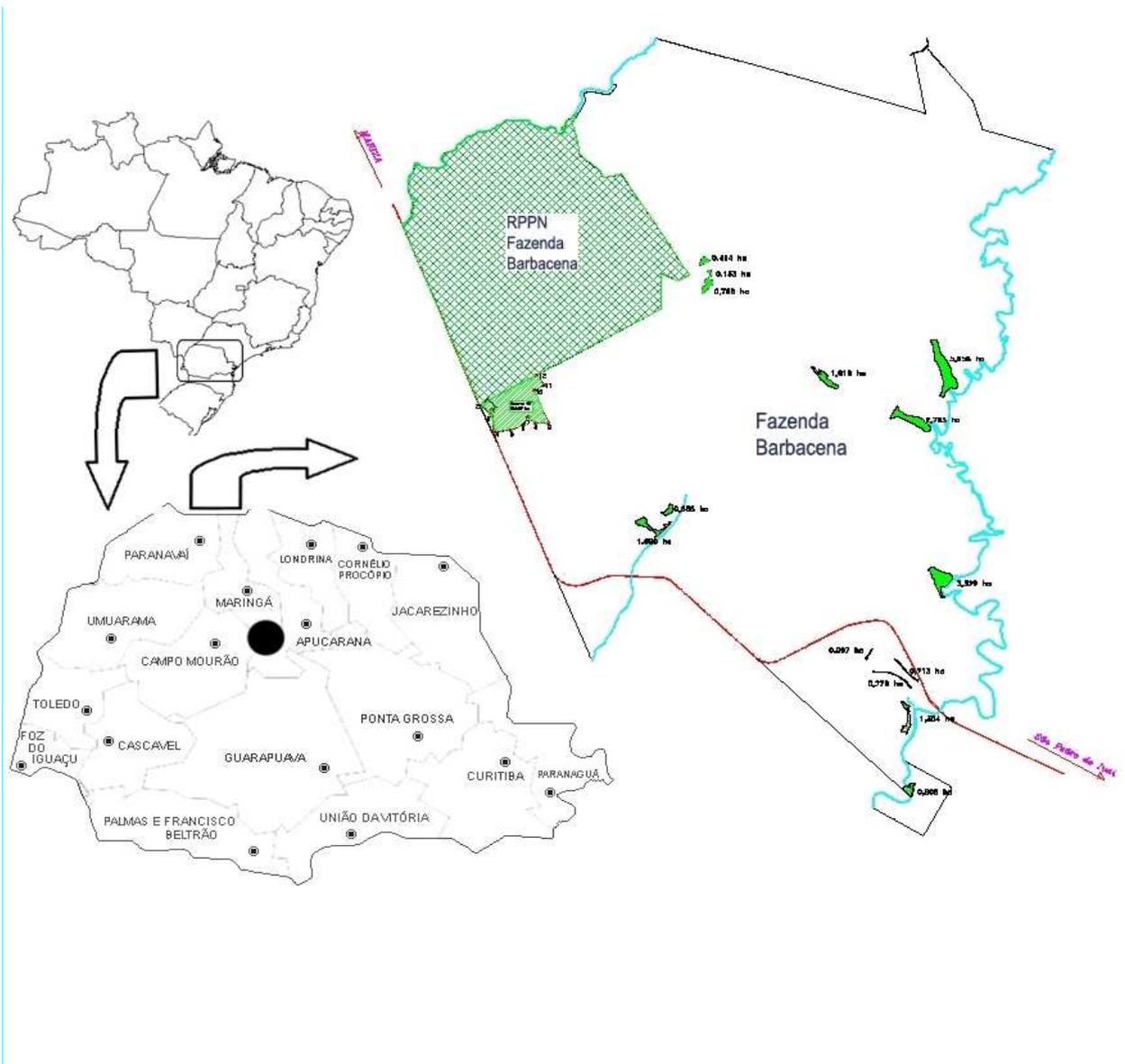


Figura 5 - Esquema representativo da localização da RPPN Fazenda Barbacena, São Pedro do Ivai, Paraná, Brasil.

I.2.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Foram realizadas duas fases de campo, uma no mês de setembro de 2006 (final da seca) e outra no mês de março de 2007 (final da chuva), considerando que a disponibilidade dos pesticidas no ambiente pode variar com a disponibilidade de água, ou seja, nas diferentes estações pluviométricas, bastante característica da Floresta Estacional da região trabalhada. Para a escolha das épocas de coleta considerou-se, também, que os pesticidas nessa fazenda possuem aplicação contínua (não há variação sazonal de aplicação), segundo informações fornecidas

pela gerência agrícola da empresa Vale do Ivaí. Os meses escolhidos, portanto, representaram uma época final de cada estação pluviométrica, de seca e chuva.

Foram amostrados três pontos de um mesmo córrego da Fazenda Barbacena, o córrego Itaubaté, o qual possui sua nascente na área produtiva da fazenda (com plantio de cana) e cruza, posteriormente, toda a RPPN. O primeiro ponto se localiza no tanque formado pelas nascentes do córrego, o segundo no limite da área produtiva com a RPPN e o terceiro no interior da RPPN (aproximadamente na zona núcleo da reserva) (Figuras 6 e 7).

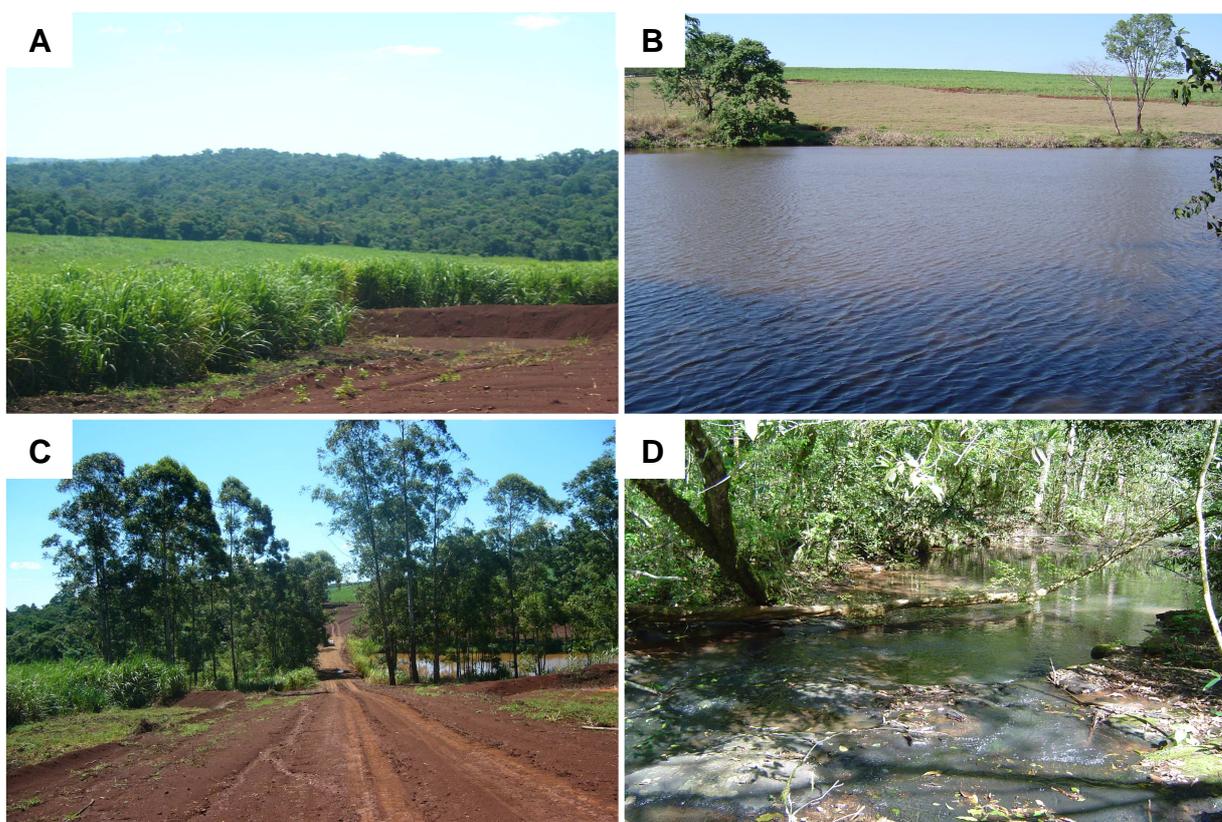


Figura 6 - Imagens da RPPN e dos pontos de coleta na Fazenda Barbacena, São Pedro do Ivaí, Paraná. A: Vista da RPPN ao fundo, com plantio de cana em primeiro plano. B: Ponto de Coleta “Cana de Açúcar”: tanque formado por nascentes na área de plantio. C: Ponto de Coleta “Entorno”. D: Ponto de Coleta “RPPN”: córrego Itaubaté.

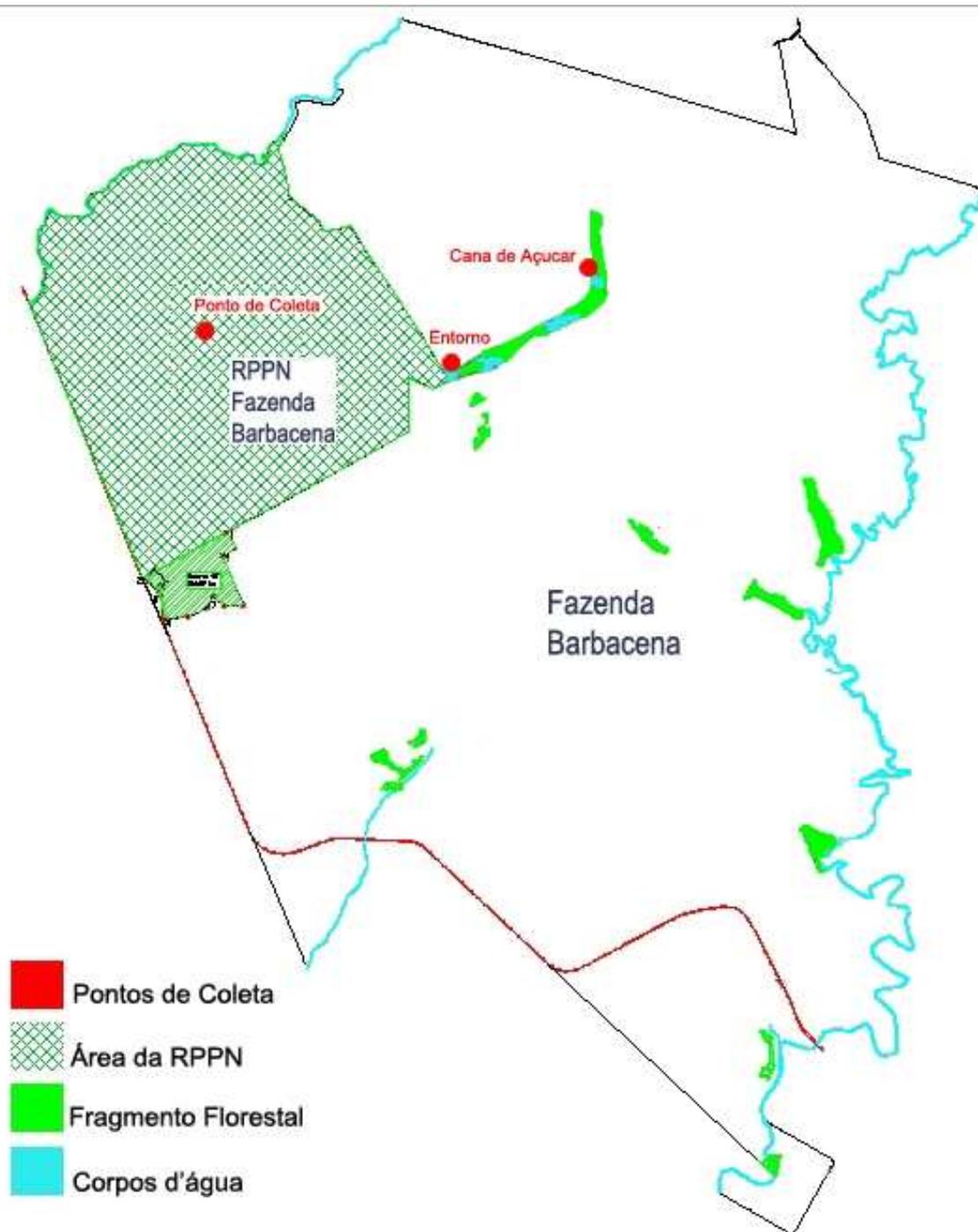


Figura 7 - Representação da RPPN e dos pontos de coleta na Fazenda Barbacena, São Pedro do Ivaí, Paraná. Os pontos vermelhos identificam os pontos amostrais.

Foram coletados 30 indivíduos por ponto amostral, em ambas as coletas. Primeiramente, os animais tiveram sua coluna seccionada e, em seguida, foram coletadas amostras de sangue (com o auxílio de um tubo capilar para hematócrito) para confecção de extensão em lâmina (para realização do teste do micronúcleo). Após secção ventral, retirou-se o fígado (para análises bioquímicas da CAT, GST e LPO, além de avaliação histológica) e uma porção do músculo axial (para análise da

enzima AchE). Os indivíduos foram, então, armazenados em formol 4%, para posterior identificação dos espécimes.

As amostras de fígado e músculo coletadas foram acondicionadas em criotubos devidamente identificados e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Uma pequena porção do fígado de cada animal também foi fixada em ALFAC e depois desidratada em álcool, para avaliação histológica.

As amostras obtidas foram encaminhadas aos laboratórios de Toxicologia Ambiental do Departamento de Farmacologia, de Toxicologia Celular do Departamento de Biologia Celular e de Mutagênese Ambiental do Departamento de Genética da UFPR, para processamento e realização das análises abaixo descritas.

I.2.2.1 Modelo Biológico

Neste estudo foram utilizados lambaris *Astyanax* sp. A posição taxonômica segundo Fink e Fink (1981) é Classe Osteichthyes; Superordem Osthariophysii; Ordem Characiformes; Subordem Characioidea; Família Characidae. A identificação dos espécimes foi realizada pelo Museu de História Natural Capão da Imbuia, Curitiba, Paraná.

Os peixes da família Characidae geralmente apresentam uma nadadeira caudal adiposa, são bons nadadores e incluem a maioria dos peixes de escamas conhecidos no Brasil, como lambaris, piracanjubas, piranhas, dourados, etc. (BRITSKI, 1988). O lambari é uma espécie nativa e largamente distribuída no território brasileiro, sendo encontrado em grandes grupos habitando rios, lagos e represas. O termo lambari é uma designação (nome popular) a quase 150 espécies, de diferentes gêneros. Em outras regiões do Brasil, o lambari pode receber o nome de Piaba ou Canivete.

O gênero *Astyanax* foi inicialmente proposto em 1854 e a revisão mais recente, realizada por Lima *et al.* (2003) cita 86 espécies e algumas subespécies. Os indivíduos do gênero *Astyanax* são peixes de escamas, de pequeno porte, raramente ultrapassando 10 cm de comprimento total. Sua coloração é bastante variada.

O gênero compreende adultos preferencialmente insetívoros, mas que também consomem outros itens alimentares vegetais e animais (flores, frutos,

sementes, crustáceos, algas, detritos) (GASPAR DA LUZ e OKADA, 1999; ANDRIAN, 2001). Grande representatividade numérica tem sido comum em estudos envolvendo espécies do gênero *Astyanax* (UIEDA e BARRETO, 1999; ORSI *et al.*, 2004). Tal característica se dá pelo fato destas espécies apresentarem ciclos de vida dinâmicos com elevado potencial reprodutivo e oportunismo trófico (FILHO e BRAGA, 1996), fato este interessante para o uso do gênero como modelo biológico para diferentes estudos. Vale salientar, também, que esse gênero apresenta comportamento reofílico, ou seja, realiza apenas curtas migrações reprodutivas durante os períodos de maior precipitação, não variando muito sua ocorrência nas diferentes faixas dos corpos hídricos (SUZUKI e AGOSTINHO, 1997). Por essas características e por sua relativa facilidade de captura, o gênero *Astyanax* foi escolhido como modelo nesse estudo.

Apesar dessas características, o grupo lambari passa eventualmente por modificações em sua classificação taxonômica, o que pode dificultar, em alguns casos, o seu uso como bioindicador. Muitas espécies do gênero *Astyanax* são morfologicamente similares e por isso diferentes autores citam a formação de um complexo do ponto de vista taxonômico (FERNANDES, 2004; MARTINS-SANTOS, 2004). Durante a coleta realizada em setembro de 2006, apareceram alguns exemplares do lambari *Bryconamericus* sp. (no ponto localizado no entorno da reserva). Esses exemplares foram retirados, após identificação do Museu, das análises bioquímicas, morfológicas e genéticas, sendo utilizado apenas o gênero *Astyanax*. Portanto, o número amostral nesse grupo sofreu variações.

I.2.2.2 Extração enzimática

As amostras de fígado armazenadas em freezer -70°C (pool de 2 animais) foram descongeladas em temperatura de 4°C e homogeneizadas em tampão fosfato 0,1M, pH 6,5, com auxílio do homogeneizador automático Potter – Elvehjem, na proporção 1:10 (peso do tecido / volume do tampão). O homogeneizado utilizado como fonte de enzimas foi obtido pela centrifugação a 10000 x g a 4°C, por 30 minutos. O sobrenadante (fração S9) foi aliquoteada para análise da GST, CAT, LPO e para dosagem de proteína.

Glutathione-S-transferase (GST):

O método baseia-se no trabalho proposto por HABIG *et al.* (1974) e HABIG e JAKOBY (1981). As GSTs catalisam a reação de conjugação do substrato CDNB com a GSH, formando um tioéter que pode ser monitorado pelo aumento de absorbância, através da leitura em microplacas.

O sobrenadante resultante da centrifugação foi diluído na proporção 1:10 (volume/volume) em tampão fosfato 0,1M pH6,5, e 100µl deste foi pipetado nas microplacas. Em seguida, foram adicionados 200 µl de solução reação (CDNB 2,5 mM, GSH 2 mM em tampão fosfato 0,1M pH6,5), para realização imediata da leitura (quatro réplicas de cada amostra). O aumento linear da absorbância, a 340nm, foi monitorado e a atividade foi expressa em nmoles de conjugado GSH-CDNB produzido por minuto, por miligrama de proteína, em espectrofotômetro de microplaca Sunrise – TECAN.

Catalase (CAT):

Para a atividade da Catalase, o sobrenadante resultante da centrifugação foi diluído na proporção 1:5 (volume/volume) em tampão fosfato 0,1M pH6,5. As amostras de enzima foram pipetadas em cubetas de quartzo (10µl). Em seguida, foram adicionados 990 µl de solução reação 20mM (Tampão Tris 1 M / EDTA 5mM pH 8,0, peróxido de hidrogênio 30% e água milli-q, em concentrações específicas e mantida em banho-maria a 25°C). Foram lidas três réplicas de cada amostra.

O método consiste em mensurar a atividade da catalase através do consumo de peróxido de hidrogênio exógeno, gerando oxigênio e água, através de espectrofotometria (AEBI, 1984). O aumento linear da absorbância foi monitorado em espectrofotômetro (Ultrospec 2000, UV/Visible - Pharmácia Biotec), a 240 nm, por 1 minuto a cada 15 segundos. A atividade enzimática foi expressa em $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}\text{ proteína}^{-1}$.

Lipoperoxidação Lipídica (LPO):

A análise da LPO baseia-se no método descrito por Jiang *et al.* (1991; 1992) e Hermes Lima *et al.* (1995). A determinação da lipoperoxidação foi feita segundo o

ensaio Laranja de Xilenol ou Ensaio FOX modificado, que tem por princípio a rápida oxidação do Fe^{+2} mediada por peróxidos sob condições ácidas e posterior formação do complexo Fe^{+3} - laranja de xilenol (fonte de absorção de luz), na presença do estabilizador hidroxitolueno butilato (BHT).

O sobrenadante inicial foi ressuspendido em metanol PA na proporção 1:2 (volume/volume), sonificado durante 1 minuto e centrifugado 10 minutos a 10000 x g a 4°C. Em seguida, 30 μl do sobrenadante dessa última centrifugação foi pipetado em microplacas e incubado por cerca de trinta minutos, com 270 μl de solução reação (metanol 90%, ácido sulfúrico (H_2SO_4) 25mM, BHT 4mM, sulfato ferroso amoniacal 250 μM , e laranja de xilenol 1mM). A leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplacas, a 570 nm. O resultado foi expresso em equivalentes de CHP (concentração de hidroperóxido) pela quantidade de proteína encontrada na amostra ($\text{nmol.mgproteína}^{-1}$).

Acetilcolinesterase (AChE):

Foi preparada uma diluição de cada amostra de músculo 10% (peso do tecido/volume do tampão) em tampão fosfato (0,1 M; pH 7,50). 50 μl da fonte de enzima foi pipetada em microplaca, com 200 μl de DTNB (0,75 mM) e 50 μl de ATC (iodeto de acetiltiocolina 9mM). Foram lidas três réplicas de cada amostra.

A atividade da AChE foi medida segundo o método Ellman *et al.* (1961), modificado para microplaca por Silva de Assis (1998). O substrato, iodeto de acetiltiocolina, é hidrolizado pela enzima, liberando tiocolina e acetato. A tiocolina reage com o íon 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoato) para produzir o ânion amarelo 5-tio-2-nitrobenzoato.

A absorbância foi medida a 405 nm, em espectrofotômetro de microplaca, Sunrise – TECAN. Os resultados foram expressos em $\text{nmol.min}^{-1}.\text{mgproteína}^{-1}$.

