



Universidade Federal de Goiás
Pró-Reitora de Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal
Laboratório de Genética e Mutagênese

O ensaio cometa e a espécie *Hypsiboas albopunctatus* (Spix, 1824) como ferramentas de avaliação de qualidade ambiental em uma unidade de conservação federal inserida no Cerrado goiano

Tiago Quaggio Vieira

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade Animal.

Goiânia-GO

Janeiro, 2017



TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

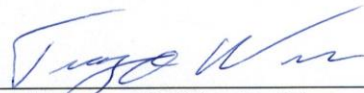
Nome completo do autor: Tiago Quaggio Vieira

Título do trabalho: O ensaio cometa e a espécie *Hypsiboas albopunctatus* (Spix, 1824) como ferramentas de avaliação de qualidade ambiental em uma unidade de conservação federal inserida no Cerrado goiano

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.



Assinatura do (a) autor (a)

Data: 01 / 05 / 2017

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Universidade Federal de Goiás
Pró-Reitora de Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal
Laboratório de Genética e Mutagênese

O ensaio cometa e a espécie *Hypsiboas albopunctatus* como ferramentas de avaliação de qualidade ambiental em uma unidade de conservação federal inserida no Cerrado goiano

Tiago Quaggio Vieira
Orientadora: Profa. Dra. Daniela de Melo e Silva
Co-orientador: Prof. Dr. Alessandro Ribeiro de Moraes

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade Animal.

Goiânia-GO
Janeiro, 2017



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS - UFG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE ANIMAL

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Nº 15

Aos trinta e um dias do mês de março de dois mil e dezessete (31/03/2017), às quatorze horas (14h), no Auditório do ICB V, reuniram-se os componentes da banca examinadora: **Profa. Dra. Daniela de Melo e Silva, ICB/UFG; Prof. Dr. Cláudio Carlos da Silva, PUC-GO; Prof. Dr. Natan Medeiros Maciel, ICB/UFG**; para, em sessão pública presidida pelo(a) primeiro(a) examinador(a) citado(a), procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: **“O ensaio cometa e a espécie *Hypsiboas albopunctatus* como ferramentas de avaliação de qualidade ambiental em uma unidade de conservação federal inserida no Cerrado goiano”**, em nível de mestrado, área de concentração em Biodiversidade Animal, de autoria de **Tiago Quaggio Vieira**, discente do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo presidente, que fez a apresentação formal dos membros da banca. A palavra, a seguir, foi concedida à(o) autor(a) da dissertação que, em cerca de 50 minutos, procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu à(o) examinada(o), tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da dissertação. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº 1239 de 14 de fevereiro de 2014, do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação Biodiversidade Animal, a dissertação foi aprovada, considerando-se integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de Mestre em Biodiversidade Animal pela Universidade Federal de Goiás. A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega da versão definitiva da dissertação na secretaria do

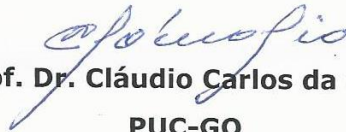
programa, com as devidas correções sugeridas pela banca examinadora, no prazo de trinta dias a contar da data da defesa. Cumpridas as formalidades de pauta, às 17 h e 0 min., encerrou-se a sessão de defesa e, para constar, eu, Suely Ana Ribeiro, secretária executiva da Universidade Federal de Goiás - UFG, lavrei a presente ata que, após lida e aprovada, será assinada pelos membros da banca examinadora em três vias de igual teor.



Profa. Dra. Daniela de Melo e Silva

Presidente da Banca

ICB/UFG



Prof. Dr. Cláudio Carlos da Silva

PUC-GO



Prof. Dr. Natan Medeiros Maciel

ICB/UFG

*Este trabalho é dedicado a meus pais, que desde a
minha infância sempre se desdoblaram para me
oferecer uma boa educação, anseio
pelo dia em que todos nesse país tenham
acesso a uma educação de qualidade.*

AGRADECIMENTOS

A DEUS, primeiramente, por me permitir estar aqui, com saúde física e mental, possibilitando a realização desse trabalho.

Aos meus pais, Celso Roberto Serrano Vieira e Eny Merli Quaggio Vieira, pela dedicação, amor e apoio ao longo de minha formação.

A toda minha família, pela convivência e amor a mim dispensado.

À minha orientadora Prof^{ra}. Dr^a. Daniela de Melo e Silva, pela orientação, apoio, conselhos, correções, e companheirismo desde antes mesmo da aprovação no PPGBAN.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Alessandro Ribeiro de Moraes, pelo apoio, cordialidade, paciência e preciosas explicações ao longo do processo de construção da dissertação.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal da Universidade Federal de Goiás pelo conhecimento compartilhado durante as disciplinas ofertadas e pela dedicação e atenção dispensada a todos os alunos.