Concentração protéica:

Os dados das atividades enzimáticas foram normalizados pelas respectivas concentrações protéicas totais, quantificadas pelo método de Bradford (1976), utilizando-se soro albumina como padrão. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplaca (Sunrise – TECAN).

I.2.2.3 Histopatologia de fígado

Para análise histopatológica, amostras de fígado foram fixadas em ALFAC por 16 horas (álcool 80%, formol 40% e ácido acético glacial). Em seguida, foram armazenadas em álcool e transportadas para o laboratório de Toxicologia Celular da UFPR, para preparação das lâminas histológicas.

Em laboratório, as amostras foram desidratadas em série crescente de álcoois: 1 hora em 80%, 1 hora em 90%, 1 hora em 95%, 1 hora em 100% e 30 minutos em 100%. O material foi diafanizado utilizando-se xilol PA e álcool 100% na proporção 1:1 durante 1 hora, em seguida xilol PA por mais 1 hora. A inclusão foi realizada em paraplast plus a 56°C por 2 horas. Para a microtomia, os blocos foram mantidos em freezer por 15 minutos, a fim de facilitar a obtenção dos cortes. Os cortes foram, então, fixados em lâminas com albumina 1% e distendidos sobre uma chapa quente.

Os cortes foram corados com Hematoxilina de Harris e Eosina 1%. Para o processo de coloração, as lâminas foram diafanizadas em xilol (dois banhos de 5 minutos cada), em seguida, hidratadas em série decrescente de álcoois (5 minutos em álcool 100%, 90% e 70%), imersas em água destilada e então coradas. Após coloração, as lâminas foram novamente diafanizadas com xilol e finalmente montadas com resina e lamínula.

As características morfológicas foram analisadas através de microscopia de luz, sendo o índice das lesões calculado segundo Bernet *et al.* (1999). Os resultados foram gravados em imagens digitalizadas através do fotomicroscópio *Axiophot Zeiss*.

I.2.2.4 Teste do Micronúcleo Písceo

Para a realização do teste do micronúcleo foram coletadas amostras de sangue dos lambaris, para confecção de extensão em lâmina de vidro, conforme técnica descrita por Heddle (1973). O sangue foi coletado com o auxílio de um tubo capilar heparinizado para hematócrito, sendo a amostra depositada imediatamente em lâmina de vidro para a realização do esfregaço, feito logo em seguida. Após a

lâmina secar por 5 minutos, o material foi fixado em etanol PA (Merck®) durante 30 minutos.

Após fixação, as lâminas foram coradas com Giemsa 5%, diluída em tampão fosfato pH 8,6, por 10 minutos. As lâminas foram, então, analisadas em microscopia ótica, para identificação e quantificação de micronúcleos e núcleos com formas alteradas (teste cego para contabilização total de alterações nucleares em 2000 hemácias periféricas por lâmina). Foram consideradas como micronúcleos as partículas que se encontravam nitidamente separadas no núcleo principal, sem exceder 1/3 do seu tamanho, com bordas visíveis e com mesma cor e refringência do núcleo. As alterações de forma elíptica nucleares que não se enquadraram no conceito do micronúcleo foram, então, descritas como alterações morfológicas nucleares (CARRASCO *et al.*,1990), sendo computadas de forma conjunta e não como alterações específicas.

1.2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos experimentos bioquímicos foram analisados por Anova de uma via, seguida da Prova de Tukey para comparação entre os grupos. Também foram comparadas as amostras coletadas em um mesmo ponto nas fases de seca (setembro de 2006) e de chuva (março de 2007) a partir da realização do Teste de Mann-Whitney.

Para comparação dos índices histopatológicos e das alterações nucleares, os resultados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis. O nível de significância adotado para os testes foi de 5%.

I.3 RESULTADOS

I.3.1 Atividade da Glutathiona S-Transferase

Não foi observada diferença da atividade da GST nos pontos localizados na área de plantio de cana de açúcar (média \pm erro padrão / $72,9 \pm 6,8$ nmol.min⁻¹.mg proteína⁻¹), no entorno da área protegida ($83,5 \pm 4,8$) e no interior da RPPN ($73,9 \pm 14,5$) para as amostras coletadas em setembro de 2006 (após época de seca). Na coleta de março de 2007 (após época de chuva), contudo, foi verificado um aumento da atividade da GST, expressa em nmol.min⁻¹.mg proteína⁻¹, no entorno da reserva (média \pm erro padrão / $186,5 \pm 7,6$), quando comparada à região de plantio de cana de açúcar ($145,2 \pm 6,9$; $p < 0,05$), como é possível observar na Figura 8.

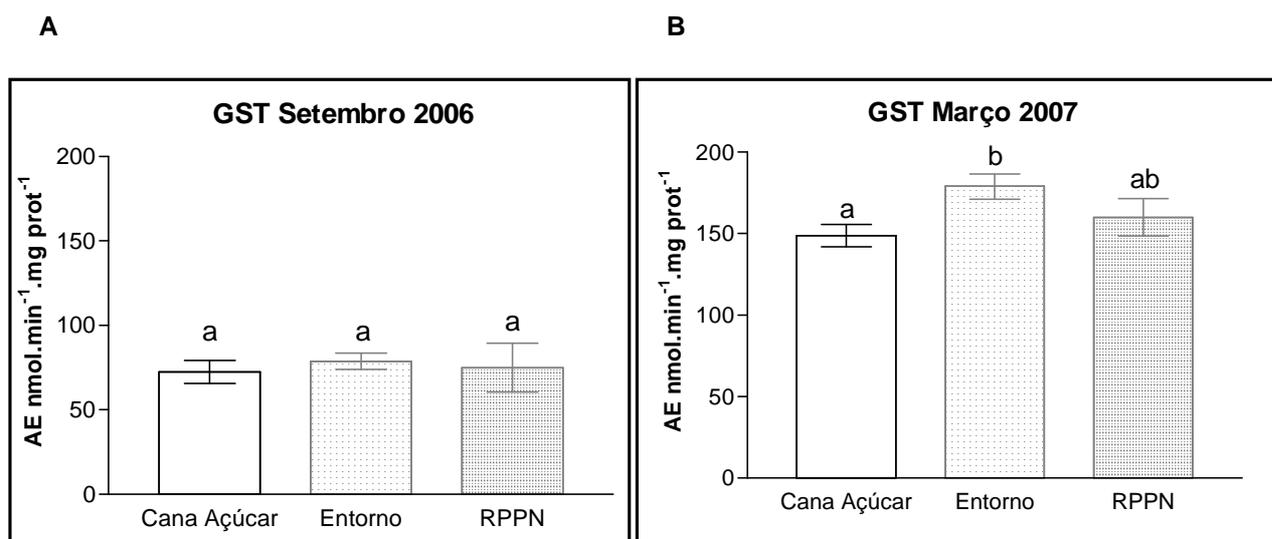


Figura 8 - Atividade específica (AE) da GST (nmol.min⁻¹.mg proteína⁻¹) no fígado de *Astyanax* sp., nos grupos Cana de Açúcar, Entorno e RPPN. Os resultados expressam média \pm erro padrão. Nível de significância adotado $p < 0,05$. A: Coleta de setembro de 2006, $n=15$ para os pontos localizados na cana de açúcar e RPPN; $n=9$ para o ponto localizado no entorno. B: Coleta de março de 2007. Letras diferentes expressam grupos estatisticamente diferentes ($p < 0,05$; $n=15$).

I.3.2 Atividade da Catalase

Para a CAT foi observada uma indução da expressão enzimática na coleta realizada em setembro de 2006 (média \pm erro padrão), expressa em μ mol.min⁻¹.mg proteína⁻¹, no grupo coletado no interior da RPPN ($616,1 \pm 52,0$), quando comparado

ao ponto localizado na cana de açúcar ($240,5 \pm 9,1$; $p < 0,05$) e entorno ($246,3 \pm 8,5$; $p < 0,05$). Não foi observada, porém, diferença da atividade da CAT nos pontos localizados na área de plantio de cana de açúcar ($469,3 \pm 41,88$), no entorno da área protegida ($536,7 \pm 19,83$) e no interior da RPPN ($461,8 \pm 52,9$) nas amostras coletadas em março de 2007, conforme indica a Figura 9.

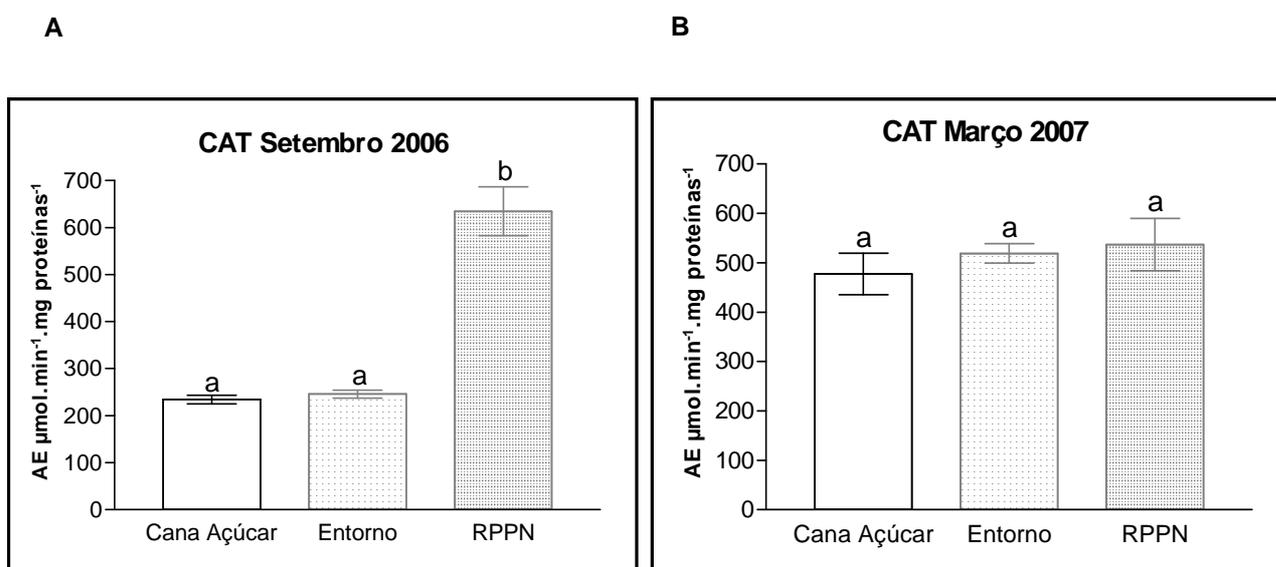


Figura 9 - Atividade específica (AE) da CAT ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}\text{ proteína}^{-1}$) no fígado de *Astyanax* sp, nos grupos Cana de Açúcar, Entorno e RPPN. Os resultados expressam média±erro padrão. Nível de significância adotado $p < 0,05$. A: Coleta de setembro de 2006. Letras diferentes expressam grupos estatisticamente diferentes ($p < 0,05$; $n=15$ para os pontos localizados na cana de açúcar e RPPN; $n=9$ para o ponto localizado no entorno). B: Coleta de março de 2007, $n=15$.

1.3.3 Lipoperoxidação

Foi verificada diferença na LPO na coleta de setembro de 2006 ($\text{nmol}\cdot\text{mg}\text{ proteína}^{-1}$) do grupo coletado no entorno da área protegida (média ± erro padrão / $2,03 \pm 0,23$) quando comparado ao interior da RPPN ($0,69 \pm 0,17$; $p < 0,05$) e à área de cana de açúcar ($0,73 \pm 0,11$; $p < 0,05$). Na coleta de março de 2007, esse mesmo ponto, o entorno, também apresentou diferença da LPO (média ± erro padrão / $4,33 \pm 0,30$) em relação aos demais pontos (RPPN: $2,3 \pm 0,24$; $p < 0,05$ e área com cana: $3,2 \pm 0,27$; $p < 0,05$), conforme indica a Figura 10.

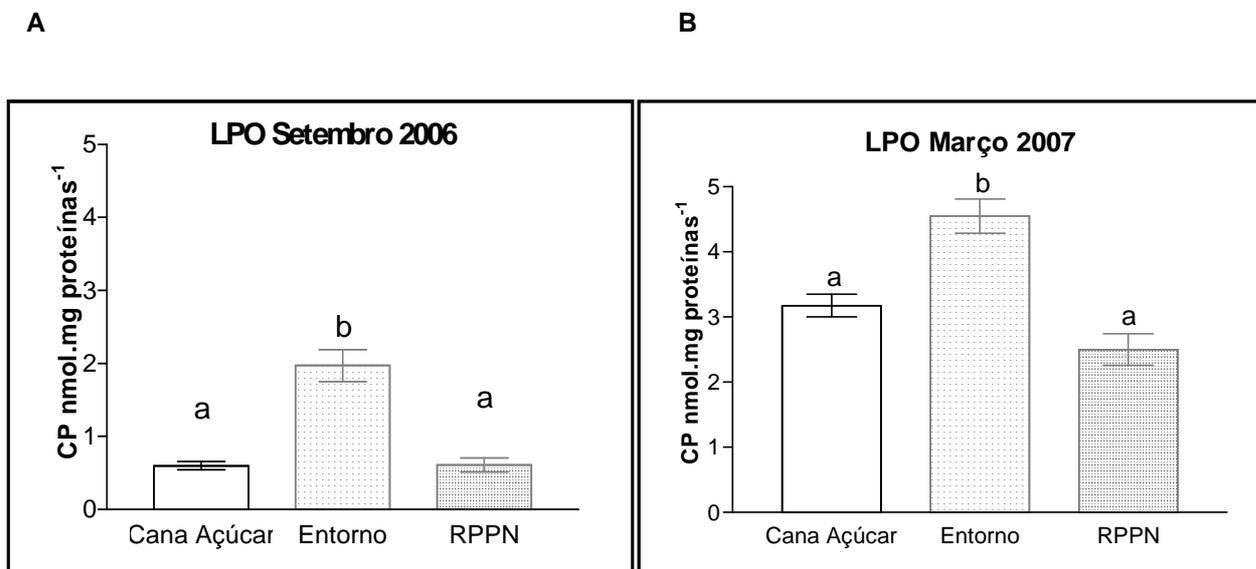


Figura 10 - Concentração de hidroperóxidos (CP) (nmol.mg proteína⁻¹) no fígado de *Astyanax* sp, nos grupos Cana de Açúcar, Entorno e RPPN. Os resultados expressam média±erro padrão. Nível de significância adotado $p < 0,05$. Letras diferentes expressam grupos estatisticamente diferentes. A: Coleta de setembro de 2006, $p < 0,05$; $n = 15$ para os pontos localizados na cana de açúcar e RPPN; $n = 9$ para o ponto localizado no entorno. B: Coleta de março de 2007, $p < 0,05$; $n = 15$.

I.3.4 Atividade da Acetilcolinesterase

Não foi observada alteração da atividade da AchE (expressa em nmol.min⁻¹.mg proteína⁻¹) nos pontos localizados na área de plantio de cana de açúcar (164,3±11,2), no entorno da área protegida (189,5±6,2) e no interior da RPPN (174,8±4,6) nas amostras coletadas em setembro de 2006; e nesses mesmos pontos na coleta de março de 2007 (Cana de açúcar: 405,1±19,8; Entorno: 339,0±10,7 e RPPN: 361,5±33,9), conforme indica a Figura 11.

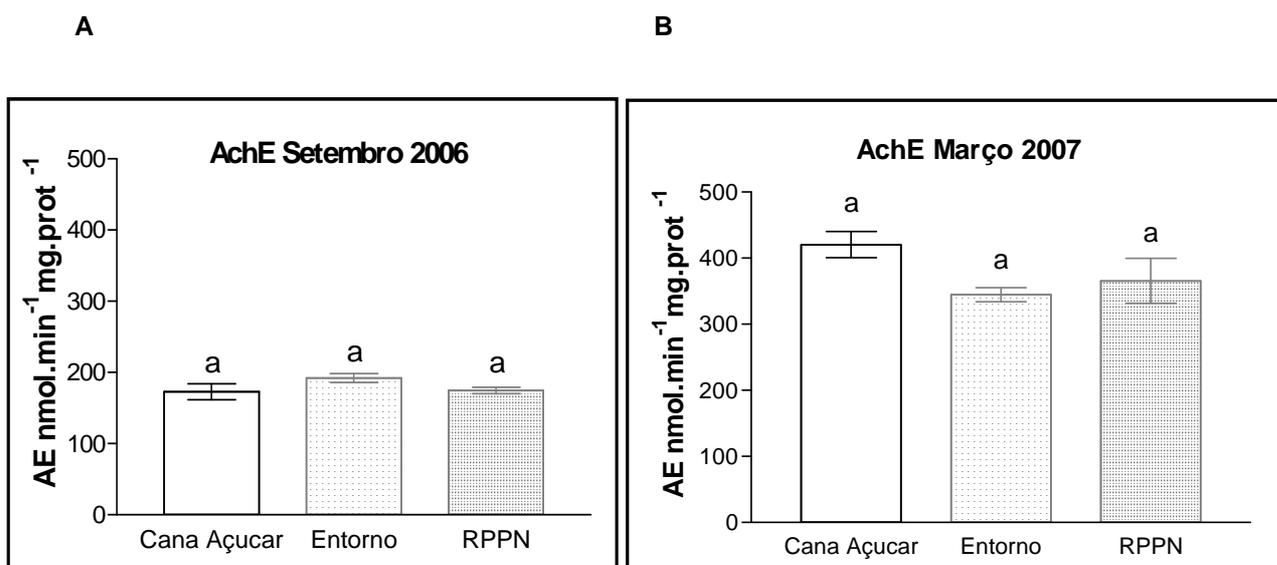


Figura 11 - Atividade específica (AE) da AchE (nmol.min⁻¹.mg proteína⁻¹) no músculo de *Astyanax* sp, nos grupos Cana de Açúcar, Entorno e RPPN. Os resultados expressam média±erro padrão. Nível de significância adotado $p < 0,05$. A: Coleta de setembro de 2006, $n = 15$ para os pontos localizados na cana de açúcar e RPPN; $n = 9$ para o ponto localizado no entorno. B: Coleta de março de 2007, $n = 15$.

I.3.5 Comparação entre época chuvosa e época de seca

Segundo a SIMEPAR (Sistema Meteorológico do Paraná), a precipitação acumulada obtida para a região durante os meses de estudo (set/06 a mar/07) foi de 1163,6 mm. Os meses que antecederam a coleta no início de setembro de 2006 representaram a época de maior seca (total de 85,8 mm de maio a agosto de 2006) e os meses que antecederam a coleta de março de 2007 representaram a época de concentração de chuvas (total de 692,8 mm de dezembro de 2006 a fevereiro de 2007). Esses dados caracterizam, portanto, o clima do tipo Cfa ou Sub-tropical Úmido Mesotérmico, com tendência de concentração das chuvas até o fim do verão e seca até o fim do inverno, o que justifica a escolha dos períodos para coleta.

Na comparação dos dados para as diferentes épocas do ano foi verificado aumento da atividade da GST ($\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}\text{ proteína}^{-1}$) em todos os pontos de coleta quando comparados dois a dois, nos diferentes períodos de coleta (média \pm erro padrão / seca x chuva): (1) Cana de Açúcar Seca: $72,4\pm 6,8$ / Cana de Açúcar Chuva: $148,8\pm 6,9$; $p<0,05$; (2) Entorno Seca: $78,8\pm 4,8$ / Entorno Chuva: $179,0\pm 7,7$; $p<0,05$ e (3) RPPN Seca: $70,5\pm 9,8$ / RPPN Chuva: $165,1\pm 8,9$; $p<0,05$, como é possível observar na Figura 12.

Nessa figura observa-se, também, a diferença da atividade da CAT ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}\text{ proteína}^{-1}$) quando realizada a mesma comparação entre os pontos, em épocas de seca e chuva. No ponto localizado no interior do plantio de cana e no entorno da reserva houve aumento da CAT na coleta realizada na chuva (Cana de Açúcar Seca: $234,2\pm 9,1$ / Cana de Açúcar Chuva: $521,8\pm 32,5$; $p<0,05$; Entorno Seca: $245,6\pm 8,5$ / Entorno Chuva: $518,7\pm 19,8$; $p<0,05$), enquanto que no ponto localizado na RPPN houve um decréscimo na atividade (RPPN Seca: $646,2\pm 36,6$ / RPPN Chuva: $462,3\pm 21,2$; $p<0,05$).