Aos colegas do Programa de Pós Graduação em Conservação da Biodiversidade Animal (PPGBAN): Henrique, Sheila, Alejandro, Jeremiah, Mariana, Tainã, Carol e Zander, pela troca de apoio, conhecimento, convívio e amizade.

A todos que tive a oportunidade de conhecer através do Laboratório de Genética e Mutagênese - LabMut, pelo apoio na realização dos cometas, pela acolhida, pelos momentos de convivência cordial e aprendizado: Juliana Avelar, Kháttylla Assunção, Pedro Almeida, Jomal Filho, Thais Pires, Wanessa Carvalho, Fernanda Franco, Dornelles Assunção, Daiany Folador Sotero, Alessandro Arruda Alves e Macks Wendhell.

A equipe do RAN, Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Répteis e Anfíbios: Vera, Yeda, Augusto, Isaías, Rafael Valadão, Rafael Balestra, Ana Paula, Walter, Hugo, Ivan, Cíntia, Nilza, Elioenai, Sidney, Vivian, Carlos Abrahão, Geraldo, Sonia, Glaura, Deusdede, Maria Félix, Marcos Coutinho, Luís Alfredo pelo apoio e reconhecimento da importância do trabalho para o centro e, em especial, à Flávia Regina de Queiroz Batista, pelo apoio em campo, orientação informal e amizade antiga.

Ao ICMBio pelo apoio institucional e por me autorizar a trabalhar em horário especial e dessa forma viabilizar minhas aulas.

Ao Analista Ambiental do IBAMA/GO, José Augusto Motta, pela ajuda com informações técnicas a respeito de agrotóxicos.

Aos Analistas Ambientais da Coordenação Geral de Substâncias Químicas, em especial Régis de Paula Oliveira, vinculada a Diretoria de Qualidade Ambiental CGASQ/DIQUA do IBAMA, pelo apoio nas simulações de deriva, realizadas por meio do software AgDRIFT.

A André de Oliveira, Maurivan Vaz Ribeiro, Vinícius Guerra e Kennedy Borges pelo valioso apoio em campo e pela amizade.

Ao chefe do Parque Nacional das Emas, Marcos Cunha, e demais integrantes da equipe

gestora da UC, pelo auxílio logístico.

Ao professor Doutor João Paulo Rodrigues da Cunha, da Universidade Federal de Uberlândia, especialista em aplicação de produtos fitossanitários, pelo auxílio e esclarecimentos referentes ao fenômeno da deriva.

À Universidade Federal de Goiás e ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal por criar uma oportunidade de aperfeiçoamento profissional de alto nível com um corpo docente altamente qualificado.

À FAPEG, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás, por conceder a Bolsa de Estudos que viabilizou essa pesquisa.

Não é a Terra que é frágil. Nós é que somos frágeis. A natureza tem resistido a catástrofes muito piores do que as que produzimos. Nada do que fazemos destruirá a natureza. Mas podemos facilmente nos destruir. ”

James Lovelock

SUMÁRIO

Resumo	15
Abstract	17
Lista de figuras	19
Lista de tabelas	20
Lista de abreviaturas e siglas	21
1.Introdução	23
2.Referencial Teórico	29
3.Objetivos	34
4.Material e métodos	35
4.1.Área de estudo	35
4.2.Espécie do estudo, ambiente e método de coleta	36
4.3. Dados físico-químicos	41
4.4. Ensaio Cometa	41
4.5. Imagens Orbitais	43
4.6 Simulação de Deriva	43
4.7. Análise Estatística	44
5. Resultados	46
6. Discussão	51
7. Conclusões	60
Bibliografia	62

RESUMO

A região Sudoeste do estado de Goiás, originalmente coberta pelo Cerrado, é hoje caracterizada pela presença de grandes propriedades rurais produtoras de algodão, soja e milho. As monoculturas, em especial as de grãos, causam sérios impactos ao meio ambiente: empobrecimento e dano genômico, erosão do solo, contaminação por agrotóxicos, compactação do solo, queimadas e desmatamento. O último grande remanescente de vegetação nativa de Cerrado na região está protegido pelo Parque Nacional das Emas, que possui uma área de 132 mil hectares. A proposta deste estudo é avaliar o dano no DNA em girinos de *Hypsiboas albopunctatus* submetidos a diferentes níveis de exposição às pressões antrópicas do sistema de produção agrícola predominante na região. Tal avaliação foi realizada por meio de ensaio cometa, a partir de amostras sanguíneas obtidas desses girinos, coletados no Parque Nacional das Emas e entorno, tais coletas foram feitas ao longo do primeiro trimestre de 2016. Essa espécie de anuro possui ampla distribuição geográfica e é considerada abundante, características importantes para eleger um organismo como bioindicador de qualidade ambiental. As amostras foram coletadas em ambiente de veredas, com solo encharcado e presença de poças temporárias e permanentes. A amostragem foi dividida em dois tipos de ambiente: a) dentro do Parque Nacional, onde os impactos antrópicos são significativamente menores, não havendo pulverização direta de agrotóxicos ou qualquer tipo de alteração física da paisagem natural, e, b) fora dos limites da unidade de conservação, onde a vegetação nativa foi quase totalmente suprimida e a exposição direta a agrotóxicos é frequente. Dessa forma foi comparado o DNA dos girinos por meio de ensaio cometa, para verificar se no ambiente protegido do Parque Nacional das Emas o dano no material genético difere significativamente em relação ao ambiente antropizado, externo à Unidade de Conservação. Após a realização das análises foi possível constatar que o dano encontrado no DNA de girinos da espécie *Hypsiboas albopunctatus* foi maior nas amostras