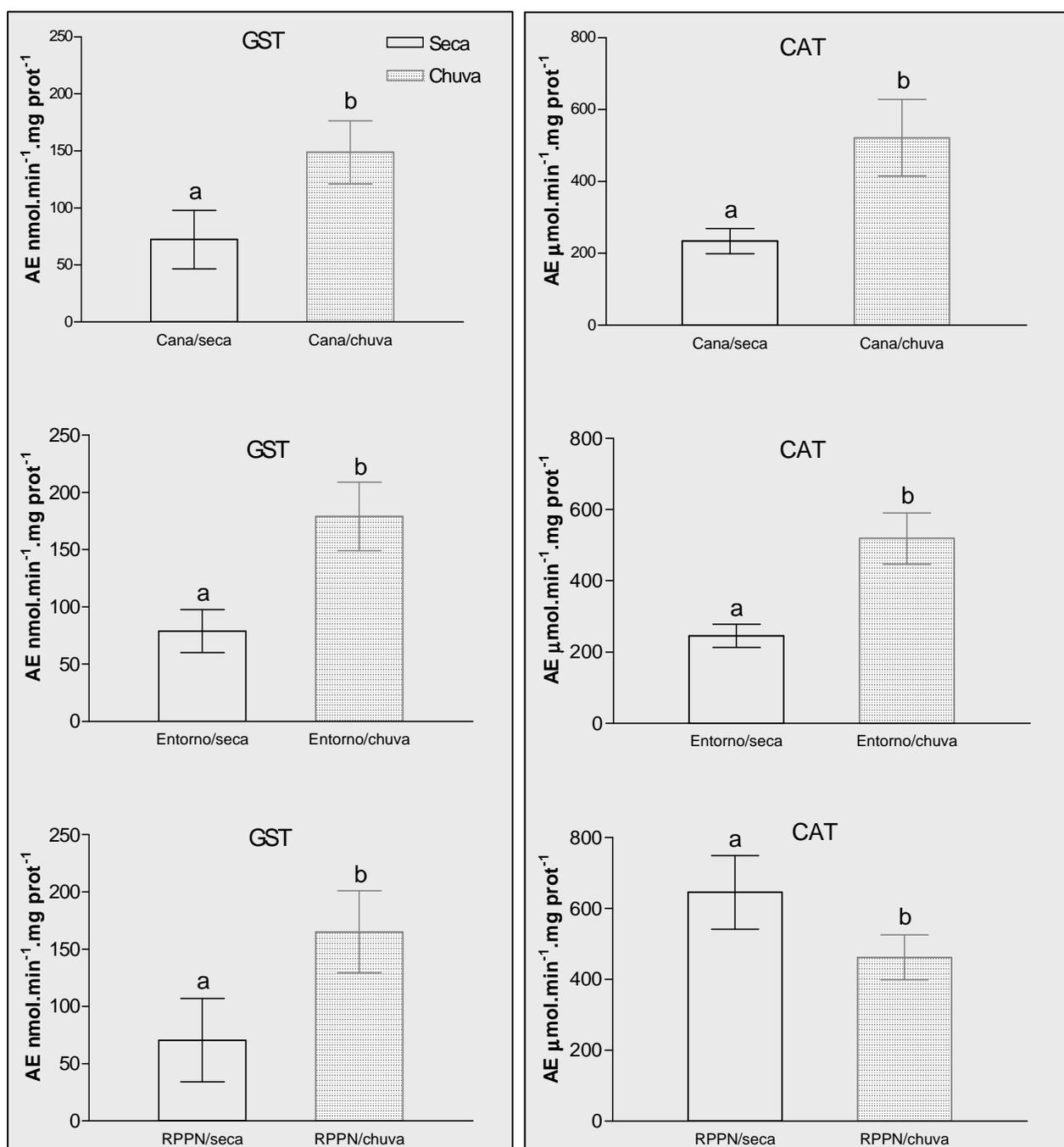


Figura 12 - Atividade específica da GST ($\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}\text{ proteína}^{-1}$) e CAT ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}\text{ proteína}^{-1}$) em *Astyanax sp.*, nos diferentes pontos amostrais (Cana de Açúcar, Entorno e RPPN), nas diferentes épocas de coleta (seca/setembro 2006 e chuva/março 2007), $n=15$. Os resultados expressam média \pm erro padrão. Letras diferentes expressam grupos estatisticamente diferentes ($p<0,05$).

Foi verificado, ainda, aumento da atividade da AchE ($\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}\text{ proteína}^{-1}$) em todos os pontos de coleta quando comparados dois a dois, nos diferentes períodos de coleta (média \pm erro padrão / seca x chuva): (1) Cana de Açúcar Seca: $172,7\pm 11,2$ / Cana de Açúcar Chuva: $420,2\pm 19,2$; $p<0,05$; (2) Entorno Seca: $192,2\pm 6,2$ / Entorno Chuva: $344,6\pm 10,8$; $p<0,05$ e (3) RPPN Seca: $174,8\pm 4,6$ / RPPN Chuva: $342,0\pm 25,9$; $p<0,05$, como é possível observar na Figura 13.

Nessa figura observa-se, também, o aumento da concentração de hidroperóxido ($\text{nmol.mg proteína}^{-1}$) em todos os pontos de coleta quando comparados dois a dois, nos diferentes períodos de coleta: (1) Cana de Açúcar Seca: $0,60 \pm 0,06$ / Cana de Açúcar Chuva: $3,2 \pm 0,2$; $p < 0,05$; (2) Entorno Seca: $1,9 \pm 0,2$ / Entorno Chuva: $4,5 \pm 0,3$; $p < 0,05$ e (3) RPPN Seca: $0,61 \pm 0,09$ / RPPN Chuva: $2,5 \pm 0,2$; $p < 0,05$.

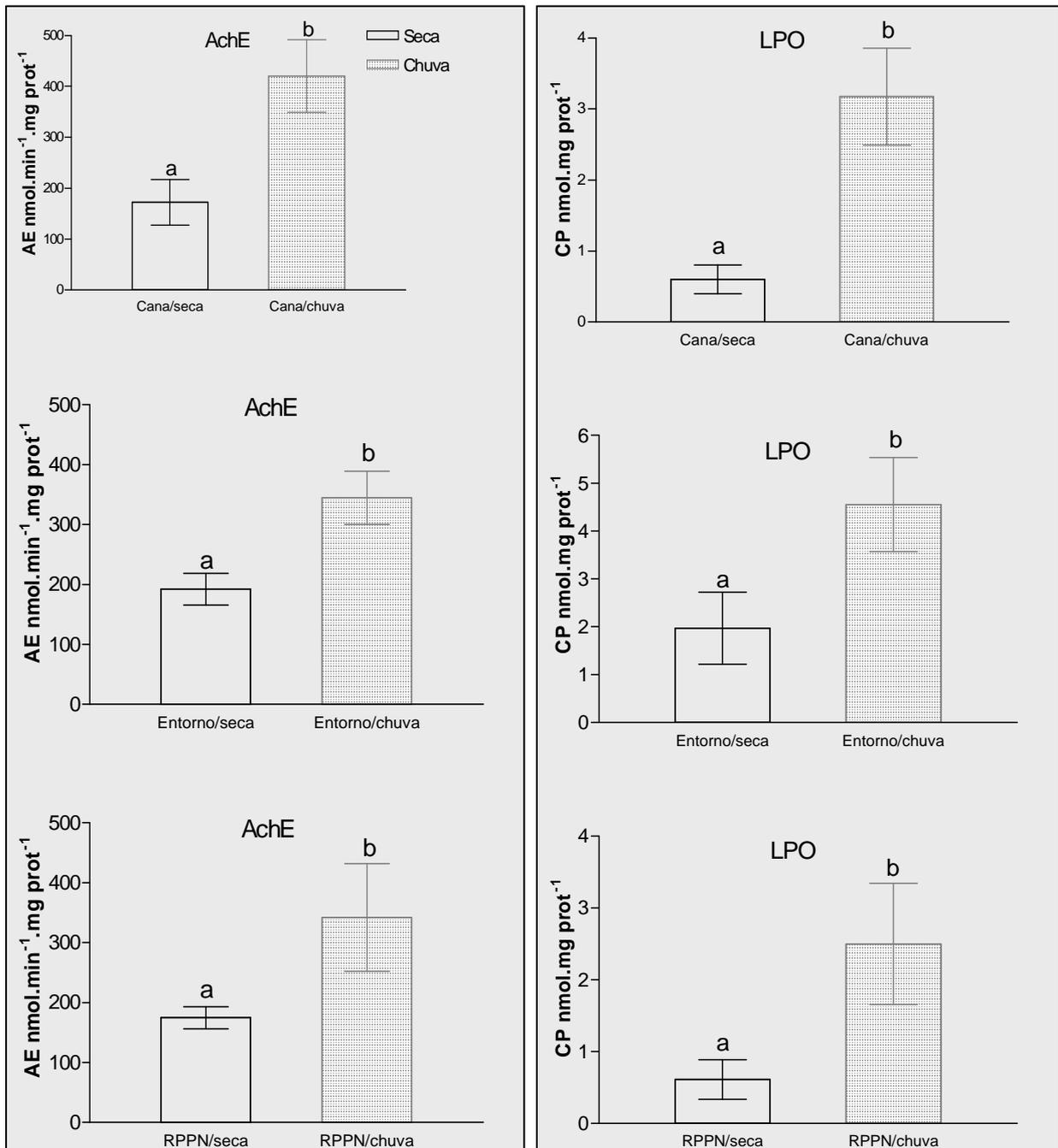


Figura 13 - Atividade específica da AchE ($\text{nmol.min}^{-1}.\text{mg proteína}^{-1}$) e concentração de hidroperóxido ($\text{nmol.mg proteína}^{-1}$) em *Astyanax* sp, nos diferentes pontos amostrais (Cana de Açúcar, Entorno e RPPN), nas diferentes épocas de coleta (seca/setembro 2006 e chuva/março 2007), $n=15$. Os resultados expressam média \pm erro padrão. Letras diferentes expressam grupos estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

I.3.6 Histopatologia de Fígado

As lesões encontradas no fígado estão demonstradas na Tabela 2 e nas Figuras 14 e 15. A Figura 14A mostra a estrutura normal do tecido hepático do *Astyanax* sp., que apresenta vasos de diferentes tamanhos distribuídos por todo o parênquima hepático e é observado o tecido pancreático, característica essa comum nos teleósteos. Em todos os pontos amostrais (Cana-de-açúcar, Entorno e RPPN), em ambas as estações (setembro/seca e março/chuva) foram identificadas lesões como alterações nucleares (Figura 14B), vacuolização citoplasmática (Figura 14D), infiltrações leucocitárias (Figura 15A), diferenciação do tecido e presença de melanomacrófagos livres (Figura 15D). Foram identificados, também, parasitas (Figura 15B e 15C). Necrose foi a lesão mais evidente em todos os pontos amostrais (Figura 14C).

TABELA 2 – FREQUÊNCIA DE OCORRÊNCIA DE LESÕES EM FÍGADO DE *Astyanax* sp. COLETADOS EM SETEMBRO DE 2006 E MARÇO DE 2007, FAZENDA BARBACENA, SÃO PEDRO DO IVAÍ, PR

Lesão	Cana/06	Entorno/06	RPPN/06	Cana/07	Entorno/07	RPPN/07
		Setembro			Março	
Melanomacrófago Livre	4 (13)	11 (14)	15 (15)	8 (14)	13 (14)	7 (14)
Centro de Melanomacrófago	1 (13)	1 (14)	0 (15)	0 (14)	0 (14)	0 (14)
Infiltração Leucocitária	5 (13)	2 (14)	2 (15)	4 (14)	1 (14)	5 (14)
Necrose	12 (13)	14 (14)	15 (15)	12 (14)	12 (14)	11 (14)
Neoplasia	1 (13)	1 (14)	0 (15)	0 (14)	0 (14)	0 (14)
Vacúolo	1 (13)	1 (14)	3 (15)	0 (14)	0 (14)	0 (14)
Diferenciação do Tecido	2 (13)	2 (14)	0 (15)	3 (14)	4 (14)	0 (14)
Alteração Nuclear	0 (13)	0 (14)	0 (15)	0 (14)	0 (14)	2 (14)

NOTA: () = Número de indivíduos analisados.

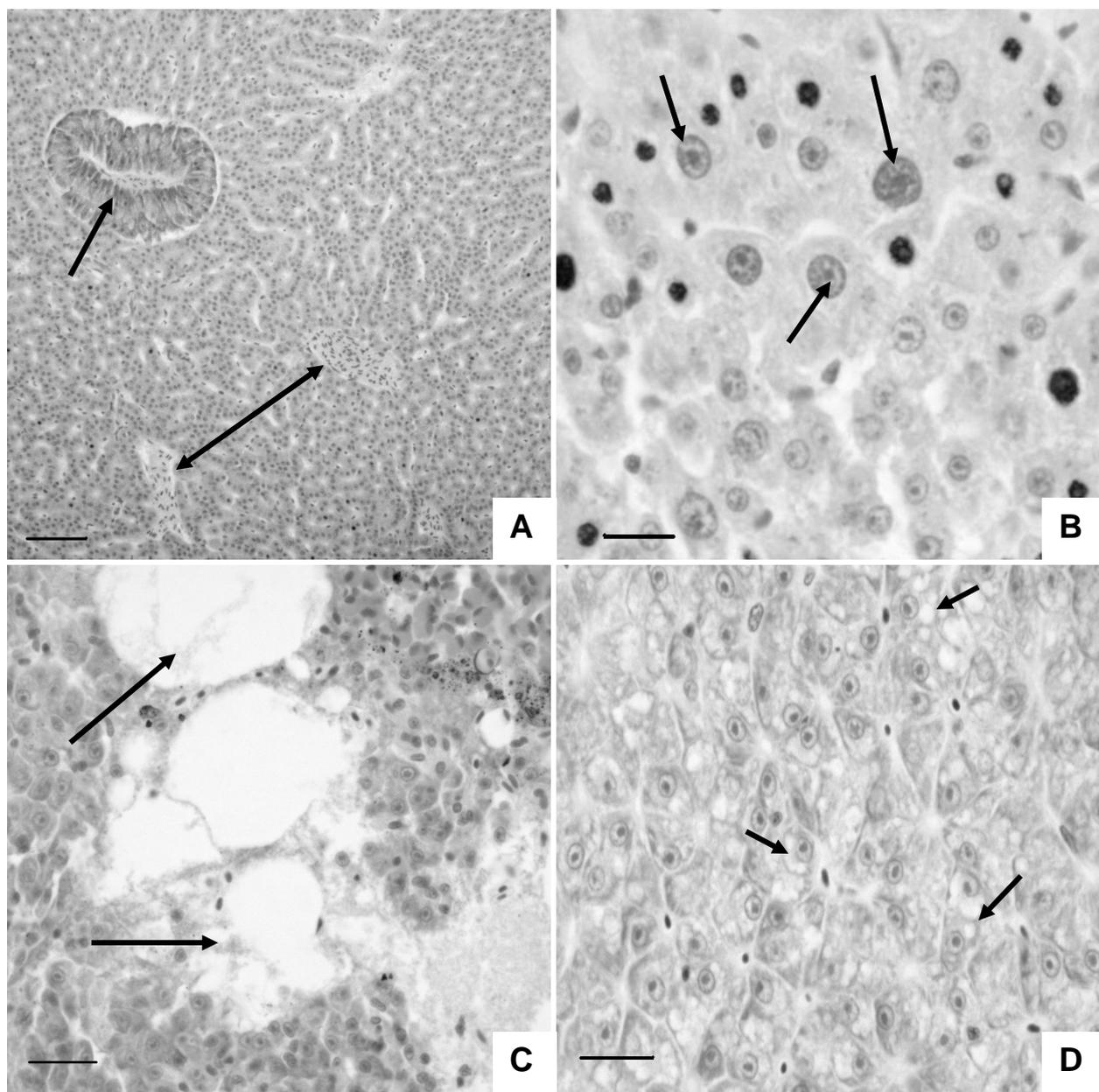


Figura 14 - Cortes histológicos de fígado de *Astyanax* sp. coletados em corpos hídricos da Fazenda Barbacena, São Pedro do Ivaí, PR. Coloração em Hematoxilina e Eosina. A: estrutura normal do tecido hepático. Seta (→) indica tecido pancreático e (↔) indica vasos sanguíneos (Barra = 50 µm). B: setas indicam alterações nucleares (Barra = 10 µm). C: setas indicam áreas de necrose (Barra = 20 µm). D: setas apontam para a presença de vacuolização citoplasmática (Barra = 20 µm).

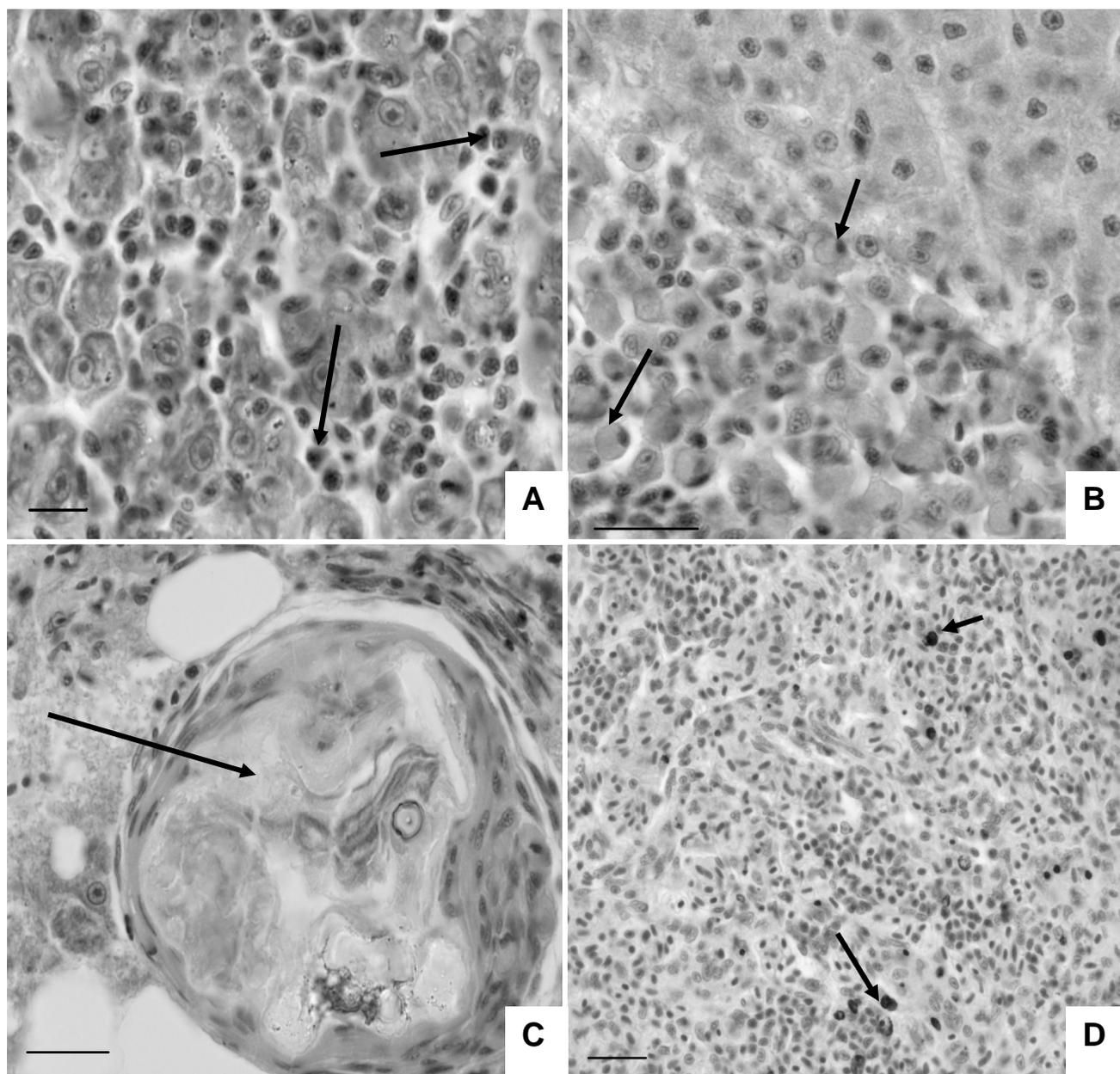


Figura 15 - Cortes histológicos de fígado de *Astyanax* sp. coletados em corpos hídricos da Fazenda Barbacena, São Pedro do Ivaí, PR. Coloração em Hematoxilina e Eosina. A: setas indicam áreas de infiltração leucocitária (Barra = 10 μ m). B: setas indicam parasitas no tecido (Barra = 10 μ m). C: seta indica um parasita (Barra = 20 μ m). D: setas apontam para a presença de melanomacrófagos em tecido caracterizado por diferenciação tecidual e infiltração de células sanguíneas (Barra = 20 μ m).

Na comparação do índice de lesão entre os pontos amostrais, calculado com base em Bernet *et al.* (1999), foi encontrada diferença entre os pontos Cana-de-Açúcar e RPPN, com um aumento desse índice na área preservada, na coleta realizada em setembro de 2006, como é possível observar na Figura 16 A. Essa mesma figura mostra, no entanto, que na coleta de março de 2007 não houve diferença entre os pontos de coleta (Figura 16 B). Na comparação dos dados para as diferentes épocas do ano foi verificado aumento do índice na época de seca, nos indivíduos coletados no entorno da reserva e na RPPN (Figura 17).

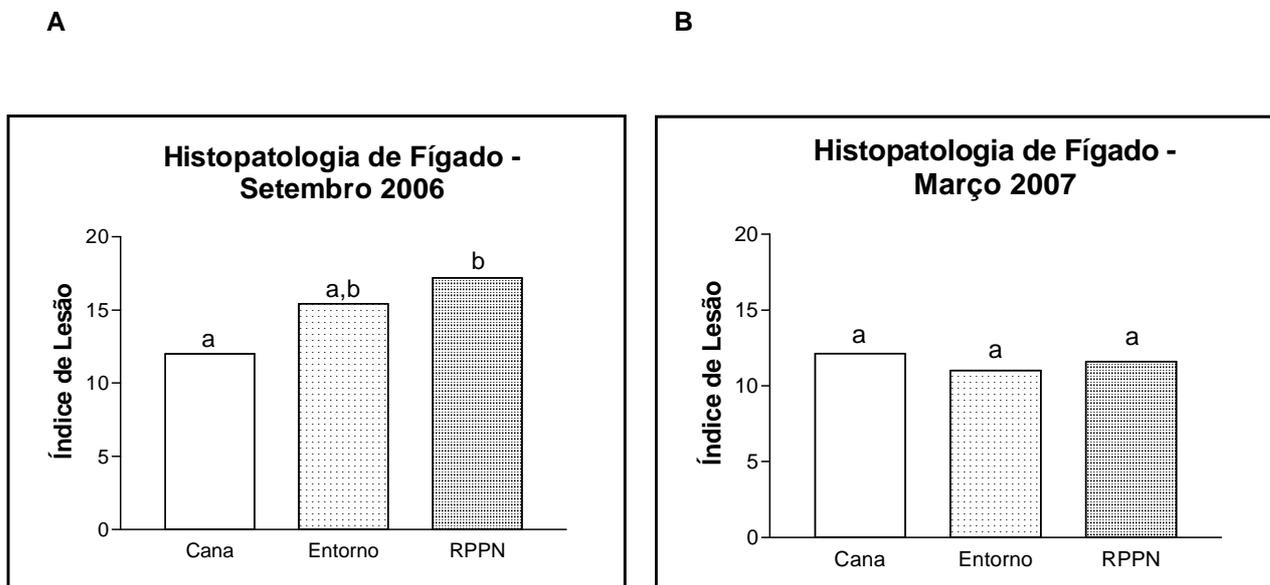


Figura 16 – Índice de Lesão histopatológica em fígado de *Astyanax* sp., nos grupos Cana de Açúcar, Entorno e RPPN. Nível de significância adotado $p < 0,05$. A: Coleta de setembro de 2006, $n=13$. B: Coleta de março de 2007, $n=13$. Letras diferentes expressam grupos estatisticamente diferentes.

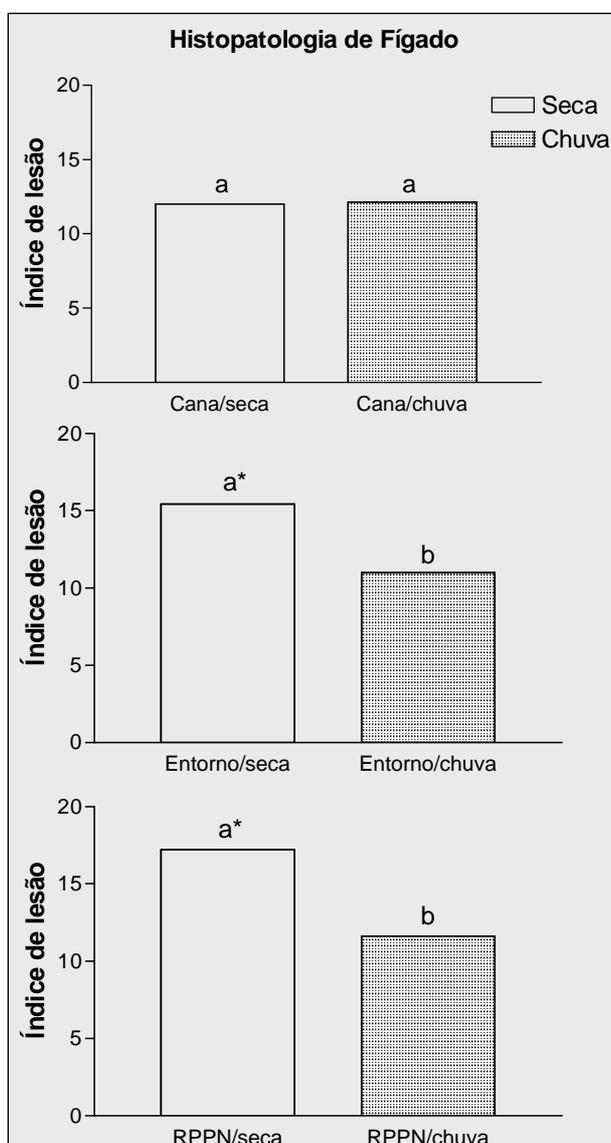


Figura 17 - Índice de Lesão histopatológica em fígado de *Astyanax* sp., nos grupos Cana de Açúcar, Entorno e RPPN, nas diferentes épocas de coleta (seca/setembro 2006 e chuva/março 2007). Letras diferentes expressam grupos estatisticamente diferentes ($n=13$, $p < 0,05$).

I.3.7 Teste do Micronúcleo Písceo

Na contagem de alterações morfológicas nucleares e micronúcleos em eritrócitos do *Astyanax* sp. não foi encontrada diferença entre os pontos cana-de-açúcar, entorno e RPPN na coleta realizada em setembro de 2006, como é possível observar na Figura 18 A. Porém, a Figura 18 B mostra que na coleta realizada em março de 2007 houve diferença entre o entorno e os demais pontos.

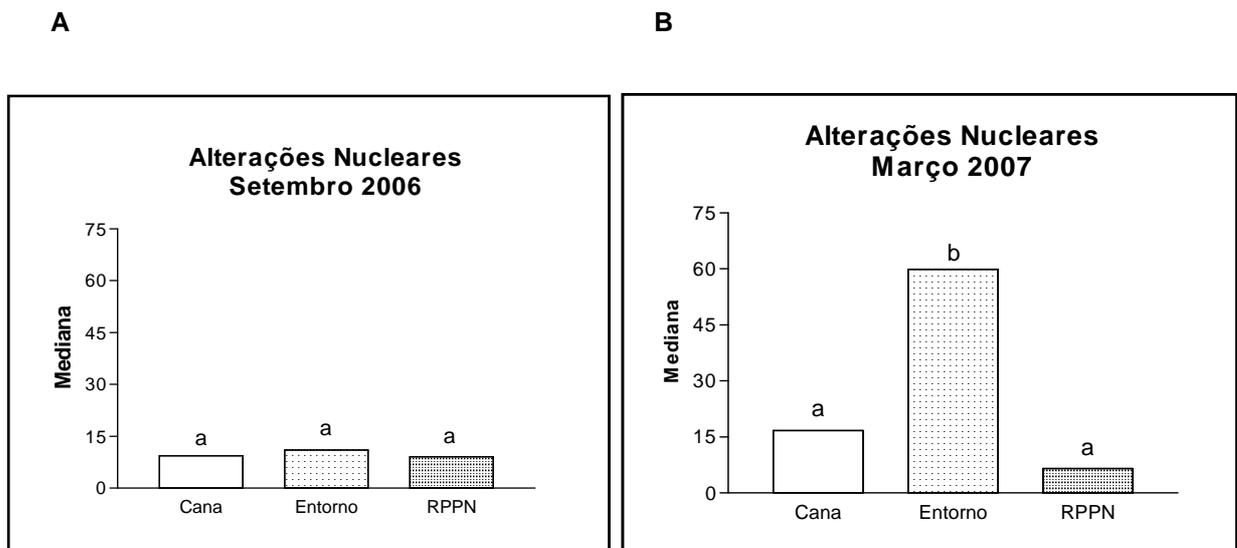


Figura 18 – Alterações nucleares e micronúcleos em eritrócitos de *Astyanax* sp., nos grupos Cana de Açúcar, Entorno e RPPN. Nível de significância adotado $p < 0,05$. A: Coleta de setembro de 2006, $n=15$. B: Coleta de março de 2007, $n=15$. Letras diferentes expressam grupos estatisticamente diferentes.

A Figura 19 apresenta as principais alterações nucleares e a presença de micronúcleos em exemplares de *Astyanax* sp. coletados nesse estudo.

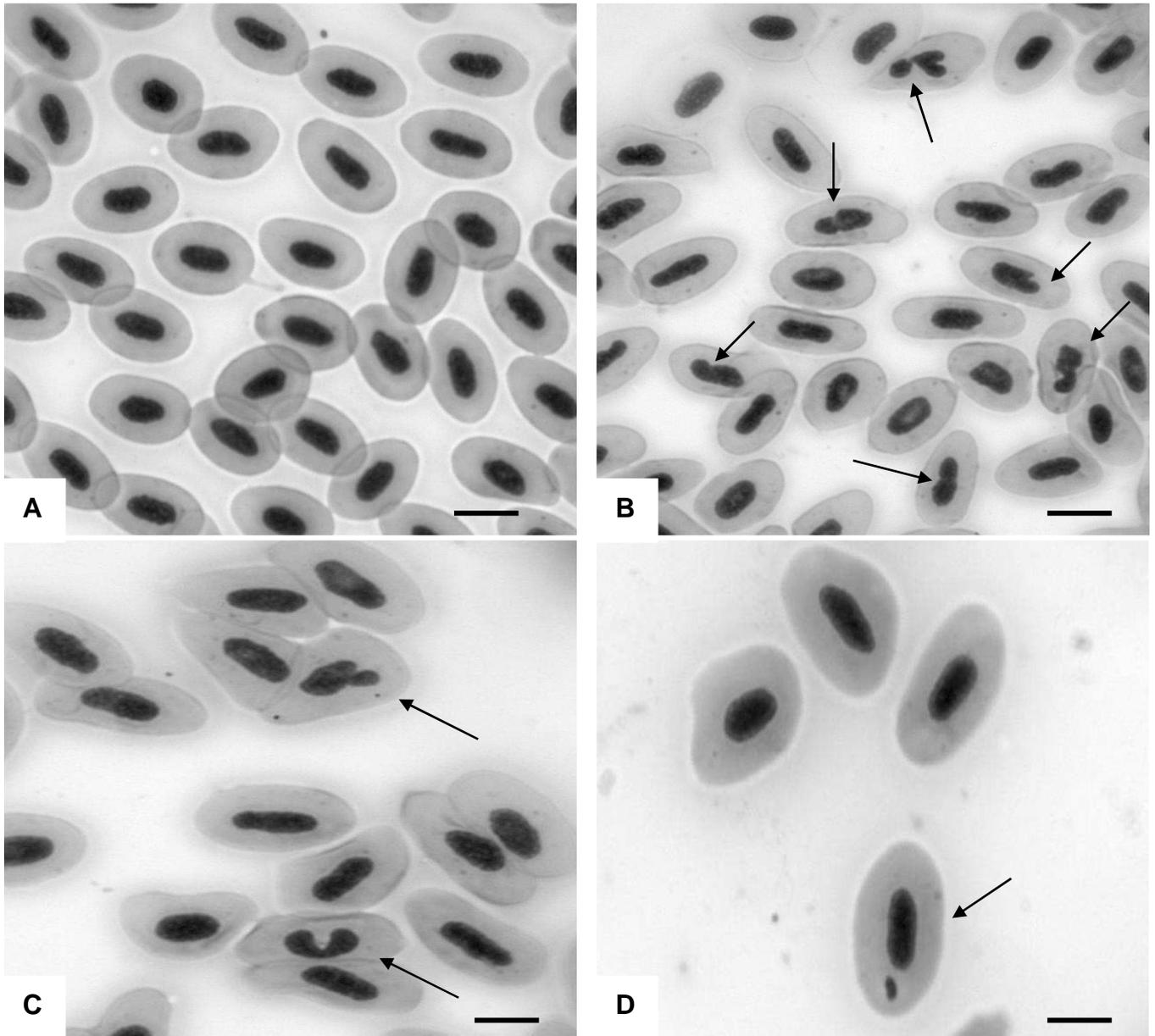


Figura 19 – Eritrócitos de *Astyanax* sp. coletados na Fazenda Barbacena, São Pedro do Ivaí, PR. Coloração em Giemsa 10%. A: estrutura normal dos núcleos dos eritrócitos (Barra = 10 μm). B e C: setas indicam alterações nucleares (Barra em B = 10 μm e Barra em C = 50 μm). D: seta aponta para um eritrócito com um micronúcleo (Barra = 50 μm).

I.4 DISCUSSÃO

Os danos causados por efluentes nos ecossistemas aquáticos vêm sendo estudados mais intensamente ao longo dos últimos 20 anos, especialmente pela intensificação das ações antrópicas consideradas impactantes. Entretanto, ainda a maior parte da bibliografia disponível detecta a presença de pesticidas nos tecidos dos peixes através de exames químicos, havendo, comparativamente, poucas referências sobre análises com biomarcadores bioquímicos, morfológicos e genéticos. Além disso, poucos estudos envolvem análises de mais de um biomarcador em monitoramento de campo, que representa, geralmente, exposição múltipla a diversos tipos de pesticidas.

A exposição de organismos a contaminantes ambientais indica interações entre essas substâncias químicas e os sistemas biológicos, interações essas, que podem resultar em distúrbios bioquímicos e/ou respostas adaptativas dos organismos (MASFARAUD *et al.*, 1992). Na maioria das vezes, os processos metabólicos de biotransformação de fase I e fase II são necessários para desintoxicação e excreção desses compostos em animais aquáticos (GOKSOYR e FÖURLIN, 1992).

Apesar da dificuldade de muitas vezes se avaliar e mensurar os efeitos específicos de misturas químicas nesses ambientes, recentemente tem-se dado ênfase aos estudos com diversos contaminantes, uma vez que os organismos estão de fato expostos a misturas complexas de compostos (OLGUN *et al.*, 2004), as quais podem agir aditivamente, sinergicamente, potencialmente ou antagonicamente nos organismos (KÖNEMANN, 1981).

A indução da atividade da GST verificada na coleta de março de 2007, no ponto localizado no entorno quando este é comprado com os demais pontos de coleta, sugere um aumento do metabolismo dos animais, no intuito de desintoxicação, conseqüência provável da exposição aos herbicidas locais.

Vale ressaltar que não apenas o entorno parece estar sujeito a alterações ambientais, mas também a área de plantio de cana e a RPPN, considerando as diferenças verificadas na atividade da GST (e das outras enzimas estudadas nesse trabalho) quando comparadas as épocas de seca e de chuva. Compostos carcinogênicos, pesticidas e compostos secundários reativos podem ser eliminados via glutatationização (Van Der Oost *et al.*, 2003). A indução da GST em relação à

exposição a pesticidas já foi citada na literatura, como mostram os trabalhos de Egaas *et al.* (1999); Cho *et al.* (1999) e Jonsson *et al.* (2001).

O aumento da atividade da GST também foi reportado para o peixe de água doce *Leuciscus alburnoides*, inserido em áreas com diferentes perfis de contaminação (LOPES *et al.*, 2001). A conclusão desses autores para a análise da GST é que a atividade enzimática aumentada pode estar indicando uma tentativa de adequação metabólica no caso de exposições contínuas a contaminantes. No caso do presente estudo, essa argumentação poderia explicar a indução da GST vista no ponto localizado no entorno da reserva, que após as chuvas passa a receber um maior volume de água dos demais tanques existentes na fazenda, o que pode acarretar em aumento da lixiviação dos pesticidas para esse tanque amostrado.

Em alguns casos também, dependendo da concentração e tipo de contaminantes, a biotransformação de xenobióticos pode envolver reações de oxidação, produzindo espécies ativas de oxigênio. Essas ERO ativam sistemas de defesa antioxidante, sendo que a atividade da enzima GST pode ser indiretamente associada ao estresse oxidativo, uma vez que ela utiliza como co-fator a GSH, e este também participa da degradação do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) através da atuação da enzima Glutathione peroxidase (GPx) (TEW e RONAI, 1999).

O aumento da GST verificado após essa época de concentração de chuvas na região poderia, portanto, indicar ainda uma relação de desequilíbrio no sistema antioxidante dos animais coletados. A GST, tendo sido descrita por alguns autores (HAYES e MCLELLAN, 1999; PASTORE *et al.*, 2003) como agente pró-oxidante, catalisando a conjugação da GSH com xenobiontes, pode estar, então, indicando uma situação de estresse oxidativo nos lambaris. Segundo Xia *et al.* (1996), a expressão da GST é regulada pelo estado redox da célula, atuando como um sensor da variação desse estado (ADLER *et al.* 1999).

A indução da GST também já foi reportada em *Lemna minor* exposta ao diuron (TEISSEIRE e VERNET, 2000), sendo que os autores relacionam esse aumento a uma situação de estresse oxidativo. A atividade da GST e o herbicida diuron têm sido relacionados em diferentes estudos, com diferentes bioindicadores (NIEDERER *et al.*, 2001; BARATA *et al.*, 2006). Silva (2004) verificou, ainda, indução da GST em *Astyanax* sp. residentes em corpos hídricos de áreas de cultivo de arroz e de áreas naturais vizinhas, com interferência de diferentes classes de pesticidas.

Essa modificação oxidativa nos peixes pode afetar uma grande variedade de funções celulares, envolvendo proteínas, e pode contribuir para a ocorrência de danos secundários a outras biomoléculas, como ao DNA e às membranas celulares (EVANS *et al.*, 1999). No caso do dano de lipoperoxidação avaliado no presente estudo, nesse mesmo ponto de coleta, o entorno entre as áreas de plantio de cana e a RPPN (ponto com a indução da GST), o aumento na concentração de hidroperóxidos lipídicos foi visto em ambas as coletas (época de seca e chuva). Variações nos níveis de lipoperoxidação vêm sendo apresentadas como uma resposta eficiente na exposição a poluentes em organismos aquáticos (THOMAS e WOFFORD, 1993; REMEO e GNASSIA-BARELLI, 1997; SRIDEVI *et al.*, 1998). Wilhelm Filho *et al.* (2001) também demonstraram a eficiência da avaliação da lipoperoxidação como biomarcador de estresse oxidativo em espécies neotropicais de água doce, expostas a diversas classes de contaminantes.

Um estudo conduzido no México (TEJEDA-VERA *et al.*, 2007), em um rio que recebe efluentes da produção de cana-de-açúcar, mostrou aumento nos níveis de LPO em *Ameba splendens* e *Goodea atripinnis*, relacionados com os pesticidas aplicados nessa produção, em especial o diuron, o que corrobora a ação negativa desse herbicida sobre os grupos de *Astyanax* sp. estudados nesse trabalho.

Outros estudos também revelaram um aumento na concentração de hidroperóxidos em fígado de organismos expostos a diversos contaminantes, inclusive misturas de pesticidas (LIVINGSTONE *et al.*, 1993; DI GIULIO *et al.*, 1993).

Segundo Acworth e Bailey (1995), quando os ácidos graxos são peroxidados, eles tornam-se mais hidrofílicos, perturbando as funções normais da membrana, seja a membrana plasmática ou as membranas de organelas como mitocôndrias e lisossomos. Desse modo, a peroxidação lipídica traz conseqüências sérias às células. Os hidroperóxidos lipídicos formados durante a LPO podem interagir com outros ácidos graxos, principalmente os poliinsaturados, gerando uma cadeia autocatalítica de peroxidação lipídica, a qual pode levar à modificação estrutural das membranas biológicas (ABUJA e ALBERTINI, 2001). Considerando que a integridade das membranas biológicas é indispensável para a regulação de muitos processos celulares, sua alteração pode comprometer importantes parâmetros como a fluidez, a permeabilidade, o potencial elétrico e o transporte celular (KÜHN e BORCHERT, 2002), acarretando em danos irreversíveis (STRMAC e BRAUNBECK, 2002), como a formação de alterações morfológicas nucleares.

Esse mesmo ponto de coleta, o entorno da área protegida com a área produtiva, apresentou também na coleta de março de 2007, ou seja, após época de chuva, aumento no número de alterações nucleares, incluindo a formação de micronúcleos, fato este que pode estar relacionado com a alteração na concentração de hidroperóxidos citada acima, considerando que os danos ao DNA podem estar diretamente associados à produção de espécies reativas de oxigênio. Como já comentado, estas moléculas altamente reativas são conhecidas por atuarem sobre a estrutura de macromoléculas celulares como proteínas e ácidos nucléicos (EVANS *et al.*, 1999).

A fragmentação do DNA sob condições com aumento da produção de ERO pode ocorrer por dois mecanismos: (1) radicais livres lipídicos produzidos a partir dos ácidos graxos poliinsaturados (tanto na membrana plasmática quanto nuclear) podem diretamente acometer o DNA presente na cromatina do núcleo e/ou (2) a lipoperoxidação em uma célula causa a perda da integridade da membrana celular e pode tornar o ambiente favorável à interferência no DNA por outros tipos de radicais de oxigênio. O radical hidroxila pode inicialmente causar quebra da fita simples do DNA e, posteriormente, levar a quebra da fita dupla (HIGUCHI, 2003).

Danos nucleares e a formação de micronúcleos também foram vistos por Rao *et al.* (1997) e Ayllon e Garcia-Vazquez (2003) com a exposição de peixes a diferentes contaminantes ambientais. Minissi *et al.* (1996) também validam a utilização do micronúcleo em peixes como ferramenta eficaz no monitoramento de ambientes naturais.

Heddle *et al.* (1991) destacam que a formação de micronúcleos é uma resposta a curto prazo frente a uma substância genotóxica, de modo que a sua expressão depende da intensidade da exposição ao contaminante e provavelmente independe da duração de tal exposição. Minissi *et al.* (1996) também mostram que o teste de micronúcleo em eritrócitos de peixes é indicativo de danos de curto prazo, uma vez que podem desenvolver a capacidade de recuperação, fato este observado com o deslocamento dos peixes do sítio contaminado para local controlado. Essas observações podem indicar que após uma época de concentração de chuvas os danos genotóxicos dos compostos utilizados na lavoura de cana-de-açúcar se acentuam e são detectáveis pela técnica de contagem de alteração nuclear utilizada no presente estudo.

Por outro lado, nem todos os compostos que induzem a formação de micronúcleos são clastogênicos. Segundo Heddle *et al.* (1991), essas alterações nucleares podem ser resultante de uma não disjunção do fuso a partir de chamados “contaminantes do fuso”. Desse modo, seriam necessários estudo mais específicos para elucidar os mecanismos pelos quais os peixes coletados tiveram a formação de micronúcleos e aparecimento de outras alterações nucleares.

Em relação à CAT, foi visualizada uma indução da atividade enzimática no ponto localizado no interior da RPPN, na coleta de setembro de 2006 (final da seca). O aumento da atividade específica da CAT também tem sido relatado como indicador de estresse oxidativo (VAN DER OOST *et al.*, 2003). Este aumento sugere uma defesa do organismo na tentativa de eliminar espécies reativas de oxigênio, formadas principalmente durante o metabolismo de compostos químicos.