provenientes de áreas externas ao parque, intermediário nas áreas internas mais próximas da borda do Parque Nacional das Emas e reduzidos nas áreas centrais e mais próximas do centroide, corroborando a hipótese de que os impactos ambientais, que são severos fora dos limites da UC, teriam um efeito danoso para a biodiversidade, inclusive a nível molecular.

Palavras-chave: Genotoxicidade, Girinos, Parque Nacional das Emas, Bioindicador.

ABSTRACT

The Southwest region of the state of Goiás, originally covered by the Cerrado, is now characterized by the presence of large rural properties producing cotton, soybeans and corn. Monocultures, especially grains, cause serious impacts to the environment: impoverishment and genomic damage, soil erosion, pesticide contamination, soil compaction, burning and deforestation. The last large remnant of Cerrado native vegetation in the region is protected by the Emas National Park, which covers an area of 132,000 hectares. The purpose of this work is to evaluate DNA damage in tadpoles of *Hypsiboas albopunctatus* submitted to different levels of exposure to anthropic pressures of the predominant agricultural production system in the region. This evaluation was performed by means of a comet assay, from blood samples obtained from these tadpoles, collected in the Emas National Park and surroundings, such collections were made during the first quarter of 2016. This anuran species has a wide geographic distribution and is considered abundant, important characteristics to elect an organism as an environmental quality bioindicator. The samples were collected in the surroundings of paths, with soaked soil and presence of temporary and permanent pools. The sampling was divided in two types of environment: a) within the National Park, where the anthropic impacts are significantly smaller, there is no direct spray of pesticides or any kind of physical alteration of the natural landscape, and b) outside the limits of the unit where native vegetation has been almost completely suppressed and direct exposure to agrochemicals is frequent. In this way, the tadpoles DNA was compared by means of a comet assay to verify that in the protected environment of the Emas National Park the damage to the genetic material differs significantly in relation to the anthropic environment, external to the Conservation Unit. After the analysis, it was possible to verify that the damage found in the DNA of tadpoles of the species *Hypsiboas albopunctatus* was higher in the samples from

areas outside the park, intermediate in the internal areas closer to the edge of the Emas National Park and reduced in the central areas and closer to the centroid, corroborating the hypothesis that environmental impacts, which are severe outside the protected area boundaries, would have a detrimental effect on biodiversity, including at the molecular level.

Key words: Genotoxicity, Tadpoles, Emas National Park, Bioindicator.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Expansão da fronteira agrícola no Cerrado e, mais especificamente, no estado de Goiás	25
Figura 02 - Mapa do Parque Nacional das Emas, situado no Sudoeste Goiano	35
Figura 03 - Espécime de <i>H. albopunctatus</i> vocalizando	36
Figura 04 : Distribuição geográfica de <i>H. albopunctatus</i>	37
Figura 05 - Girino de <i>H. albopunctatus</i>	37
Figura 06 - Imagem de satélite do Parque Nacional das Emas contendo o centróide da unidade (AMARELO) e as áreas escolhidas para as coletas, sendo quatro no interior do Parque (VERDE), menos suscetíveis, portanto, a contaminação por agrotóxicos e quatro mais expostas à contaminação (VERMELHO)	39
Figura 07 - Coleta em poças típicas de ambiente de Veredas, com solo encharcado em função de afloramento de lençol freático, no Parque Nacional das Emas	40
Figura 08 - Poça típica de ambiente de Veredas, onde os espécimes foram coletados, dentro e fora dos limites do Parque Nacional das Emas	41
Figura 09 - Captura de célula cometa de <i>H. albopunctatus</i> em microscópio de epifluorescência no laboratório de radiobiologia e mutagênese da UFG	42
Figura 10 – Eixo 2 da PCA sendo positivamente correlacionado com o percentual de DNA na cauda	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Coordenadas geográficas dos pontos de coletas, em graus decimais	39
Tabela 02 - Médias das variáveis CC, MCO e %DNA encontradas nos espécimes coletados e a distância dos pontos de coleta ao centróide do PARNA Emas	46
Tabela 03 - Descrição da PCA	47
Tabela 04 - Parâmetros da Regressão Linear Simples	48
Tabela 05 - Médias e Desvio Padrão obtidos de dados físico-químicos da água, a partir da sonda modelo YSI 6600	50