O termo “estresse oxidativo” denota, portanto, um desequilíbrio entre a produção de agentes pró-oxidantes e os respectivos sistemas de defesa antioxidantes de uma célula ou organismo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; CUI *et al.*, 2004). Esse desequilíbrio favorece, conseqüentemente, o estabelecimento de um ambiente mais oxidante que o normal. As ERO geradas durante o metabolismo oxidativo possuem um limiar de tolerância bastante estreito em todos os organismos aeróbicos (TEW e RONAI, 1999). Elas reagem com vários aminoácidos, o que favorece o aparecimento de enzimas modificadas ou com suas atividades alteradas (BUTTERFIELD *et al.*, 1998). Apesar de não esperada uma contaminação no ponto RPPN, por se tratar da área protegida, parece que os lambaris *Astyanax* sp. ativaram esse sistema de defesa antioxidante (CAT) para restabelecer o balanço redox após uma possível contaminação do meio aquático.

Em ambientes aquáticos, aumento nas atividades de enzimas relacionadas à defesa antioxidante, incluindo a CAT, já foram demonstrados por diversos autores, em diferentes estudos em peixes (LEMAIRE e LIVINGSTONE, 1993; LIVINGSTONE, 2001) e outras espécies expostas a misturas de contaminantes e pesticidas (PORTE *et al.*, 1991; RODRIGUEZ-ARIZA *et al.*, 1993). Peixinho dourado (*Carassius auratus*) exposto a misturas de herbicidas, incluindo o diuron, mostrou alteração em enzimas de estresse oxidativo e, como conseqüência, reduziram sua resistência contra patógenos, sugerindo uma ação imunossupressora, conforme mostra o trabalho de Fatima *et al.* (2006). Exposição de organismos ao glifosato, e a

marcas comerciais deste composto, também mostrou alteração da atividade da catalase, com e sem o uso de surfactante, no estudo de Gehin *et al.* (2006).

Quando comparadas as épocas de seca e chuva, as atividades específicas da GST e AchE tendem a mostrar uma relação direta dose-resposta se considerarmos que a chuva aumenta a disponibilidade dos pesticidas na água. Segundo Rank *et al.* (2005) aumento prolongado de chuvas pode causar turbulência dos sedimentos e transporte de poluentes para locais distantes do seu local de origem, ou acúmulo de contaminantes em corpos d'água sem grande circulação, como em lagos e tanques. Já na atividade da CAT parece que outros fatores podem estar associados nessa relação. Segundo Vassuer e Cossu-Leguille (2003), a diminuição da CAT pode estar associada a uma toxicidade diferencial do poluente em maiores concentrações, decorrente dessa relação indireta dose-resposta, e pode, mesmo assim, provocar danos celulares por desequilíbrio no sistema antioxidante.

Em relação à AchE, outros compostos além dos organofosforados e dos carbamatos parecem ter a capacidade de inibir as colinesterases (GILL *et al.*, 1990). Porém, segundo Sturm *et al.* (2000), as concentrações desses outros inibidores requeridas para promover efeitos sobre a AchE seriam relativamente altas em comparação aos fosforados e carbamatos.

Vale salientar que apesar dos resultados encontrados nesse estudo para a enzima AchE, a medida da inibição da colinesterase é amplamente aceita como método diagnóstico de exposição a agentes anticolinesterásicos em vertebrados. Variações específicas de atividade dessa enzima são inúmeras e a viabilidade do uso dela como biomarcador de poluição aquática deve sempre estar relacionada à caracterização nas diferentes espécies (STURM *et al.*, 1999).

A atividade da colinesterase em peixes e outros organismos aquáticos tem sido utilizada globalmente como biomarcador de contaminação em programas de monitoramento por diferentes grupos (STURM *et al.*, 1999; RODRIGUEZ-FUENTES e GOLD-BOUCHOT, 2000; MONSERRAT e BIANCHINI, 2001; MONSERRAT *et al.*, 2002; VENTURA *et al.*, 2002; CORSI *et al.*, 2003; MONTEIRO *et al.*, 2005; TORTELLI *et al.*, 2006).

Analisando conjuntamente os biomarcadores bioquímicos, tem-se que a indução da CAT no tecido hepático pode indicar uma exposição dos peixes, até mesmo no interior da reserva, aos herbicidas aplicados com maior frequência na área de estudo (glifosato e diuron). Já o aumento da LPO encontrado no grupo

coletado no limite entre a área produtiva e a RPPN sugere uma formação de radicais livres que não estão sendo eliminados pelo sistema antioxidante desses organismos. Os herbicidas poderiam estar provocando lipoperoxidação celular e o aumento da GST nesse mesmo ponto poderia indicar, em especial, a tentativa de eliminação dos xenobiontes pelos peixes.

Foram observadas alterações morfológicas no tecido hepático em todos os pontos amostrados, nas diferentes estações pluviométricas, não havendo, portanto, dentro das áreas investigadas nenhuma que estivesse completamente livre de alteração.

Lesões histopatológicas têm sido freqüentemente descritas como importantes ferramentas em estudos de biomonitoramento devido à facilidade de interpretação tanto em situações de exposição aguda quanto crônica (WESTER *et al.*, 2002; GÜL *et al.*, 2004; OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2005). Assim como relatado neste trabalho, a ocorrência de lesões hepáticas em animais expostos ambientalmente a contaminantes tem sido reportada em organismos aquáticos por outros autores como NOREÑA-BARROSO *et al.* (2004) e OLIVEIRA RIBEIRO *et al.* (2005).

Devido aos processos de absorção e metabolização as lesões observadas no fígado estão geralmente relacionadas à exposição contínua a poluentes. A ocorrência de necroses foi a mais evidente neste estudo. Este tipo de lesão tem sido registrada em peixes de áreas impactadas por múltiplos contaminantes (PACHECO e SANTOS, 2002; STEHR *et al.*, 2003; OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2005). Áreas de necrose causam prejuízos funcionais e estruturais no fígado de peixes (STENTIFORD *et al.*, 2003), podendo causar o colapso do órgão (RABITTO *et al.*, 2005). Embora a ocorrência de áreas necróticas não ter sido, nesse estudo, relacionada diretamente com a quantificação de um determinado pesticida, o aparecimento dessa lesão tem sido freqüentemente observada em recursos hídricos contaminados por agrotóxicos (FANTA *et al.*, 2003). A presença de necroses em indivíduos coletados no interior da RPPN e também nas áreas mais próximas aos cultivos de cana-de-açúcar representa um indicativo de que os corpos hídricos locais estejam comprometidos.

Melanomacrófagos podem ser visualizados como células pigmentadas (ou conjunto de células no caso do centro de melanomacrófagos) em órgãos como fígado, rim anterior e intestino de peixes. Hartley *et al.* (1996) propuseram a utilização de melanomacrófagos como biomarcador de poluição aquática a partir da

quantificação destas estruturas. Segundo Rabitto *et al.* (2005), essa sensibilidade em relação a exposição a contaminantes vem do fato dos melanomacrófagos estarem relacionados a respostas inflamatórias e desintoxicação de substâncias exógenas. Meseguer *et al.* (1994), ao observarem abundantes macrófagos livres no parênquima do fígado, sugeriram que estes se movem livremente dentro do parênquima formando os centros de melanomacrófagos quando há um aumento na atividade fagocítica como resposta imune a lesões em indivíduos expostos a contaminantes. No presente estudo, foi observada uma alta incidência de melanomacrófagos livres em organismos que também apresentaram áreas de necrose, o que pode indicar que os melanomacrófagos estejam envolvidos, nesse caso, na remoção de células necróticas.

A vacuolização citoplasmática observada no fígado dos lambaris das áreas estudadas pode representar, por sua vez, um mecanismo de imobilização de compostos mais lipofílicos como descrito por Oliveira Ribeiro *et al.* (2005) em *Anguilla anguilla* ambientalmente exposta a pesticidas. Essa vacuolização pode indicar que os animais acumulam o xenobiótico na tentativa de reduzir a concentração deste na circulação e demais tecidos, conforme verificado por França (2005) para o peixe *Atherinella brasiliensis*.

Segundo Bernet *et al.* (1999), a infiltração de células de defesa, como a infiltração leucocitária observada no presente estudo, é uma resposta do organismo frente a presença de contaminantes. Geralmente, essas áreas são encontradas próximas a outras lesões como focos de necrose, sendo que essas células atravessam as paredes dos vasos sanguíneos e infiltram no tecido afetado. Já os centros eosinofílicos encontrados nos lambaris da Fazenda Barbacena podem ser considerados como um estágio pré-neoplásico (HAWKINS *et al.*, 1990), servindo como um potencial biomarcador de exposição (STENTIFORD *et al.*, 2003) frente a seriedade desse tipo de lesão.

É necessário ressaltar, nesse sentido, que a RPPN foi a área que apresentou maior incidência de lesões pelo cálculo de Bernet *et al.* (1999) e que o maior índice de lesão visto para a época de seca nesse ponto, quando comparado com a estação chuvosa, corrobora a observação de alterações biológicas nos lambaris da reserva e a importância do monitoramento dessa área. Além disso, vale considerar que os dados morfológicos podem indicar uma exposição cumulativa da RPPN a contaminantes aquáticos. Os indivíduos coletados imediatamente no entorno, por

outro lado, apresentaram alterações agudas, fato este que sugere diferença na estrutura dos grupos de *Astyanax* sp. dentro e fora da área protegida. De qualquer modo, as lesões morfológicas aparecem em todos os pontos, em ambas as coletas, o que reforça a proposta de um monitoramento contínuo da efetividade de conservação não apenas da reserva, mas também de seu entorno.

Embora a toxicidade aguda do glifosato seja considerada baixa, a WHO (1994) têm sugerido que o herbicida pode causar defeitos crônicos em determinadas espécies de animais quando administrado em doses elevadas e por um período prolongado, sendo os peixes e os invertebrados aquáticos os mais sensíveis a este herbicida e aos outros componentes de seus produtos comerciais. No caso do Roundup, tem-se que a toxicidade do produto comercial é maior que o glifosato utilizado sozinho, provavelmente pela toxicidade do surfactante, como mostra o estudo de Folmar *et al.* (1979) no tratamento de diversas espécies de peixes com roundup, glifosato e o surfactante. O glifosato se mostrou menos tóxico que o roundup ou o surfactante, e a toxicidade do roundup foi similar a do surfactante.

Um experimento conduzido por Rossi (dados não publicados), também com o gênero *Astyanax* sp. exposto aos herbicidas glifosato e diuron em laboratório, indica maior sensibilidade dos peixes ao Diuron (exposição em dose subletal 30 mg/L), os quais tiveram aumento na atividade da GST e aumento na atividade da AchE. Nesse mesmo estudo, o grupo com a mistura desses dois herbicidas mostrou aumento na concentração de hidroperóxidos. Esses resultados corroboram com o presente estudo, demonstrando que os dados encontrados nas coletas realizadas na Fazenda Barbacena devem ter relação com a aplicação de pesticidas na região de cultivo de cana-de-açúcar.

Em relação ao uso do *Astyanax* sp. como bioindicador nesse trabalho tem-se que as características mais marcantes foram: (1) a sensibilidade do gênero no uso dos biomarcadores aqui estudados e (2) na visualização de danos sub-letais. Esta última característica permite pôr em prática ações remediadoras ou, melhor, ações preventivas em áreas protegidas. Daí a importância e o interesse atual de incorporação do biomonitoramento em programas de manejo de unidades de conservação inseridas em mosaicos de alteração antrópica.

Vale ressaltar, todavia, que a interpretação dos resultados de campo é sempre muito complexa, pois um grande número de fatores pode influenciar as variáveis analisadas de maneira não controlada (ROCHE *et al.*, 2002; ZANETTE *et*

al., 2006). Abordagens realizadas com múltiplos biomarcadores fornecem uma melhor caracterização de uma dada área durante um período de tempo em estudos de biomonitoramento. Este trabalho tem, portanto, um caráter preliminar sugerindo uma exposição dos lambaris aos herbicidas utilizados na Fazenda Barbacena.

CAPÍTULO II: BIOMONITORAMENTO COMO FERRAMENTA PARA O INCREMENTO DE PLANOS DE MANEJO EM RESERVAS PARTICULARES DO PATRIMÔNIO NATURAL: CASO DA RPPN FAZENDA BARBACENA

II.1 CONTEXTUALIZAÇÃO DAS RPPN E LEVANTAMENTO DA PROBLEMÁTICA DA RPPN FAZENDA BARBACENA

O sistema de áreas protegidas do Brasil possui uma ampla heterogeneidade no que diz respeito às estratégias de proteção e às categorias de conservação. Em sua especificidade, a temática da conservação em terras particulares tem se ampliado de forma considerável, crescendo principalmente a partir da década de 90, quando os mecanismos de conservação privada passaram a ser incrementados no Brasil.

Reservas privadas se diferenciam de acordo com a situação legal, forma de manejo, origem da iniciativa de criação, atividades oferecidas, instituição responsável e formas de instituição. Como categoria de área protegida privada prevista no Sistema Nacional de Unidades de Conservação Brasileiro (SNUC, 2000), as Reservas Particulares do Patrimônio Natural (RPPN) são caracterizadas como áreas particulares de relevante interesse ecológico, instituídas voluntariamente, cujo objetivo principal é o de conservar a biodiversidade e onde se admite o uso indireto dos recursos naturais.

As 800 RPPN atualmente existentes no Brasil têm, cada vez mais, servido como um instrumento adicional para o fortalecimento do sistema de unidades de conservação, protegendo mais de 600 mil hectares em todo o país. As RPPN representam um mecanismo eficiente para ampliação de áreas sob proteção legal, para o aumento da conectividade da paisagem natural, para proteção complementar à rede de áreas protegidas públicas, além de contribuírem na proteção de áreas prioritárias para a conservação da diversidade biológica.

Na Mata Atlântica, bioma foco desse estudo, as RPPN já representam o dobro, em número, das unidades de conservação públicas de proteção integral, sendo reconhecidas pela sua importância para a proteção da biodiversidade, seu valor paisagístico, educacional ou outras variáveis que dependam de proteção ou restauração do habitat natural. Atualmente, mais da metade das RPPN do Brasil

estão localizadas nesse bioma, 75% (558 RPPN), e mesmo com tamanho muitas vezes modesto, as RPPN têm sido fundamentais para garantir a proteção da diversidade biológica dos estados que compõem esse ecossistema, em especial por incremento aos chamados corredores ecológicos.

A Tabela 3 mostra o número de RPPN em cada estado da Mata Atlântica, categoria essa que conserva aproximadamente 200 mil hectares no bioma. Apesar da diferença de representatividade nas ecorregiões desse bioma, o movimento de conservação em RPPN está em ascensão, como é possível perceber na Figura 20. Esses esquemas permitem notar que há um crescimento atual no número de RPPN no Brasil, apesar da falta de incentivos gerais para a conservação em terras privadas, o que demonstra o perfil de continuidade das ações por parte dos diferentes atores envolvidos no tema, principalmente dos proprietários das reservas, incluindo empresas privadas.

TABELA 3 – REPRESENTAÇÃO DAS RPPN NO BIOMA MATA ATLÂNTICA

UF	Número de RPPN no Bioma Mata Atlântica	Área (ha)
Alagoas	7	610,58
Bahia	54	33.799,19
Ceará	10	9.600,39
Espírito Santo	4	586,22
Minas Gerais	143	76.098,25
Paraíba	8	6.652,62
Paraná	191	37.149,77
Pernambuco	10	2.857,53
Sergipe	1	13,27
Rio Grande do Norte	3	2.939,93
Rio Grande do Sul	25	4.044,79
Rio de Janeiro	44	4.230,39
Santa Catarina	25	15.212,97
São Paulo	33	3.348,99
Total	558	197.144,89

FONTE: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis- IBAMA, Ministério do Meio Ambiente e Órgãos Ambientais Estaduais, 2007.

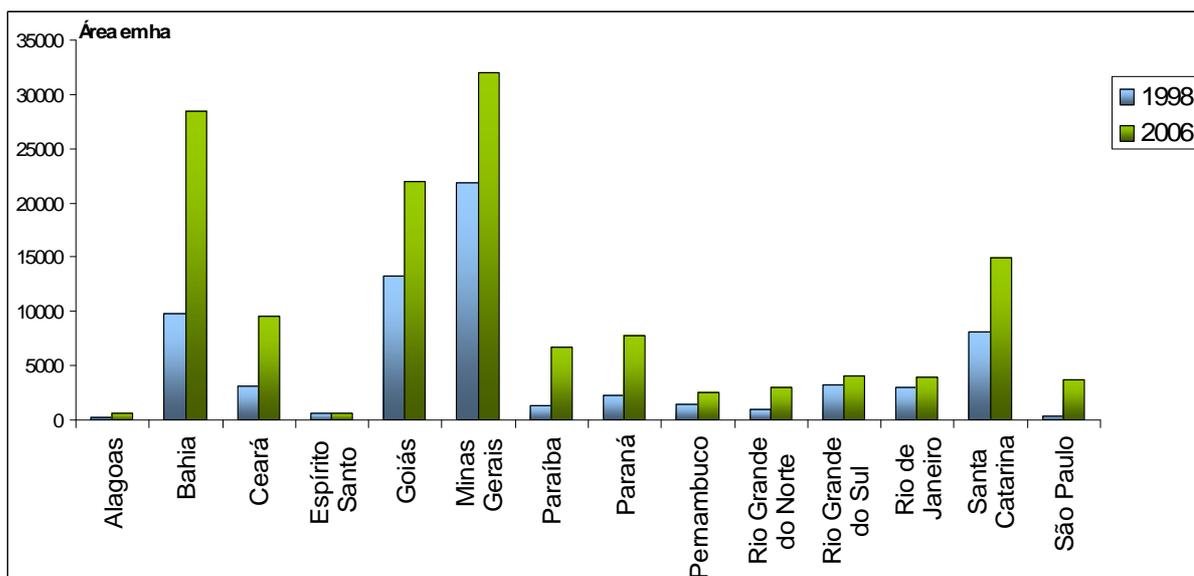


Figura 20 - Desenvolvimento da criação de RPPN na Mata Atlântica, de 1998 a 2006.
 FONTE: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis- IBAMA,
 Ministério do Meio Ambiente e Órgãos Ambientais Estaduais, 2006.

Considerando ainda, que remanescentes importantes para a conectividade da paisagem estão localizados em sua maioria dentro de propriedades particulares, é imprescindível incrementar o sistema de conservação em terras privadas, não deixando, entretanto, de considerar a efetividade de conservação dessas áreas.

Embora se note esse potencial, é importante considerar, por outro lado, que proprietários de RPPN, organizações ambientalistas e mesmo técnicos de órgãos ambientais reconhecem a necessidade de fortalecimento para trabalhar com o tema. A preocupação com a quantidade e qualificação dos responsáveis pelo desenvolvimento e consolidação dos mecanismos de conservação privada, e até mesmo dos gestores diretos das RPPN, tem sido constante.

Paralelamente, a necessidade de compreender e manejar essas áreas é tarefa prioritária, já que, muitas vezes, as demandas sócio-econômicas (atividades industriais, agrícolas, entre outras) tendem a colidir com os interesses conservacionistas. Considerando que muitas RPPN estão sujeitas a impactos ocasionados pelas matrizes produtivas, estudos para a elaboração/incremento dos planos de manejo dessas áreas devem ser desenvolvidos, objetivando a detecção e a minimização dos possíveis danos existentes em um trabalho conjunto da área protegida com seu entorno.

Sob o ponto de vista das atividades realizadas no entorno das RPPN, em especial do Sul e Sudeste do Brasil, a atividade agrícola e suas características de produção merecem destaque na presente discussão. Segundo Tomita (2002), os ambientes aquáticos inseridos em complexos agrícolas podem ser afetados diretamente pelo carreamento de pesticidas utilizados nas culturas de soja, milho, cana-de-açúcar, arroz, entre outros.

Na RPPN Fazenda Barbacena, considerada um dos mais importantes fragmentos da Floresta Estacional Semidecidual do estado do Paraná e foco desse trabalho, esse tema encontrou abertura, sendo realizado o estudo de monitoramento através de biomarcadores em *Astyanax* sp.

A RPPN Fazenda Barbacena, localizada na região noroeste do Estado do Paraná, inserida na Fazenda Barbacena, município de São Pedro do Ivaí, foi criada em 2004 (pela Portaria 207/2004) e possui importante papel na preservação hidrográfica da Bacia do Ivaí (a reserva está inserida na microbacia do Rio Barbacena, afluente de 1ª ordem do Rio Ivaí). As atividades realizadas atualmente na área protegida abrangem turismo ecológico, educação ambiental e pesquisa científica. O entorno da RPPN é composto por uma região de plantio, utilizada pela Usina Vale do Ivaí. A atividade principal se caracteriza pela produção de cana de açúcar, a qual utiliza, periodicamente, diferentes tipos de pesticidas recomendados para esse tipo de cultivo, em especial o glifosato e o diuron.

Os resultados discutidos no capítulo I, para o estudo de biomonitoramento, permitem afirmar que os pontos amostrados no interior da RPPN, bem como no entorno da reserva e na área de plantio direto de cana-de-açúcar, não estão completamente livres de algum tipo de alteração causada por esse sistema de produção.

Nesse sentido, o presente capítulo pretende discutir possibilidades de incremento ao plano de manejo da RPPN Fazenda Barbacena, frente ao diagnóstico dessas alterações.

II.2 BIOMONITORAMENTO AMBIENTAL NA GESTÃO DE RPPN

Um dos primeiros passos para a resolução dos problemas sócio-ambientais gerados pela gestão inadequada dos recursos hídricos é o desenvolvimento de

metodologias de diagnóstico eficientes. O presente trabalho aponta a importância do tema Biomonitoramento, que consiste no uso sistemático das respostas fisiológicas mensuráveis em organismos vivos para avaliar as mudanças ocorridas no ambiente (VAN DER OOST *et al.*, 2003), como ferramenta para o incremento de planos de manejo em reservas particulares.

Apesar do grande número de variáveis encontradas em campo dificultar a relação causa-efeito de uma determinada alteração em organismos, estrutura de populações ou de comunidades; o biomonitoramento permite uma avaliação mais ampla das condições naturais às quais os organismos estão sujeitos, o que de fato pode colaborar na discussão da efetividade de conservação de uma área protegida. O monitoramento que combina diferentes testes em sistemas biológicos (biomarcadores) propicia, por sua vez, promissores instrumentos para a identificação de impactos no ambiente (DA SILVA *et al.*, 2003).

Concomitante à realização do estudo dos biomarcadores citados no Capítulo I, a proposta deste trabalho foi, portanto, subsidiar uma discussão sobre o manejo das RPPN em relação ao seu entorno. Em linhas gerais, os tópicos aqui discutidos poderão ser aplicados em duas diferentes esferas: (1) divulgação e discussão dos resultados e recomendações de manejo na RPPN Estadual Fazenda Barbacena e na comunidade do entorno; (2) apresentação em congressos e encontros de proprietários de RPPN, fortalecendo a idéia de um manejo integrado das reservas com seu entorno, considerando, inclusive, a implantação de “zonas de amortecimento” para essa categoria de unidade de conservação, salvo as particularidades do uso desse instrumento em áreas particulares e sem o caráter de obrigatoriedade.

A proposta é criar, deste modo, subsídios para a gestão integrada da RPPN Fazenda Barbacena com sua área de entorno produtora de cana de açúcar, sem, no entanto, descaracterizar o objetivo de conservação que norteia essa UC.

2.1 Zonas de Amortecimento em RPPN

A criação de unidades de conservação é a forma mais tradicional de se proteger ecossistemas. Contudo, o entorno, em muitas destas áreas, vem sendo manejado sem critérios de conservação, determinando a formação de “ilhas”, as

quais permitem que as UC possam sofrer mais diretamente os impactos das atividades externas. Uma das soluções para esta questão, segundo Orlando (1997), é o estabelecimento de zonas de amortecimento ou tampão (*buffer zones*) com restrições ou proibições de atividades no entorno das unidades.

A Lei Federal nº 9.985, de 18 de julho de 2000, que institui o Sistema Nacional de Unidades de Conservação – SNUC, define zona de amortecimento como sendo “o entorno de uma unidade de conservação onde as atividades humanas estão sujeitas às normas e restrições específicas, com o propósito de minimizar os impactos negativos sobre a unidade”. O SNUC determina a obrigatoriedade das UC, exceto na Área de Proteção Ambiental – APA e na Reserva Particular do Patrimônio Natural - RPPN, em possuir uma zona de amortecimento e que o órgão da administração da unidade é o responsável pela regulamentação da ocupação e do uso dos recursos desta área.

O tema central aqui, contudo, não é entrar no mérito da obrigatoriedade da implantação de uma área de entorno com restrições específicas, e sim discutir a importância dos instrumentos “Zona de Amortecimento” e “Biomonitoramento” no manejo de reservas particulares. A implantação de medidas nesse sentido em fragmentos de RPPN no sul e sudeste do país é particularmente importante devido ao processo de insularização ocorrido principalmente no início da década de 70. Este período coincidiu com a fase de mecanização da agricultura no estado do Paraná, que se caracterizou pelo uso intensivo de agrotóxicos e fertilizantes químicos.

Primeiramente, acreditava-se que as ações em UC deveriam ser realizadas dentro de seus limites, fato este que vem sofrendo mudanças considerando que freqüentemente as ameaças originam-se fora dos limites dessas unidades. Atualmente, Planos de Manejos caracterizam-se por ser contínuos, gradativos e flexíveis, abordando novos enfoques, como a proteção integrada com o entorno.

Nesse enfoque e de acordo com Orlando (1997), zona de amortecimento “é uma zona periférica às áreas protegidas, onde são feitas restrições no uso dos recursos ou nas medidas de desenvolvimento para melhorar os valores de conservação dessas áreas”. Segundo MMA/IBAMA (1997), o conceito de zona de amortecimento é análogo ao existente sobre a zona de transição ou zona tampão, e esta proposta apóia-se, ainda, na Convenção sobre Diversidade Biológica (1994), que afirma que cada parte responsável, na medida do possível e conforme o caso,

deve promover o desenvolvimento sustentado e ambientalmente sadio nas áreas adjacentes às áreas protegidas a fim de reforçar a proteção destas áreas. Este documento descreve os principais problemas nas UC vizinhas a áreas agrícolas, problemas estes causados principalmente pela contaminação ocasionada por defensivos agrícolas e pela prática das queimadas.

Outro conceito importante é o de “Área de Influência”, que significa “área que exerce alguma influência direta sobre a unidade, considerando-se principalmente as microbacias onde a mesma está inserida, bem como quaisquer outras áreas onde outros atores interfiram na unidade ou que a unidade possa interferir sobre elas” (MMA/IBAMA, 1996). Esta expressão se apoiou na Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) nº 13/90, que determinou uma faixa de 10 km em torno das unidades de conservação, na qual qualquer atividade que possa afetar a biota deve ser obrigatoriamente licenciada pelo órgão ambiental competente.

No caso específico das RPPN não há a intenção de caracterizar uma faixa de entorno e/ou uma zona de amortecimento de fato, mas sim apontar possibilidades para a gestão de reservas particulares inseridas em mosaicos produtivos, em especial a RPPN Fazenda Barbacena, utilizando esse conceito de área de influência.

Ao trazer outros conceitos de zonas de amortecimento, fica mais evidente a relação destas com programas de biomonitoramento. Segundo Padovan (2000), para se implantar uma área de menor impacto no entorno de áreas protegidas, é importante considerar se a intervenção humana é direta ou indireta, é real ou potencial, onde o desenho e manejo devem considerar as interações entre pessoas e recursos, identificar áreas ou situações críticas nestas inter-relações, além de orientar o manejo segundo a demanda real destas áreas ou situações críticas. Conforme Cerqueira *et al.* (2003), entorno é a área circunvizinha a uma UC, onde o uso do solo pode influenciar, tanto positiva como negativamente o ambiente natural desta. Morsello (2001) define essa zona como uma porção adjacente à área protegida, no qual o uso da terra é parcialmente restringido para incorporar uma camada a mais de proteção para a UC. Pode ter a função de ampliar a presença na área protegida de certo tipo de habitat e pode servir a propósitos sociais. Já Brites *et al.* (2003) afirmam que o estabelecimento de UC por si só não assegura a efetiva manutenção de comunidades, haja visto que essas áreas podem ser verdadeiras

ilhas que, isoladas em meio à paisagem, sofrem deterioração progressiva de seus ambientes, na maioria das vezes, partindo da borda.

No biomonitoramento, por sua vez, tem-se que estudos que consideram a biota nativa de um local (os bioindicadores) por meio de testes em sistemas biológicos podem ser utilizados como excelentes ferramentas para a identificação de ameaças ao ambiente. Em estudos ecotoxicológicos, o maior objetivo é a detecção da causa-efeito entre sistemas biológicos e as misturas complexas de poluentes aos quais organismos podem estar expostos. Daí a relação com o manejo de áreas protegidas, considerando a ecotoxicologia como um dos instrumentos capazes de diagnosticar ameaças da área de entorno.

Atualmente no Brasil, já existem instrumentos que auxiliam o planejamento considerando as atividades do entorno de um RPPN. Em 2004, em uma iniciativa que reuniu diferentes profissionais que trabalham com reservas particulares, de órgãos ambientais públicos, universidades e organizações não-governamentais, foi criado o roteiro metodológico para elaboração de plano de manejo para Reservas Particulares do Patrimônio Natural. O roteiro trás, entre outras características, os itens “caracterização da área de entorno” e “pesquisa e monitoramento” nas RPPN. Quando trata da caracterização do entorno, há indicação para descrição do uso da terra, bem como os impactos e ameaças, tratando das atividades e situações que estejam em desenvolvimento no entorno da RPPN que conflitem com seus objetivos de criação. Já no item de pesquisa, o roteiro indica, quando possível e quando de interesse do proprietário, o desenvolvimento de estudos e parcerias para o monitoramento da área e das possíveis alterações na biota da reserva.

Além desse instrumento, hoje bastante utilizado, o Paraná, pelo decreto estadual nº4890 de 2005, dispõe sobre as RPPN como sendo unidades de conservação de proteção integral, e coloca o órgão estadual como um dos responsáveis pelo controle e monitoramento da qualidade ambiental das reservas instituídas e presentes no sistema estadual de unidades de conservação. Um dos mecanismos desenvolvidos para esse auxílio na gestão e efetividade de conservação das RPPN, descrito nesse decreto, é o uso de recursos provindos da Lei do ICMS Ecológico (Lei nº 59/91), pleiteado junto aos Municípios beneficiários desse aporte, para que realizem ações concretas de apoio, consolidação e proteção das RPPN. A RPPN Fazenda Barbacena é, atualmente, beneficiária desse recurso e o utiliza no desenvolvimento de ações de pesquisa, de educação e turismo na área,

porém atividades ligadas diretamente ao monitoramento de impactos do entorno ainda não são desenvolvidas.

2.2 Plano de Manejo da RPPN Fazenda Barbacena

Segundo o Plano de Manejo para a RPPN Fazenda Barbacena, a elaboração do planejamento desta foi baseada nos “dados que se encontram já disponíveis sobre a unidade e visitas de campo, destacando-se os diagnósticos procedidos da avifauna local, abrangendo observações e apontamentos sobre outros grupos animais, e da flora da área realizado no último trimestre de 2003, além das observações e anotações procedidas em entrevistas com funcionários da Fazenda Barbacena e da Vale do Ivaí S/A – Açúcar e Álcool sobre as características físicas e ocupacionais da área e do seu entorno”.

A partir desses levantamentos, foram criados os seguintes programas para reserva: (1) Programa de Interpretação e Educação Ambiental; (2) Programa de Controle Ambiental; (3) Programa de Manejo do Meio Ambiente e (4) Programa de Operacionalização.

Os resultados do biomonitoramento desenvolvido por esse estudo podem, portanto, ser incorporados por esses programas, conforme os tópicos que se seguem.

2.2.1 Recomendações para o Plano de Manejo da RPPN Fazenda Barbacena e gestão da área de entorno

2.2.1.1 Subprograma de Monitoramento da Qualidade das Águas e Subprograma de Controle do Entorno

Esses programas indicam o monitoramento ambiental dos cursos d'água da reserva, apontando o controle dos processos erosivos e de carreamento exagerado de sedimentos nos talvegues; o monitoramento de gramíneas exóticas nas bordas; o controle dos canais de vinhaça e de descarte de lixo. Não indicam, por outro lado, o

monitoramento dos corpos hídricos em relação às possíveis alterações causadas pelo uso contínuo de pesticidas na área de entorno.

Além da sugestão para que o plano englobe o conceito de biomonitoramento trabalhado nesse estudo, cabe aqui a discussão da recuperação da mata ciliar da área de cultivo de cana e o trabalho diferenciado da área de influência da RPPN, por meio de ações de controle na aplicação de pesticidas e/ou na prática de um manejo diferenciado da cana-de-açúcar.

Segundo Nery (2000), o rápido crescimento da cana é considerado como ponto positivo no manejo dessa produção por permitir uma boa cobertura do solo, facilitando o controle da erosão e da lixiviação de pesticidas, por exemplo. Por outro lado, o uso constante de herbicidas e fertilizantes é mostrado pelo mesmo autor como um dos maiores problemas dessa atividade. Nesse contexto, deve-se considerar também a problemática ocasionada pela supressão das matas ciliares, o que pode acarretar, em diferentes graus, aumento no impacto sobre os recursos hídricos adjacentes, mesmo que a cana possibilite na maior parte do tempo a cobertura do solo.

Diferentes estudos mostram que em áreas onde não há mata ciliar, córregos e rios adjacentes à área de plantio de cana sofrem impacto de diferentes classes de pesticidas, em especial no sedimento e na água após processo de lixiviação (SANTOS, 1999; OLIVEIRA e TORNISIELO, 2000). O estudo de Corbi (2006) mostrou que corpos hídricos com ausência de mata ciliar, localizados em áreas de plantio de cana, apresentam maior impacto quando investigadas as concentrações de metais e de pesticidas, quando comparadas com área florestadas e/ou com mata ciliar.

Nesse contexto, a recuperação das matas ciliares da Fazenda Barbacena pode ser uma das possibilidades de melhoria da qualidade ambiental do entorno da RPPN em questão e, conseqüentemente, das comunidades biológicas da reserva. Além disso, a implantação e recuperação dessas áreas de proteção permanente podem propiciar o desenvolvimento e incremento de corredores biológicos da RPPN Fazenda Barbacena com outros fragmentos da região.

Quanto ao manejo diferenciado do cultivo de cana no entorno imediato da RPPN, vale destacar, aqui, a possibilidade de o plano de manejo incorporar uma “zona de amortecimento” ou “zona de transição” no que diz respeito ao uso de técnicas ambientalmente corretas da agricultura convencional, desenvolvimento de

uma área com sistemas agroflorestais (que podem também ser utilizados no programa de educação ambiental) e/ou ainda na implementação de uma faixa de produção livre de pesticidas.

No caso da produção livre de pesticidas, a proposta seria difundir técnicas agrícolas compatíveis com um modelo ambiental mais durável, que valoriza os aspectos econômicos e pode agregar renda diferencial ao produtor. Segundo UNILIVRE (1999), para a área do entorno do Parque Nacional do Iguaçu, por exemplo, o zoneamento da unidade recomenda o cultivo orgânico de diferentes culturas, inclusive a de cana-de-açúcar.

A Instrução Normativa 007/99 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 1999), considera “sistema orgânico de produção agropecuária e industrial todo aquele em que se adotam tecnologias que otimize o uso dos recursos naturais e socioeconômicos, tendo como um dos objetivos a eliminação do emprego de agrotóxicos e outros insumos artificiais tóxicos”. Oliveira *et al.* (2007) mostram em seu trabalho que as condições físico-químicas e bioquímicas do solo de uma área com cultivo orgânico de cana apresenta melhores índices quando comparados à área de plantio convencional.

2.2.1.2 Programa de Interpretação e Educação Ambiental

Rodriguez e Gomez (1992), em estudo no Parque Nacional Cerro Corá, no Paraguai, sugeriram um programa de educação ambiental que enfoque também os problemas que afetam a manutenção dos recursos naturais na zona de amortecimento, a relação que existe entre os produtos diariamente utilizados e sua origem nos recursos naturais e soluções ao alcance dos gestores para minimizar os problemas.

No ano de 2005, a Vale do Ivaí realizou um trabalho de interpretação ambiental com alunos do ensino fundamental e médio das escolas municipais e estaduais de São Pedro do Ivaí, além de uma atividade com trabalhadores rurais que participaram de um curso de Bolsa de Qualificação. No ano de 2006, foram realizadas visitas com trilhas interpretativas e atividades de sensibilização para alunos do PETI e grupos da 3ª. Idade do município, durante a II Semana do Meio Ambiente. Em 2007, por sua vez, a RPPN recebeu a Faculdade Integrada de Campo

Mourão, FAFIJAN de Jandaia do Sul e ainda escolas do município. Durante a III Semana do Meio Ambiente realizada pela empresa, a comunidade também teve oportunidade de conhecer a reserva.

Apesar desses trabalhos de caráter mais pontual e do Plano de Manejo indicar o uso do instrumento educativo “interpretação de trilhas”, não há indicação direta de público alvo a ser trabalhado no programa de educação ambiental da RPPN. A proposta, a partir disso seria, então, desenvolver um programa contínuo de educação ambiental para os trabalhadores rurais da empresa, não apenas com interpretação de trilhas, mas com a aproximação efetiva destes à RPPN. Em um primeiro momento, o programa poderia ser direcionado aos trabalhadores que realizam aplicação dos pesticidas, por exemplo, mostrando a relação do entorno com a área protegida e a importância da conservação dos recursos hídricos locais. Esse programa poderia colaborar, ainda, para a ação prevista no Plano de Manejo em relação à fiscalização de despejo de lixo no entorno da área, provocado por trabalhadores rurais em períodos de intervalo de suas atividades no cultivo de cana-de-açúcar.

Vale ressaltar que a integração entre a Educação Ambiental e as demais ciências foi considerada fundamental pelo MMA (2000) para a eficácia na conservação dos biomas, pois pode alavancar processos participativos que favoreçam a conservação. Nesse contexto, a comunidade científica e os gestores das unidades têm uma grande responsabilidade em divulgar as informações às comunidades locais.

II.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para Milano (1998), o plano, como instrumento de planejamento, deve contar com três aspectos fundamentais: deve tratar do futuro, deve implicar em ação e deve identificar as pessoas ou organizações que realizarão as atividades.

É necessária, nesse contexto, a compreensão de que a gestão de áreas protegidas não é estanque, é processo, o que implica em estágios de transição onde ocorrem contínuas avaliações e correções de direção e sentido. Para Ducros (1988), algumas ilhas de proteção de nada servem, se no exterior tem-se uma degradação dos recursos naturais, uma alienação dos indivíduos e uma uniformização das

culturas, portanto é preciso ser objetivo para seguir com a gestão de unidades de conservação.

Em linhas gerais, o presente projeto vem contribuir, portanto, para o desenvolvimento de estratégias que visem um efetivo controle das alterações em RPPN inseridas em um mosaico agropecuário, aprimorando metodologias de manejo e possibilitando a criação de ferramentas para a realização de ações de proteção nas regiões de entorno dessas unidades, amortizando alterações e colaborando para evitar a insularização das áreas protegidas.

CONCLUSÕES GERAIS

- O lambari *Astyanax* sp. mostrou-se um organismo capaz de expressar efeitos de contaminação ambiental e, apesar das dificuldades para identificação em campo, pode ser considerado um bom bioindicador;
- Os resultados das análises bioquímicas demonstram aumento da atividade da Catalase (CAT) em *Astyanax* sp. no interior da RPPN na estação de seca; aumento da atividade da Glutathiona S-transferase (GST) em *Astyanax* sp. na cana de açúcar na estação de chuva; e aumento da concentração de Peroxidação Lipídica (LPO) em *Astyanax* sp. no entorno da reserva em ambas as coletas. A avaliação da atividade da Acetilcolinesterase (AChE) em *Astyanax* sp. não demonstrou diferença para os pontos amostrais cana de açúcar, entorno e RPPN;
- Os resultados do estudo de histopatologia do fígado de *Astyanax* sp demonstram lesões em todos os pontos amostrais, em ambas as estações estudadas. Os dados encontrados podem indicar uma exposição cumulativa da RPPN a contaminantes aquáticos. Os indivíduos coletados imediatamente no entorno, por outro lado, parecem apresentar alterações agudas;
- Os resultados da análise do micronúcleo písceo em *Astyanax* demonstram um aumento no número de alterações nucleares no entorno da reserva, na estação de chuva, seguindo os dados encontrados para a enzima GST e para a LPO;
- Os resultados encontrados nas análises realizadas para os peixes coletados na Fazenda Barbacena e RPPN parecem ter relação com a aplicação de pesticidas (como o glifosato e diuron) na região de cultivo de cana-de-açúcar;
- Os resultados encontrados podem nortear a elaboração de estratégias de minimização de alterações causadas por pesticidas em áreas do entorno da RPPN Fazenda Barbacena, São Pedro do Ivaí, Paraná.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUJA, P. M.; ALBERTINI, R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. **Clin. Chemis. Acta**, v. 306, p. 1-17, 2001.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Acad. Press**, v. 105, p. 121-126, 1984.

ACWORTH; B., 1995 In: RODRIGUES, L. C. **Estudo das glutathione S-transferases hepáticas solúveis do peixe *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Pacu)**. Tese de doutorado em Bioquímica, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes/UERJ, Brasil, 2003.

ADLER, V.; YIN, Z.; FUCHS, S. Y. Regulation of JNK signaling by GSTp. **Embo. J.**, v. 18, p. 1321–1334, 1999.

AKAISHI, F. M.; SILVA DE ASSIS, H. C.; JAKOBI, S. C. G.; STJEAN, S.; COUTERNAY, S. C.; LIMA, E.; WAGNER, A. L. R.; SCOFIELD, A.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 46, p. 244–253, 2004.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of The Cell**, 4a.ed, Garland, New York, 2002.

AL-SABTI, K. Clastogenic effects of live carcinogenic-mutagenic chemicals on the cells of the common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 85, p. 5–9, 1986.

AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutat. Res.**, v. 343, p. 121–135, 1995.

AMADO, L. L.; DA ROSA, C. E.; LEITE, A. M.; MORAES, L.; PIRES, W. V.; LEÃES PINHO, G. L.; MARTINS, C. M. G.; ROBALDO, R. B.; NERY, L. E. M.; MONSERRAT, J. M. Biomarkers in croakers *Micropogonias furnieri* (Teleostei: Sciaenidae) from polluted and non-polluted areas from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil): Evidences of genotoxic and immunological effects. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 52, n. 2, p. 199-206. 2006.

AMARANTE JUNIOR, O. P.; SANTOS, T. C. R. Glifosato: Propriedades, Toxicidade, Usos e Legislação. **Quím. Nov.**, v. 25, n. 4, p. 589-593, 2002.

ANDRIAN, I. F. Dieta de *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) (Characiformes, Characidae), da área de influência do reservatório de Corumbá. Estado de Goiás, Brasil. **Acta Scient.**, Maringá, v. 23, n. 2, p. 435-440, 2001.

ANVISA. Agrotóxicos e Toxicologia: Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos: relatório anual 2004. **Citação e referências a documentos eletrônicos**. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br>> Acesso em: 22 abril, 2006.

ANVISA. Agrotóxicos e Toxicologia: Monografia de produtos agrotóxicos. **Citação e referências a documentos eletrônicos**. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br>> Acesso em: 18 novembro, 2006.