LISTA DE SIGLAS

ACP – Análise de Componentes Principais

APP – Área de Preservação Permanente

AMPA – Ácido Aminometilfosfônico

ARA – Ponto de coleta do rio Araguaia

BUR – Ponto de coleta do buriti torto

CAB – Ponto de coleta do Cabeceirão

CC – Comprimento da cauda

CONAMA – Conselho Nacional de Meio Ambiente

%DNA – Porcentagem de DNA na cauda

DL50 – Dose Letal para 50% da população

DNA – *Desoxyribonucleic acid* (Ácido Desoxirribonucleico)

EPA – Agencia de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

EC – Ensaio Cometa

FOR – Ponto de coleta da trilha do Formoso

FRI – Ponto de coleta da fazenda do Sr. Frias

GLO – Ponto de coleta do Glória

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICMBio – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

IMI – Imidacloprid

IUCN – União Internacional para Conservação da Natureza (Sigla original em inglês)

MCO – Momento da cauda de Olive

MMA – Ministério do Meio Ambiente

MS – Ministério da Saúde

ODE – Ponto de coleta da fazenda do Sr. Odeílson

PARNA – Parque Nacional

PCA – Principal Component Analysis

pH – Potencial hidrogeniônico

PNE – Parque Nacional das Emas

SUC – Ponto de coleta do rio Sucuriú

UC – Unidade de Conservação

UFG – Universidade Federal de Goiás

UNESCO – Organização das Nações Unidas para Educação, Ciência e Cultura

1. INTRODUÇÃO

O Cerrado é um dos maiores biomas da América do Sul, ocupando aproximadamente 2.000.000 km², o que representa mais de 20% da área total do Brasil. Os estados abrangidos pelo Cerrado são Goiás, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Bahia, Maranhão, Piauí, Rondônia, Paraná, São Paulo e Distrito Federal, além dos enclaves no Amapá, Roraima e Amazonas. O bioma é conhecido como “berço das águas” do Brasil, pois abriga as nascentes das maiores bacias hidrográficas da América do Sul, que são as bacias Amazônica, Tocantins-Araguaia, São Francisco e Prata (MMA, 2015). Classificado como *hotspot* mundial, o Cerrado apresenta-se como a mais rica savana do planeta, em termos de biodiversidade, abrigando 11.627 espécies de plantas nativas já catalogadas, além de possuir um grande número de endemismos, explicado por uma grande diversidade de ambientes (MMA, 2015). Cerca de 200 espécies de mamíferos e 800 espécies de aves são conhecidas para o bioma. A diversidade de peixes, répteis e anfíbios também é considerada elevada e o endemismo é bastante alto para anfíbios e répteis: 50% e 17%, respectivamente. Algumas estimativas também consideram que o bioma abriga 13% das borboletas conhecidas para os trópicos, além de 35% das abelhas e 23% dos cupins (MMA, 2015).

Nos últimos 35 anos, mais da metade do Cerrado foi convertida em áreas antrópicas, e esse território é disputado por latifundiários, grileiros, pequenos produtores e povos indígenas. Essa situação política e econômica desordenada acaba favorecendo a degradação ambiental, prejudicando a conservação desse bioma e a produção agrícola no longo prazo (ANACLETO & MIZIARA, 2006). A atual situação social, econômica e ambiental encontrada no território onde outrora havia apenas o bioma Cerrado é resultado de um processo que vem sendo construído ao longo das últimas décadas e transformou a terra em mercadoria, provocando a expulsão de comunidades tradicionais (índios e populações

extrativistas), seguida da instalação de latifúndios voltados para a produção agropecuária intensiva (ANACLETO & MIZIARA, 2006).

O sudoeste goiano teve um desenvolvimento diferenciado das demais regiões de Goiás, por ser uma área agropecuária de ocupação bastante antiga e próxima dos estados de Minas Gerais e São Paulo. A principal atividade econômica na região era a criação de gado, porém, a partir da década de 1960, a região passou por uma nova fase de desenvolvimento agrícola, passando por um processo de modernização da agricultura e intervenção do Estado por meio de políticas desenvolvimentistas (PEDROSO, 2005). Essa rápida transformação realizou-se por meio da incorporação espacial associada à rápida modernização da agricultura, baseando-se em um modelo caracterizado pela presença quase que exclusiva dos cultivos comerciais, com aplicação de insumos e mecanização, sem a devida consideração dos aspectos sociais e ambientais locais (PEDROSO, 2005).