ARMAS, E. D.; MONTEIRO, R. T. R.; AMANCIO, A. V. The use of pesticides in sugar cane at the Corumbataí river basin and the risk of water pollution. **Quím. Nov.**, v. 28, n. 6, p. 975-982, 2005.

AYLLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and molie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. **Mutat. Res.**, v. 467, p. 177-186, 2001.

AYLLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Micronuclei and other lesions as genotoxicity indicators in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 79, p. 221-225, 2003.

BAKER, R. C.; KRAMER, R. E. Cytotoxicity of short-chain alcohols. **Annu. Rev. Pharmacool. Toxicol.**, v. 39, p. 127-150, 1999.

BAINY, A. C. D.; SAITO, E.; CARVALHO, P. S. M.; JUNQUEIRA, V. B. C. Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. **Aquat. Toxicol.**, v. 34, p.151-162, 1996.

BARATA, C.; DAMÁSIO, J.; LÓPEZ, M. A.; KUSTER, M.; LÓPEZ DE ALDA, M.; BARCELÓ, D.; RIVA, M. C.; RALDÚA, D. Combined use of biomarkers and in situ bioassays in *Daphnia magna* to monitor environmental hazards of pesticides in the field. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 26, p. 370-379, 2006.

BENZIE, I. F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. **Int. J. Food Sci. Nut.**, v. 47, p. 233–261, 1996.

BERNET, D.; SCHIMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHRADT-HOLM, P.; WAHLI, T. Histopatology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **J. Fish Diseases.**, v. 22, p. 25-34, 1999.

BETTERIDGE, D. J. What is oxidative stress? **Metab.**, v. 49, p. 3-8, 2000.

BLUS, L. J. Organochlorine pesticides. In: HOFFMAN, D. J.; RATTNER, B. A.; BURTON, G. A.; CAIRNS, J. (Eds.). **Handbook of Ecotoxicology**. Boca Raton: Lewis. p. 275-300, 1995.

BOMBAIL, V.; AW, D.; GORDON, E.; BATTY, J. Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. **Chem.**, v. 44, p. 383–392, 2001.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRITEZ, R. M. Manejo do Entorno. In: MMA. **Fragmentação de Ecossistemas – Causas, Efeitos sobre a Biodiversidade e Recomendações de Políticas Publicas**, Brasília: MMA, 508p, 2003.

BRITSKI, H. A.; SATO, Y.; ROSA, A. B. S. 1972. **Manual de identificação de peixes da região de Três Marias**: (com chaves de identificação para os peixes da bacia do São Francisco). Brasília: CODEVASF, 1988.

BUSCHBACHER, R. 2000. **Expansão agrícola e perda da biodiversidade no cerrado** (Origens históricas e o papel do comércio internacional). Brasília, DF: WWF - Fundo Mundial para a Natureza, 98p.

BUTTERFIELD, D. A.; KOPPAL, T.; HOWARD, B.; SUBRAMANIAM, R.; HALL, N.; HENSLEY, K.; YATIN, S.; ALLEN, K.; AKSENOV, M.; AKSENOV, A.; CAI, J.; JONES, D. P. Superoxide in apoptosis: mitochondrial generation triggered by cytochrome C loss. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 11401-11404, 1998.

CAMARGO, M. M. P.; MARTINEZ, C. B. R. Biochemical and physiological biomarkers in *Prochilodus lineatus* submitted to in situ tests in an urban stream in southern Brazil. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 21, p. 61-69, 2006.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M. S. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminants effects. **Can. J. Fish. Sci.**, v. 47, p. 2123–2136, 1990.

CAVENAGUI, A. L.; NEGRISOLI, E.; TOFOLI, G. R.; VELINI, E.; COSTA, E. A. D.; COSTA, A. G. F. Dinâmica de herbicidas em palhada de cana-de-açúcar. In: **Anais 8º Congresso Nacional da STAB**, p. 170-174. 2002.

CERQUEIRA, R. Glossário. In: MMA. **Fragmentação de Ecossistemas – Causas, Efeitos sobre a Biodiversidade e Recomendações de Políticas Públicas**, Brasília: MMA, 508p, 2003.

CESTARI, M. M.; LEMOS, P. M. M.; OLIVEIRA-RIBEIRO, C. A.; COSTA, J. R. M. A.; PELLETIER, E.; FERRARO, M. V. M.; MANTOVANI, M. S.; FENOCCHIO, A. S.; Genetic damage induced by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by the comet assay and chromosomal aberrations. **Gen. Mol. Biol.**, v. 27, p. 270–274, 2004.

CHO J. R.; KIM Y. J.; HONG K. J.; YOO J. K.; LEE J. O.; AHN Y. J.; CHO J. R.; KIM Y. J.; HONG K. J.; YOO J. K.; LEE J. O.; AHN Y. J. Resistance monitoring and enzyme activity in field-collected populations of the spiraea aphid, *Aphis citricola* Van der Goot. **J. Asian Pac. Entomol.**, v. 2, p.113-119, 1999.

CORBI, J. J. **Influência de práticas de manejo de solo sobre os macroinvertebrados aquáticos de córregos: ênfase para o cultivo de cana-de-açúcar em áreas adjacentes**. Tese doutorado, Universidade Federal de São Carlos, 92p, 2006.

CORSI, I.; MARIOTTINI, M.; SENSINI, C.; LANCINI, L.; FOCARDI, S. Fish as biomarkers of brackish ecosystem health: integrating biomarker responses and target pollutant concentrations. **Oceanol. Acta**, v. 26, p. 129-138, 2003.

COSTA, J. R. M. A. **Biomarcadores de contaminação em peixes de água doce, por exposição ao chumbo (II): ensaios laboratorias e estudo de caso preliminar no rio Ribeira (SP/PR)**. Dissertação mestrado, Universidade Federal do Paraná. 2001.

CUI, K.; LUO, X.; XU, K.; VEN MURTHY, M. R. Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. **Biol. Psych.**, v. 28, p. 771-799, 2004.

DAMEK-PROPRAWA, M.; SAWICKA-KAPUSTA, K. Damage to the liver; kidney and testis with reference to burden of heavy metals in yellow-necked mice from areas around steelworks and zinc smelters in Poland. **Toxicol.**, v. 186, p. 1–10, 2003.

DA SILVA, J. HEUSER, V.; ANDRADE, V. Biomonitoramento Ambiental. **Gen. Toxicol.**, p.167-178, 2003.

DAVIES, P. E.; COOK, L. S. J. Catastrophic macroinvertebrate drift and sublethal effects on brown trout, *Salmo trutta*, caused by cypermethrin spraying on a Tasmanian stream. **Aquat. Toxicol.**, v. 27, p. 201- 224, 1993.

DI GIULIO, R. T.; HABIG, C.; GALLAGHER, E. P. Effects of Black Rock Harbor sediments on indices of biotransformation, oxidative stress, and DNA integrity in channel catfish. **Aquat. Toxicol.**, v. 26, p. 1–22, 1993.

DIPLOCK, T. A.; CHARLEUX, J. L.; CROZIER-WILLI, G.; KOK, F. J.; RICE-EVANS, C.; ROBERFROID, M.; STAHL, W.; VIÑA-RIBES, J. Functional food science and defense against reactive oxidative species. **Br. J. Nutr.**, v. 80, p. 77–112, 1998.

DORAN, W. J.; COPE, G. W.; RADA, R. G.; SANDHEINRICH, M. B. Acetylcholinesterase inhibition in the threeridge mussel (*Amblema plicata*) by chlorpyrifos: implications for biomonitoring. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 49, p. 91-98, 2001.

DUARTE, N. F. Potenciais Impactos Ambientais da Monocultura da Cana-de-açúcar. In: Valadão, R. C.; Landau, E. C. (eds.) **Análise Integrada do Meio Ambiente – Lagoa da Prata, MG**. Belo Horizonte, MG. 2003.

DUCROS, JEAN J. Les experiences de divulgation dans la réserve de la biosphère des Cévennes. In: Seminario Internacional Sobre Reservas De La Biosfera Mediterraneas, Montseny. Montseny: **UNESCO**, 1988.

EGAAS, E.; SANDVICK, M.; FJELD, E.; KALLQVIST, T.; GOKSOYR, A.; SVENSEN, A. Some effects of the fungicide propiconazole on cytochrome P450 and glutathione S-transferase in brown trout (*Salmo trutta*). **Comp. Biochem. Physiol. C; Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.**, v. 122, p. 337-344, 1999.

ELLMANN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDREAS, V. J.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmacol.**, v. 7, p. 88, 1961.

EVANS, P.; LYRAS, L.; HALLIWELL, B. Measurement of protein carbonyls in human brain tissue. **Meth. Enzymol.**, v. 300, p. 145–156, 1999.

FATIMA, M.; MANDIKI, S. N. M.; DOUXFILS, J.; SILVESTRE, F.; COPPE, P.; KESTEMONT, P. Combined effects of herbicides on biomarkers reflecting immune–endocrine interactions in goldfish Immune and antioxidant effects. **Aquat. Toxicol.**, v. 81, p. 159-167, 2006.

FANTA E.; RIOS, F. S.; ROMÃO, S.; VIANNA, A. C. C.; FREIBERGER, S. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 54, p. 119-130, 2003.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutat. Res.**, v. 455, p. 81-95, 2000.

FENT, K. Ecotoxicology of organotin compounds. **Crit. Rev. Toxicol.**, v.26, n.1, p. 3-10, 1996.

FERNANDES, C. A.; MARTINS-SANTOS, I. C. Cytogenetic studies in two populations of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes). **Hered.**, v. 141, p. 1-5, 2004.

FERRARO, M. V. M.; FENOCCHIO, A. S.; MANTOVANI, M. S.; CESTARI, M. M.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Mutagenic effects of tributyltin (TBT) and inorganic lead (PbII) on the fish *H. malabaricus* as evaluated of using the Comet Assay, Piscine Micronucleous and Chromosome Aberrations tests. **Gen. Mol. Biol.**, v. 27, p. 103–107, 2004.

FEUSSNER, I.; KÜHN, H.; WASTERACK, C. The lipoxygenase dependent degradation of storage lipids. **Tren. Plant Sci.**, v. 6, p. 268–273, 2001.

FEUSSNER, I.; WASTERACK, C.; KINDL, H.; KÜHN, H. Lipoxygenase catalysed oxygenation of storage lipids is implicated in lipid mobilization during germination of cucumber. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 92, p. 11849–11853, 1995.

FILHO, O. G.; BRAGA, F. M. S. Fecundidade e desova de *Astyanax bimaculatus* e *Astyanax schubarti* (Characidae, Tetragonopterinae) na represa Barra Bonita, Rio Piracicaba, São Paulo. **Unimar**, v. 18 (2), p. 241-254, 1996.

FINK, S. V.; FINK, W. L. interrelationships os the Ostariophysan fishes (teleostei). **Zool. J. Linnean Soc.**, v. 72, p. 297-353, 1981.

FOLMAR, L. C.; SANDERS, H. O.; JULIN, A. M. Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates. **Arch. Environ. Cont. Toxicol.**, 1979.

FRANÇA, P. P. **Uso de biomarcadores na avaliação do impacto do acidente do navio Vicuna/2004 na Baía de Paranaguá, Pr. Análises Preliminares.** Monografia, Departamento Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná, 2005.

FUNATURA (FUNDAÇÃO PRÓ-NATUREZA). Sistema Nacional de áreas naturais protegidas – SISNANP (4º relatório parcial). Brasília, **FUNATURA**, 24p, 1989.

GALLOWAY, T. S.; MILLWARD, N.; BROWNE, M. A.; DEPLEDGE, M. H. Rapid assessment of organophosphorus / carbamate exposure in the bivalve mollusc *Mytilus edulis* using combined esterase activities as biomarkers. **Aquat. Toxicol.**, v. 61, p. 169-180, 2004.

GASPAR DA LUZ, K. D.; OKADA, E. K. Diet and dietary overlap of three sympatric fish species in lake of the upper Paraná river floodplain. **Braz. Arch. Biol. Tech.**, v. 42, n. 4, p. 441-447, 1999.

GAYNOR, J. D.; MACTAVISH, D. C.; FINDLAY, W. I. Atrazine and metolachlor loss in surface and subsurface runoff from three tillage treatments in corn. **J. Environ. Qual.**, v. 24, p. 246-256, 1995.

GEHIN, A.; GUYON, C.; NICOD, L. Glyphosate-induced antioxidant imbalance in HaCaT: The protective effect of Vitamins C and E. **Environ. Toxicol. Pharmacool.**, v. 22, p. 27-34, 2006.

GEISSBUHLER, H.; MARTIN, H.; VOSS, G. Phenylureas. In: KEARNEY, P. C.; KAUFMAN, D. D. (Ed.). **Herbicides: chemistry, degradation and mode of action.** New York: Marcel Dekker, v. 1, p. 216-218, 1975.

GEORGE, S. G. Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotic – conjugating enzymes in fish. In: **Aquat. Toxicol.**, 1993.

GIESY, J. P.; GRANEY, R. L. Recent developments in and intercomparisons of acute and chronic bioassays and bioindicators. **Hydrobiol.**, v. 188, p. 21-60, 1989.

GILL, T. S.; PANDE, J.; TEWARI, H. Enzyme modulation by sublethal concentrations of aldicarb, phosphamidon and endosulfan pesticides in fish tissues. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.97, p. 244-287, 1990a.

GILL, T. S.; TEWARI, H.; PANDE, J. Use of the fish enzyme system in monitoring water quality: effects of mercury on tissue enzymes. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 97, p. 287-292, 1990b.

GIROTTI, A. W. Serial Review: Regulatory and Cytoprotective Aspects of Lipid Hydroperoxide Metabolism. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 33, p. 154–172, 2002.

GLUSCZAK, L.; MIRON, D. S.; MORAES, B. S.; SIMÕES, R. R.; CHITOLINA SCHETINGER, M. R.; MORSCH, V. M.; LORO, V. L. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Comp. Biochem. Physiol.**, p. 519-524, 2007.

GOKSOYR, A.; FÖRLIN, L. The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. **Aquat. Toxicol.**, v. 22, p. 287-312, 1992.

GRISOLIA, C. K.; CORDEIRO, C. M. T. Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. **Gen. Mol. Biol.**, v. 23, p. 235-239, 2000.

GUILLOUSO, A.; MOREL, F.; RATANASAVANH, D.; CHESNE, C.; GUGUEN-GUILLOUSO, C. Long-term culture of functional hepatocytes. **Toxic vit.**, v. 4, p. 415-427, 1990.

GÜL, S.; BELGE-KURUTAS, E.; YILDIZ, E.; SAHAN, A.; DORAN, F. Pollution correlated modifications of liver antioxidant systems and histopathology of fish (Cyprinidae) living in Seyhan Dam Lake. **Turk. Environ. Int.**, v. 30, n. 5, p. 605-609, 2004.

HABIG W. H.; JAKOBY, W. B. Assays for differentiation of glutathione S transferases. **Meth. Enzymol.**, v. 77, p. 398-405, 1981.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Biol. Chem.**, v. 249, p. 7130-7139, 1974.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radic. Biol. Med.**, 3a. ed. Oxford Science Publications, Oxford, 1999.

HANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 5ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. P. 159-161, 2004.

HARTLEY, W.R. THIYAGARAJAH, A. & TREINIES, A.M. Liver lesions in the gar fish (lepisosteidae) as biomarker of exposure. **Mar. Environ. Res.**, v. 42, p. 217-221, 1996.

HAYES, J. D.; MCLELLAN, L. I. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. **Free Radic Res.**, v. 31, p. 273– 300, 1999.

HEDDLE, J. A. A rapid in vivo test for chromosomal damage. **Mutat. Res.**, v. 18, p. 187-190, 1973.

HEDDLE, J. A.; CIMINO, M. C.; HAYASHI, M.; ROMAGNA, M. D.; TUCKER, J. D.; VANPRAIS, P. H.; MCGREGOR, J. T. Micronuclei as a index of Citogenetic Damage: past, present and future. **Environ. Mol. Mutag.**, v. 18, p. 277–291, 1991.

HENDRICKS, E. E.; SHAEFFER, D. J.; PERRY, J. A. In: LEVIN, S. A.; HARWELL, M. A.; KELLY, J. R.; KIMBALL, K. D. **Ecotoxicology: Problems and Approaches**, Springer-Verlag, New York; cap. 13, p. 351-364, 1989.

HERMES-LIMA M.; WILLMORE, W. G.; STOREY, K. B. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III) xylenol orange complex formation. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 19, p. 271-280, 1995.

HIGUCHI, Y. Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress. **Biochem. Pharmacol.**, v. 66, p. 1527-1535, 2003.

HOOFTMAN, R. N.; de RAAT, W. K. Induction of nuclear anomalies (micronulei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmea* by ethyl methanesulphonate. **Mutat. Res.**, v. 104, p. 147-152, 1982.

HUGGETT, R. J.; KIMERIE, R. A.; MEHRIE, J. P. M.; BERGMAN, H. L. Biomarkes: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Antropogenic Stress. **Boca Raton**: Lewis Publishers, 1992.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/>. Acesso em: 15 de setembro de 2007.

JIANG, Z. Y.; HUNT, J. V.; WOLF, S. P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analyt. Biochem.**, v. 202, p. 384-389, 1992.

JONSSON, C. M.; FERRACINI, V. L.; PARAÍBA, L. C.; RANGEL, M.; AGUIAR, S, R. Alterações bioquímicas e acúmulo em pacus (*metynnis argenteus*) expostos ao paclobutrazol. **Sci. Agricol.**, v. 59, n. 3, p. 441-446, 2001.

KEHRIG, H. A.; PINTO, F. N.; MOREIRA, I.; MALM, O. Heavy metals and methylmercury in a tropical coastal estuary and a mangrove in Brazil. **Org. Geochem.**, v. 34, n. 5, p. 661-669, 2003.

KÖNEMANN, H. Fish toxicity tests with mixtures of more than two chemicals: A proposal for a quantitative approach and experimental results. **Toxicol.**, v. 19, p. 229-238, 1981.

KOZAR, R. A.; MCKEONE, B. J.; POWNALL, H. J. Free radical induced alterations in endothelial cell function. **J. Surg. Res.**, v. 56, p. 32–36, 1994.

KÜHN, H.; BORCHERT, A. Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 33, p. 154-172, 2002.

LANGE, C. R.; SCOTT, S. R.; TANNER, M. Biomonitoring. **Water Environ. Res.**; v. 68, n. 4, p. 801-818, 1996.

LEMAIRE, P. ; LIVINGSTONE, D. R. Pro-oxidant/antioxidant processes and organic xenobiotics interactions in marine organisms, in particular the flounder *Platichthys .esus* and mussels *Mytilus edulis*. **Trends Comp. Biochem. Physiol.** v.1, p. 1119–1150, 1993.

LIMA, F. C. T.; MALABARBA, . R. In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS Jr. C. J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre, 2003.

LIONETTO, M. G.; CARICATO, R.; GIORDANO, M. E.; PASCARIELLO, M. F.; MARINOSCI, L.; SCHETTINO, T. Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an italian coastal marine area. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 46, p. 324-330, 2003.

LIVINGSTONE, D. R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 42, p. 656–666, 2001.

LIVINGSTONE, D. R.; LEMAIRE, P.; MATTHEWS, A.; PETERS, L. D.; BUCKE, D.; LAW, R. J. Pro-oxidant, antioxidant and 7-ethoxyresorufin O -deethylase (EROD) activity responses in liver of dab (*limanda*) exposed to sediment contaminated with hydrocarbons and other chemicals. **Mar. Pol. Bull.**, v. 26, p. 602–606, 1993.

LOPES, P. A.; PINHEIRO, T.; SANTOS, M. C.; DA LUZ MATHIAS, M.; COLLARES-PEREIRA, M. J.; VIEGAS-CRESPO, A. M. Response of antioxidant enzymes in freshwater fish populations (*Leuciscus alburnoides* complex) to inorganic pollutants exposure. **Sci. Total Environ.**, v. 280, p. 153–163, 2001.

MANNICK, J. B.; SCHONHOFF, C. M. Nitrosylation: the next phosphorylation? **Arch. Biochem. Biophysics**, v. 408, p. 1-6, 2002.

MASON, R. P.; WALTER, M. F.; MASON, P. E. Effect of oxidative stress on membrane structure: small-angle X-ray diffraction analysis. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 23, p. 419–425, 1997.

MATSUI, K.; SHIBATA, Y.; TATEBA, H.; HATANAKA, A.; KAJIWARA, T. Changes of lipoxygenase and fatty acid hydroperoxide lyase activities in bell pepper fruits during maturation. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 61, p. 199–201, 1997.

MCCARTHY, J. F.; SHUGART, L. R. Biological markers of environmental. **Boca Raton: Lewis Publishers**, p. 3-16, 1990.

MEAGHER, E. A.; FITZGERALD, G. A. Indices of lipid peroxidation *in vivo*: Strengths and limitation. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 26, p. 202–226, 2000.

MESEGUER, J.; LÓPEZ-RUIZ, A.; ESTEBAN, M.A. Melano-macrophages of the seawater teleosts, sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*): morphology, formation and possible function. **Cell Tissue Res.**, v. 277, p 1-10, 1994.

MINISSI, S.; CICCOTTO, E.; RIZZONI, M. Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay for the in situ detection of mutagens in freshwater. **Mutat. Res.**, v. 367, p. 245–251, 1996.

MIKICH, S. B. A dieta dos morcegos frugívoros (Mammalia, Chiroptera, Phyllostomidae) de um pequeno remanescente de Floresta Estacional Semidecidual do sul do Brasil. **Rev. Bras. Zool.**, v. 19, p. 239-249, 2002.

MIKICH, S. B.; BIANCONI, G. V.; MAIA, B. H. L. N. S.; TEIXEIRA, S. D. Attraction of the fruit-eating bat *Carollia perspicillata* to *Piper gaudichaudianum* essential oil. **J. Chem. Ecol.**, v. 10, p. 2379-2383, 2003.

MILANO, Miguel S. Mitos e manejo de unidades de conservação no Brasil, ou a verdadeira ameaça. In: Congresso Brasileiro de Unidades de Conservação, 2., 2000, Campo Grande. **Anais do Congresso**. Campo Grande: Rede Nacional Pró-Unidades de Conservação; Fundação O Boticário de Proteção à Natureza, 2000.

MMA/IBAMA. **Marco conceitual das unidades de conservação federais do Brasil**. Brasília: IBAMA; GTZ, 1997.

MMA/IBAMA. **Roteiro metodológico para o planejamento de unidades de conservação de uso indireto**. Brasília: IBAMA, 1996.

MONSERRAT, J. M.; BIANCHINI, A. Anticholinesterase effect of eserine (physostigmine) in fish and crustacean species. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 44, n. 1, p. 63-68, 2001.

MONSERRAT, J. M.; BIANCHINI A.; BAINY, A. C. D. Kinetic and toxicological characteristics of acetylcholinesterase from the gills of oysters (*Crassostrea rhizophorae*) and other aquatic species. **Mar. Environ. Res.**, v. 54, n. 3-5, p. 781-785, 2002.

MONTEIRO, M.; QUINTANEIRO, C.; MORGADO, F.; SOARES, A. M. V. M.; GUILHERMINO, L. Characterization of the cholinesterases present in head tissues of the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: Application to biomonitoring. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 62, n. 3, p. 341-347, 2005.

MOUCHET, F.; GAUTHIER, L.; MAILHES, C.; JOURDAIN, M. J.; FERRIER, V.; TRIFFAULT, G.; DEVAUX, A. Biomonitoring of the genotoxic potential of aqueous extracts of soils and bottom ash resulting from municipal solid waste incineration, using the comet and micronucleus tests on amphibian (*Xenopus laevis*) larvae and bacterial assays (Mutatox® and Ames tests). **Sci. Total Environ.**, v. 355, n. 1-3, p. 232-246, 2006.

MURPHY, S. D. Pesticides. In: DOUL, J., KLASSEN, C.D., ANDERS, M. O. (Eds.) **The Basic Science of Poisons**. Macmillan, New York, pp. 519-581, 1986.

MUSUMECI, M. P.; NAKAGAWA, L. E.; LUCHINI, L. C.; MATALLO, M. B.; ANDREA, M. M. Degradação do diuron-¹⁴C em solo e em plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). **Pesq. Agrop. Bras.**, v. 30, p. 775-778, 1995.

NASCI, C.; NESTO, N.; MONTEDURO, R. A.; DA ROS, L. Field application of biochemical markers and a physiological index in the mussel, *Mytilus galloprovincialis*: transplantation and biomonitoring studies in the lagoon of Venice (NE Italy). **Mar. Environ. Res.**, v. 54, n. 3-5, p. 811-816, 2002.

NEBEKER, A. V.; SCHUYTEMA, G. S. Chronic effects of the herbicide diuron on freshwater Cladocerans, Amphipods, Midges, Minnows, Worms and Snails. **Arch. Environ. Cont. Toxicol.**, v.35, 1998.

NIEDERER, C.; BEHRA, R.; HARDER, A.; SCHWARZENBACH, R. P; ESCHER, B. I. Mechanistic approaches for evaluating the toxicity of reactive organochlorines and epoxides in green algae. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 23, p. 697-704, 2001.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 31, p. 1287-13121, 2001.

NOREÑA-BARROSO, E.; SIMÁ-ÁLVAREZ, R.; GOLD – BOUCHOT, G.; ZAPATA-PÉREZ, O. Persistent organic pollutants and histological lesions in Mayan catfish *Ariopsis assimilis* from the the Estuary of Chetumal, Mexico. **Mar. Poll. Bull.**, v. 48, p. 263- 269, 2004.

OBE, G.; PFEIFFER, P.; SAVAGE, J. R .K.; JOHANNES, C., GOEDECKE, W.; JEPPESEN, P.; NATARAJAN, A. T.; MARTÍNEZ-LOPEZ, W., FOLLE, G .A.; DRETS, M. E. Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. **Mutat. Res.**, v. 504, p. 17–36, 2002.

ODUM, E. P. **Ecologia**. Ed. Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro. 1ª Ed., 434p, 1988.

OLGUN, S.; GOGAL, R. M. Jr.; ADESHINA, F.; CHOUDHURY, H.; MISRA, H. P. Pesticide mixtures potentiate the toxicity in murine thymocytes. **Toxicol.**, v. 196, p. 181-195, 2004.

OLIVEIRA, F. R. A.; VALARINI, P. J.; POPPI, R. J. Indicadores de qualidade do solo e área de mato e cultivado com cana orgânica e convencional. **Ver. Bras. Agroecol.**, v. 2, p. 1299-1302, 2007.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; PELLETIER, É.; PFEIFFER, W. C.; ROULEAU, C. Comparative uptake, bioaccumulation, and gill damages of inorganic mercury in tropical and nordic freshwater fish. **Environ. Res.**, v. 83, p. 286-292, 2000.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; ROULEAU, C.; PELLETIER, É.; AUDET, C. E TJÄLVE, H. Distribution kinetics of dietary methylmercury in the Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). **Environ. Sci. Technol.**, v. 33, p. 902-907, 1999.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; BELGER, L.; PELLETIER, É.; ROULEAU, C. Histopathological evidence of inorganic mercury and methyl mercury toxicity in the arctic charr (*Salvelinus alpinus*). **Environ. Res.**, v. 90, p. 217-225, 2002.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; VOLLAIRE, Y.; SANCHEZ-CHARDI, A.; ROCHE, H. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. **Aquat. Toxicol.**, v. 74, p. 53-69, 2005.

ORLANDO, H. Unidades de conservação e manejo da zona de entorno. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE UNIDADES DE CONSERVAÇÃO, 1., 1997, Curitiba. **Anais do Congresso**. Curitiba: IAP, UNILIVRE, Rede Nacional Pró-Unidades de Conservação, 1997.

ORSI, M. L.; CARVALHO, E. D.; FORESTI, F. Biologia populacional de *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski (Teleostei, Characidae) do médio Rio Paranapanema, Paraná, Brasil. **Ver. Bras. Zool.**, v. 21, p. 207-218, 2004.

PADOVAN, Maria P. Implantacion de la zona de amortiguamiento en el Parque Nacional Pico Bonito, Honduras. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE UNIDADES DE CONSERVAÇÃO, 2., 2000, Campo Grande. **Anais do Congresso**. Campo Grande: Rede Nacional Pró-Unidades de Conservação; Fundação O Boticário de Proteção à Natureza, 2000.

PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v.53, n. 3, p. 331-347, 2002.

PADROS, J.; PELLETIER, E.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Metabolic interactions between low doses of benzo[a]pyrene and tributyltin in arctic charr (*Salvelinus alpinus*): a long-term in vivo study. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 192, p. 45–55, 2003.

PALMER, R. M. J.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v. 327, p. 524-526, 1987.

PASTORE, A.; GIORGIO, F.; BERTINI, E.; PIEMONTE, F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. **Clinic. Chim. Acta**, v. 333, p. 19–39, 2003.

PASTRO, M. A. **Avaliação de risco do produto rodeo (princípio ativo glifosato) para o ambiente aquático**. Universidade Federal de Viçosa. Dissertação mestrado, 1995.

PEAKALL, D. B. The use of biomarkers in hazard assessment. In: Biomarkers: A Pragmatic Basis for Remediation of Severe Pollution in eastern Europe. 1 ed. **Dordrecht: Kluwer Academic Publishers**. Parte 1, cap. 9, p.123-133, 1999.

PORTE, C.; SOLE, M.; ALBAIGES, J.; LIVINGSTONE, D. R. Responses of mixed-function oxygenase and antioxidase enzyme system of *Mytilus* sp. to organic pollution. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 100, p. 183-186, 1991.

RABITTO, I.; ALVES COSTA, J. R. M.; AKAISHI, F. M.; SILVA DE ASSIS, H. C.; PELLETIER, E.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Dietary Pb(II) and TBT (tributyltin) exposures to neotropical fish *Hoplias malabaricus*: histopatological and biochemical findings. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 60, p. 147–156, 2005.

RADTKE, R. The mummichog: a fish for all reasons. **Sea Front.**, v. 5, p. 145-149, 1979.

RAINBOW, P. S. Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 31, n. 4-12, p. 183-192, 1995.

RAND E PETROCELLI, S. R. Fundamentals of Aquatic Toxicology: Methods and applications. Washington USA, **Hemisph. Publ.**, 666p, 1985.

RANK, J.; JENSEN, K.; JESPERSEN, P. H. Monitoring DNA damage in indigenous blue mussels (*Mytilus edulis*) sampled in coastal sites from Denmark. **Mutat. Res.**, v. 585, p. 33-42, 2005.

RAO, P. S. C.; DAVIDSON, J. M. Retention and transformation of selected pesticides and phosphorus in soil-water systems: a critical review. Washington: **US-EPA**, 1982.

RAO, S. S.; NEHELI, T.; CAREY, J. H.; CAIRNS, V. W. Fish hepatic micronuclei as an indication of exposure to genotoxic environmental contaminants. **Environ. Toxicol. Water Qual.**, v. 12, p. 217–222, 1997.

REDDY, D. C.; VIJAYAKUMARI, P.; KALARANI, V.; DAVIES, R. W. Changes in Erythropoietic activity of *Sarotherodon mossambicus* exposed to sublethal concentrations of the herbicide diuron. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 49, p. 730-737, 1992.

REGOLI, F.; NIGRO, M.; BENEDETTI, M.; FATTORINI D.; GORBI, S. Antioxidant efficiency in early life stages of the antarctic silverfish, *Pleuragramma antarcticum*: Responsiveness to pro-oxidant conditions of platelet ice and chemical exposure. **Aquat. Toxicol.**, v. 75, p. 43-52, 2005.

REMEO, M.; GNASSIA-BARELLI, M. Effect of heavy metals on lipid peroxidation in the Mediterranean Clam *Ruditapes decussatus*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 118, p. 33–37, 1997.

RIBEIRO, L. R. Testes do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. **Mutag. Amb.**, Botucatu, p. 173 – 176, 2003.

ROCHE, H.; BUET, A.; RAMADE, F. Accumulation of lipophilic microcontaminants and biochemical responses in eels from the Camargue Biosphere Reserve. **Ecotoxicol.**, v. 11, p.155-164, 2002.

RODRIGUEZ-ARIZA, A.; PEINADO, J.; PUEYO, C.; LOPEZ-BAREA, J. Biochemical indicators of oxidative stress in fish from polluted littoral areas. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, v. 50, p. 2568–2573, 1993.

RODRIGUEZ-FUENTES, G.; GOLD-BOUCHOT, G. Environmental monitoring using acetylcholinesterase inhibition *in vitro*. A case study in two Mexican lagoons. **Mar. Environ. Res.**, v. 50, p. 357-360, 2000.

RODRIGUEZ, L. C.; GÓMEZ, C. A. Parque Nacional Cerro Corá: educación ambiental en su zona de influencia. In: UICN. **Espacios sin habitantes? Parques Nacionales de América del Sur**. Nueva Sociedad, 1992.

RODRIGUES, L. C. **Estudo das Glutation S-Transferases Hepáticas Solúveis do Peixe *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Pacu)**. Tese de doutorado em Bioquímica, Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes/UERJ, Brasil, 2003.

SCHEWE, T.; RAPOPORT, S. M.; KÜHN, H. Enzymology and physiology of reticulocyte lipoxygenase: comparison with other lipoxygenases. **Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.**, v. 58, p. 191–272, 1986.

SCHWAIGER, J.; WANKE, R.; ADAM, S.; PAWERT, M.; HONNEN, W.; TRIEBSKORN, R. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. **J. Aquat. Ecosyst. Stress Rec.**, v. 6, p. 75-86, 1997.

SEMA – Secretaria de Estados e Meio Ambiente e Recursos Hídricos. Citação e referências a documentos eletrônicos. Disponível em: <http://www.pr.gov.br/sema>. Acesso em: 14 de setembro de 2007.

SCHMITT, C. J.; ZAJICEK, J. L.; MAY, T. W. E COWMAN, D. F. Organochlorine residues and elemental contaminants in U.S. freshwater fish, 1976-1986: National Contaminant Biomonitoring Program. **Rev. Environ. Cont. Toxicol.**, v. 162, p. 43-104, 1999.

SEVANIAN, A.; URSINI, F. Lipid peroxidation in membranes and lowdensity lipoproteins: similarities and differences. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 29, p. 306–311, 2000.

SHUGART, L. R.; McCARTHY, J. F.; HALBROOK, R. S. Biological markers of environmental and ecological contamination: an overview. **Risk. Anal.**, v. 12, p. 353-360, 1992.

SIES, H. Oxidative stress: Introductory remarks Academic Press, London, UK. In: SIES, H. **Oxidative Stress**, London: Academic Press, p. 1-8, 1985.

SILVA, C. A. R.; RAINBOW, P. S.; SMITH, B. D.; SANTOS, Z. L. Biomonitoring of trace metal contamination in the Potengi estuary, Natal (Brazil), using the oyster *Crassostrea rhizophorae*, a local food source. **Water Res.**, v. 35, n. 17, p. 4072-4078, 2001.

SILVA, C. L. **Análise da Vulnerabilidade Ambiental aos Principais Pesticidas Recomendados para os Sistemas de Produção de Algodão, Arroz, Café, Cana-De-Açúcar, Citros, Milho e Soja.** Dissertação mestrado, Universidade Estadual de Campinas, 2004.

SILVA DE ASSIS, H. C. **Der Einsatz von Biomarkern zur summarischen Erfassung von Gewässerverschmutzungen.** Tese doutorado, Universidade Técnica de Berlim, Alemanha, 99 pp, 1998.

SILVA FILHO, M. V.; OLIVEIRA M. M.; CUNHA BASTOS, V. L. F.; ALVES, M. V. E. C.; CUNHA BASTOS, J. Validação de espécies sentinelas para a Biomarcação com Colinesterase de Peixe. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, UERJ. **Ecotoxicologia Perspectivas para o século XXI**, ed. RIMA, São Carlos, p.147-154, 2000.

SILVA, M. D. **Biomonitoramento de uma reserva particular do patrimônio natural – RPPN – através do estudo de biomarcadores em *Astyanax sp.*** Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2004.

SINDAG (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola): Defensivo Agrícola: O que é? Citação e referências a documentos eletrônicos. Disponível em: www.sindag.com.br. Acesso em: 24 julho de 2006.

SMITH, E. A.; OEHME, F. W. The biological activity of glyphosate to plants and animals: a literature review. **Vet. Hum. Toxicol.**, v. 34, n. 6, p. 531-543, 1992.

SRIDEVI, B.; REDDY, K. V.; REDDY, S. L. N. Effect of trivalent and hexavalent chromium on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in a freshwater field crab, *Barytelphusa guerini*. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 61, 384–390, 1998.

STEGEMAN, J. J.; BROUWER, M.; DI GIULIO, R. T.; FÖRLIN, L.; FOWLER, B. A.; SANDERS, B. M.; VAN VELD, P. A. Molecular responses to enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. **Environ. Res.**, p. 235-335, 1992.

STEHR, C. M.; MYERS, M. S.; JOHNSON, L. L.; SPENCER, S.; STEIN, J. E. Toxicopathic liver lesions in English sole and chemical contaminant exposure in Vancouver Harbour, Canada. **Mar. Environ. Res.**, v. 57, p. 55-74, 2003.

STENTIFORD, G. D.; LONGSHAW, M.; LYONS, B. P.; JONES, G.; GREEN, M.; FEIST, S. W. Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. **Mar. Environ. Res.**, v. 55, n. 2, p. 137-159, 2003.

STOREY, K. B. Oxidative stress: animal adaptations in nature. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 29, p. 1715-1733, 1996.

STRMAC, M.; BRAUNBECK, T. Cytological and biochemical effects of a mixture of 20 pollutants on isolated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 53, p. 293-304, 2002.

STURM, A.; SILVA DE ASSIS, H. C.; HANSEN, P. D. Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potencial use in the monitoring of neurotoxic contamination. **Mar. Environ. Res.**, v. 47, p. 1-10, 1999.

STURM, A.; WOGRAM, J.; SEGNER, H.; LIESS, M. Different sensitivity to organophosphates of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase from three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): application in biomonitoring. **Environ. Toxicol. Chem.** 19, 1607-1615, 2000.

SUZUKI, H. I.; AGOSTINHO, A. A. Reprodução de peixes do reservatório de Segredo. In: AGOSTINHO, A. A. & GOMES, L. C. **Reservatório de Segredo: bases ecológicas para manejo**. Maringá: EDUEM, p.163-182, 1997.

SVÄRDH, L. Tissue sampling from live blue mussels, *Mytilus edulis*. A field study from the Swedish west coast. **J. Sea Res.**, v. 322, p. 1-5, 2003.

TAKASHIMA, F.; HIBIYA T. **An atlas of fish histology: normal and pathological features**. New York, 1995.

TEISSEIRE, H.; VERNET, G. Is the "Diuron Effect" Due to a Herbicide Strengthening of Antioxidative Defenses of *Lemna minor*? **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 66, p.153-160, 2000.

TEJEDA-VERA, R.; LÓPEZ-LÓPEZ, R.; SEDEÑO-DÍAZ, J. E. Biomarkers and bioindicators of the health condition of *Ameca splendens* and *Goodea atripinnis* (Pisces: Goodeidae) in the Ameca River, Mexico. **Environ. Int.**, v. 33, p. 521-531, 2007.

TEW, K. D.; RONAI, ZEEV. GST function in drug and stress response. **Drug Resist. Upd.**, v. 2, p. 143–147, 1999.

THOMAS, P.; WOFFORD, H. W. Effects of cadmium and Aroclor 1254 on lipid peroxidation, glutathione peroxidase activity, and selected antioxidants in Atlantic croaker tissues. **Aquat. Toxicol.**, v. 27, p. 159–178, 1993.

TOMITA, R. Y. Toxicologia em ambientes aquáticos. **O Biológico**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 135-142, 2002.

TORTELLI, V.; COLARES, E. P.; ROBALDO, R. B.; NERY, L. E. M.; PINHO, G. L. L.; BIANCHINI, A.; MONSERRAT, J. M. Importance of cholinesterase kinetic parameters in environmental monitoring using estuarine fish. **Chemosph.** v. 65, p. 560-566, 2006.

TORRES, M. A.; TESTA, C. P.; GÁSPARI, C. Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 44, p. 923-932, 2002.

UIEDA, V. S.; BARRETO, M. G. Composição da ictiofauna de quatro trechos de diferentes ordens do rio Capivara, bacia do Tietê, Botucatu, São Paulo. **Ver. Bras. Zooc.**, v. 1. p. 55-67, 1999.

VAN DER OOST, R.; OPPERHUIZEN, A.; SATUMALAY, K.; HEIDA, H.; VERMEULEN, N. P. E. Biomonitoring aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*) I. Bioaccumulation: biota-sediment ratios of PCBs, OCPs, PCDDs and PCDFs. **Aquat. Toxicol.**, v. 35, p. 21-46, 1996.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment. **Envir. Toxicol. Pharmacol.**, v. 13, p. 57-149, 2003.

VAN LEYEN, K.; DUVOISIN, R. M.; ENGELHARDT, H.; WIEDMANN, M. A. Function for lipoxygenase in programmed organelle degradation. **Nature**, v. 395, p. 392–395 1998.

VASSUER, P.; COSSU-LEGUILLE, C. Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. **Environ. Int.**, v. 28, p. 711–717, 2003.

VENTURA, E. C.; GAELZER, L. R.; ZANETTE, J.; MARQUES, M. R. F.; BAINY, A. C. D. Biochemical indicators of contaminant exposure in spotted pigfish (*Orthopristis ruber*) caught at three estuaries of Rio de Janeiro coast. **Mar. Environ. Res.**, v. 54, p. 775-779, 2002.

WALKER, C. M.; HOPKIN, S. P.; SIBLY, R. M.; PEAKALL, D. B. **Principles of Ecotoxicology**. Bristol, PA: Taylor e Francis, 1996.

WATANABE, R.; COLER, A.; PAZ, R. J. The implementation of a regional biomonitoring program in northeast Brazil. **Aquat. Ecosyst. Health Manag.**, v. 2, p. 187-189, 1999.

WESTER, P. W.; CANTON, J. H. The usefulness of histopathology in aquatic toxicity studies. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 100, p.115-117, 1991.

WESTER, P. W.; VAN DER VEN, L. T. M.; VETHAAK, A. D.; GRINWIS, G. C. M.; VOS, J. G. Aquatic toxicology: opportunities for enhancement through histopathology. **Environmental Toxicol. Pharmacol.**, v. 11, p. 289-295, 2002.

WILHELM FILHO, D.; TORRES, M. A.; TRIBESS, T. B.; PEDROSA, R. C.; SOARES, C. H. L. Influence of season and pollution on the antioxidant defenses of the cichlid fish acar (*Geophagus brasiliensis*). Brazil. **J. Med. Biol. Res.**, v. 34, p. 719-726, 2001.

WHO (World Health Organization). **Environmental health criteria**. Glyphosate. 177p, 1994.

XIA, C; HU, J.; KETTERER, B.; TAYLOR, J. B. The organization of the human GSTP 1-1 gene promoter and its response to retinoic acid and cellular redox status. **Biochem. J.**, v. 313, p. 155-61, 1996.

ZANETTE, J.; MONSERRAT, J. M.; BIANCHINI, A. Biochemical biomarkers in gills of mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* from three Brazilian estuaries. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 143, p. 187-195, 2006.