O modelo agroindustrial trouxe a necessidade de elevada capitalização para o investimento inicial, o que acaba por excluir os pequenos produtores, e promove a expansão da agricultura a nível empresarial (Figura 1) com utilização intensiva de agrotóxicos e enorme mecanização do campo, promovendo grande êxodo rural. As monoculturas de grãos, predominantes no bioma Cerrado, causam elevados impactos ambientais: erosão genética, degradação do solo, contaminação por agrotóxicos, compactação do solo, incêndios florestais e desmatamento (PEDROSO, 2005). Os agrotóxicos são lixiviados, em função do solo exposto, característico das grandes monoculturas anuais, sendo escoados para os rios, lagos e lençóis freáticos, acabando por contaminá-los e por alterar os ecossistemas. Os agrotóxicos mais nocivos são aqueles de potencial mais duradouro, sendo os responsáveis pelos maiores danos, é o caso dos organoclorados (DE PAULA, 1998).

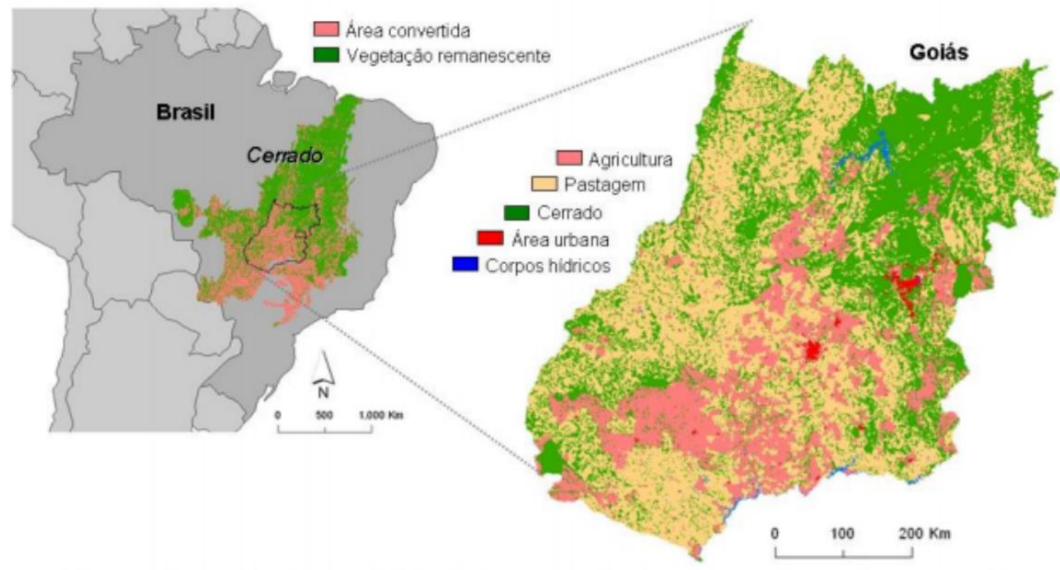


Figura 1 – Expansão da fronteira agrícola no Cerrado e, mais especificamente, no estado de Goiás (Imagem extraída de PEDROSO, 2005).

O Parque Nacional das Emas é um importante remanescente de Cerrado no Brasil, tendo a sua importância reconhecida regional e nacionalmente, por ser a última mancha contínua do bioma no sudoeste goiano, também é reconhecido internacionalmente, tendo obtido o título de Patrimônio Natural da Humanidade, concedido pela UNESCO. A Unidade de Conservação apresenta as diversas fitofisionomias típicas do bioma, como os campos limpos, campos sujos, veredas e matas ciliares. Nessa paisagem é possível observar com certa facilidade animais silvestres, muitos dos quais ameaçados, como tamanduá-bandeira, cachorro-do-mato, ema, anta, cervídeos e canídeos, protegidos pelos seus 132.000 hectares (ICMBio, 2015). O Parque está inserido na Serra dos Caiapós e apresenta uma topografia plana com presença de chapadões, chegando a ter uma elevação de até 800 metros de altitude. A hidrografia é formada pelos rios Jacuba e Formoso, que se unem mais adiante formando o Correntes, um afluente do Paranaíba, que por sua vez integra a Bacia do Prata (IBAMA, 2004). Na maior parte do Parque predominam relevos planos e não existem processos erosivos. Em áreas de declividade acentuada, entretanto, é possível verificar ravinas e áreas de deposição de sedimentos (IBAMA, 2004). A região passa por uma estação seca de maio a

setembro e uma estação chuvosa de outubro a abril, a temperatura média anual varia entre 22° C e 24° C e a precipitação anual varia de 1.500 a 1.700 mm, estando concentrada de outubro a março. Na estação seca a precipitação é inferior a 60 mm (RAMOS-NETO & PIVELLO 2000).

Os animais aquáticos são expostos aos agrotóxicos através da ingestão de alimentos contaminados, pela pele e por meio da respiração, absorvendo esses produtos químicos pelas brânquias (NAKAGOME et al., 2006). Anfíbios anuros são conhecidos por apresentar baixa mobilidade e um ciclo de vida bimodal, com dependência de ambientes terrestres e aquáticos, tais características os tornam excelentes bioindicadores de qualidade ambiental (GONÇALVES et al, 2014). Anfíbios são especialmente suscetíveis à contaminação ambiental devido à sua dependência do ambiente aquático para reprodução, e pelo fato de apresentarem respiração cutânea. São considerados um grupo bioindicador, e o monitoramento da contaminação de espécies deste grupo pode ajudar a esclarecer como a utilização de agrotóxicos está influenciando no ambiente aquático e na fauna de vertebrados.

Declínios significativos nas populações de anfíbios do planeta foram detectados nos últimos 30 anos (GONÇALVES et al 2014). São fatores que vem provocando tal declínio a destruição de habitat natural, fragmentação e alteração de ecossistemas (FISHER & SHAFFER 1996; DAVIDSON et al. 2001; MARSH & TRENHAM 2001), introdução de espécies exóticas (VREDENBURG 2004; KATS & FERRER 2003), sobre-exploração de recursos (LANNON et al 1994), contaminantes químicos e aumento de radiação UV-B (HAYES et al 2006; BLAUSTEIN et al 2003). Cerca de 50% das 204 espécies de anfíbios anuros que ocorrem no Cerrado são endêmicas e a região neotropical como um todo apresenta a maior diversidade de anfíbios anuros do mundo (VALDUJO et al 2012). As espécies de anuros que ocorrem no Neotrópico podem ser divididas em dois grandes grupos ecológicos: um grande grupo de espécies restritas a florestas úmidas e um grupo menor de espécies típicas

de formações abertas, que ocorrem nos domínios fitogeográficos do Cerrado, do Chaco e da Caatinga, além de áreas de vegetação aberta dos demais domínios (HEYER, 1988). O Parque Nacional das Emas abriga 27 espécies de anfíbios, sendo 26 anuros. A maioria das espécies registradas no PNE está associada a ambientes abertos, principalmente campos úmidos e veredas. Os locais de maior densidade são os campos úmidos e bordas de mata de solo encharcado, nas proximidades de rios e córregos (IBAMA, 2004). A espécie *Hypsiboas albopunctatus* foi registrada na unidade de conservação (KOPP et al, 2010) e está entre as mais abundantes no Brasil, sendo amplamente distribuídas e encontradas em todo o Cerrado, além de Mata Atlântica, Pantanal e sul da Amazônia, tendo sido escolhida para o presente estudo em função dessas características, pois as mesmas facilitam o processo de investigação do impacto que as ações antrópicas podem estar causando em toda a comunidade de anuros.

O Ensaio Cometa (EC), “*Single Cell Gel Electro phoresis*”, é a técnica que foi adotada para as análises laboratoriais, trata-se de uma técnica rápida e eficiente quando usada para quantificar lesões e detectar os efeitos do reparo no DNA em células individualizadas. Essa metodologia apresenta algumas vantagens sobre os testes bioquímicos e citogenéticos, entre as quais a utilização de um pequeno número de células que não necessariamente estejam em divisão. As células, englobadas em gel de agarose e espalhadas sobre uma lâmina, são submetidas a uma corrente elétrica que age como uma força proporcionando a migração dos segmentos de DNA livres, resultantes de quebras, para fora do núcleo. Após a eletroforese, as células que apresentam um núcleo redondo são identificadas como células sem danos detectáveis no DNA. Por outro lado, as células lesadas são identificadas visualmente por uma espécie de cauda, similar a um cometa, formada pelos fragmentos de DNA. Estes fragmentos podem se apresentar em diferentes tamanhos, e ainda estar associados ao núcleo por uma cadeia simples. Para alguns autores, o tamanho da cauda é proporcional à dimensão do dano que foi causado, mas é de consenso que a simples visualização do cometa já significa que

danos estão presentes no DNA, podendo ser quebras de fita simples, duplas, *crosslinks*, sítios de reparo por excisão e/ou lesões álcali-lábeis (DA SILVA, 2007). FRENZILLI et al (2009) consideram que o ensaio cometa possui elevado potencial na avaliação de impacto ambiental de substâncias genotóxicas em ecossistemas aquáticos, conclusão a que chegaram após 5 anos de estudos *in vivo* e *in vitro* envolvendo invertebrados e vertebrados aquáticos expostos a glifosato e outros agrotóxicos. Neste contexto, a hipótese defendida neste estudo foi que o nível de danos a serem encontrados por meio do ensaio cometa (EC) seria menor nos espécimes coletados na região central do Parque Nacional das Emas (Centróide), aumentando gradativamente conforme os pontos de coleta se aproximassem de suas bordas, apresentando maiores danos fora dos limites da UC.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

O Brasil abriga a maior diversidade de anfíbios do planeta, com 1080 espécies descritas, muitas das quais são endêmicas e esses números tendem a aumentar em função de frequentes novas descrições (SBH, 2016). O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, abrigando um grande número de espécies de anfíbios, muitas delas são endêmicas da savana brasileira (TOLEDO et al, 2007). Os anfíbios são considerados bons indicadores de qualidade ambiental pelo fato de serem mais vulneráveis a modificações no meio ambiente, isso provavelmente ocorre em função de sua pele permeável, que permite a passagem de elementos presentes no ambiente onde se encontram (WELLS, 2007). GIBBONS et al (2002) apontam que anfíbios estão vulneráveis a ameaças antrópicas globais, dentre elas a perda de hábitat e a poluição por resíduos da atividade agrícola. De acordo com FROST (2016), a família Hylidae engloba 693 espécies descritas, estando agrupadas nas subfamílias Pelodyadinae, Phyllomedusinae e Hylinae. A IUCN (2016) informa que a espécie *Hypsiboas albopunctatus* (SPIX, 1824) ocorre nas regiões central, sul e sudeste do Brasil, além de estar presente em países vizinhos como Argentina, Bolívia, Paraguai e Uruguai. A espécie é arborícola, e possui hábitos noturnos, sendo encontrada em brejos, matas de galeria e veredas, apresenta atividade reprodutiva ao longo de todo o ano e possui pouca plasticidade fenotípica (UETANABARO et al, 2008).

BERNARDE & MACEDO (2014) observaram que a conversão de áreas naturais em antrópicas pode provocar diminuição de locais de reprodução, redução na disponibilidade de alimento, perda de áreas de abrigo, compactação do solo, alterações microclimáticas e aumento da abundância de espécies de áreas mais abertas. Tais fatores acabam criando condições desfavoráveis para a sobrevivência de algumas espécies e, como consequência,

podem gerar maior estresse, podendo estar este relacionado a uma maior incidência de danos genéticos.

Segundo TEVINI (1993), a radiação UV-B é a que causa maiores danos a organismos na superfície terrestre. Essa radiação é capaz de reduzir taxas de crescimento, provocar disfunções no sistema imunológico e causar danos subletais a nível molecular. A radiação UV-B pode provocar mutações e morte celular, porém existem evidências sugerindo que a radiação UV-A também pode ser danosa, especialmente quando combinada a outros fatores de estresse (BLAUSTEIN et al 2003). Para COCKELL (2001) a radiação UV tem sido, do ponto de vista evolutivo, um importante fator causador de estresse em organismos vivos. BLAUSTEIN et al (1998) afirmam ainda que a radiação do tipo UV-B é capaz de matar anfíbios diretamente, além de causar danos moleculares subletais, de forma isolada ou associada a contaminantes ambientais. Os efeitos da radiação UV-B também podem variar em razão de fatores diversos, como exemplos é possível mencionar variações interespecíficas ou intraespecíficas, condições climáticas, contaminantes na água e a geografia (BLAUSTEIN & KIESECKER, 2002). ASSIS (2012) relata que as mudanças climáticas associadas a outros impactos antrópicos, como é o caso do desmatamento, podem estar causando alterações microclimáticas nos habitats de anfíbios. Existe um crescente número de casos de epidemias em anfíbios se alastrando pelo planeta, provavelmente tais epidemias estão associadas a essas modificações ambientais, as quais podem estar fragilizando o sistema de reparo desses animais.

De acordo com YADAV et al (2013), o glifosato, considerado um herbicida emergente, vem se tornando um dos pilares da agricultura moderna e não é considerado danoso para animais, tendo sido extensivamente pesquisado o seu efeito sobre espécies de anfíbios na América do Norte e Austrália. Entretanto, segundo os autores, o impacto do glifosato sobre organismos não-alvo tem sido muitas vezes motivo de preocupação e intensos

debates, principalmente no que tange a anfíbios, permanecendo a controvérsia em relação aos seus possíveis efeitos genotóxicos. Na investigação proposta por YADAV (2013) foram examinados, por meio do teste dos micronúcleos, os efeitos genotóxicos do glifosato nos girinos da espécie *Euflyctis cyanophlyctis*, um anuro encontrada na Índia, os espécimes foram submetidos a diferentes concentrações de glifosato. Os resultados obtidos mostraram que concentrações mais baixas do glifosato podem induzir a formação dos micronúcleos nos eritrócitos dos girinos, tal descoberta aponta que, dependendo da concentração, o Roundup (nome comercial do glifosato) tem potencial genotóxico em *E. cyanophlyctis* e isso poderia ter consequências para o fitness da espécie a longo prazo. MEZA-JOYA et al (2013) afirmam que a utilização de pulverização aérea de formulações de glifosato costuma ser utilizada na Colômbia, com o objetivo de combater cultivos ilegais. Os autores avaliaram o impacto dessa prática sobre uma espécie de anuro, o *Eleutherodactylus johnstonei*, trata-se de uma espécie de desenvolvimento direto, ou seja, não passa por fase larval. Os resultados indicaram que a concentração de 37.4 mg de ácido equivalente a.e./cm² (a mesma utilizada nas pulverizações aéreas) não é letal em indivíduos adultos, porém espécimes juvenis são altamente vulneráveis a tal concentração. O estudo demonstrou ainda que concentrações acima de 5,4 mg a.e./cm² (in vivo) e concentrações acima de 95 mg a.e./mL (in vitro) possuem clara evidencia de citotoxicidade. As exposições in vivo e in vitro de eritrócitos de *E. Johnstonei* ao glifosato induziram a quebras das moléculas de DNA sempre dependente da dose aplicada, com valores estatisticamente significativos ($p < 0.05$), apontando para a existência de risco ecotoxicológico para as comunidades de anfíbios.

POLETTA et al (2009) avaliaram o potencial genotóxico do glifosato (Roundup) em eritrócitos de jacaré de papo amarelo (*Caiman latirostris*) após exposição in ovo. Os embriões da jacarés foram expostos a diferentes concentrações de glifosato e amostras de sangue foram obtidas no momento que os animais romperam os ovos. Tais amostras foram submetidas ao

ensaio cometa (EC) e teste de Micronúcleos, os pesquisadores observaram um incremento significativo ($p < 0.05$) de danos moleculares em uma das concentrações a que os espécimes foram expostos, resultado este observado nos dois tipos de testes utilizados, o que corrobora a importância do ensaio cometa e do teste de Micronúcleos na avaliação do efeito genotóxico de agrotóxicos em organismos aquáticos.

Para RELYEA (2004), o declínio global dos anfíbios despertou o interesse para a influência dos agrotóxicos nesse processo. O pesquisador avaliou o efeito de quatro diferentes agrotóxicos (diazinon, carbaryl, malation e glifosato) e suas combinações sobre a sobrevivência e desenvolvimento de girinos de 5 espécies de anuros (*Rana pipiens*, *Rana clamitans*, *Rana catesbeiana*, *Bufo americanus* e *Hyla versicolor*). A pesquisa demonstrou que esses agrotóxicos, tanto isolados quanto combinados entre si, provocam aumento de mortalidade e redução das taxas de crescimento nas espécies estudadas.

Segundo PÉREZ-IGLESIAS et al (2014) o inseticida sistêmico imidacloprid (IMI), utilizado em lavouras, age afetando o sistema nervoso central dos insetos, sendo efetivo no contro das populações de espécies que atacam monoculturas. Na pesquisa desses autores foi investigado o efeito genotóxico do IMI, em uma versão comercial denominada “Glacoxan Imida”, sobre girinos da espécie *Hypsiboas pulchellus* (Anura: Hylidae) por meio de exposição in vitro. O DL 50 em 96 horas de exposição encontrado foi de 56.622 mg/L, tendo sido observado um incremento na frequência de micronúcleos (MN) já na dose de 25.0 mg/L nesse mesmo tempo de exposição. Também foi observado danos moleculares no DNA da espécie em tempo de exposição de 48h e concentração de 37.5 mg/L. Tais fatos demonstram que o IMI possui efeito genotóxico sobre anfíbios.

De acordo com CUNHA (2008a), as maiores distâncias percorridas por agrotóxicos em experimento simulado foram de 40 metros, com pulverização realizada a 0,8 metro do

solo e vento de 5m/s. Porém, no entorno do Parque Nacional das Emas, a pulverização é feita por aeronaves, a uma distância do solo bem superior a testada pelo autor, chegando a 5 metros de altura, com ventos também de velocidades superiores, de até 9 m/s segundo o INMET (2011). CUNHA (2008b), informa também que o tamanho das gotas pulverizadas, a intensidade do vento e a distância do bico pulverizador em relação ao solo são os fatores determinantes do impacto da deriva, sendo a maior distância percorrida pelo agrotóxico quando as gotas são menores e, conseqüentemente, mais leves, o vento mais intenso e a altura em relação ao solo maior (mais expostas à ação do vento). O autor afirmou que a pulverização aérea é a que provoca maiores impactos, em função da maior altura no momento da pulverização, fazendo que o agrotóxico percorra maiores distâncias.

3. OBJETIVOS

1. Investigar se há impacto das ações antrópicas regionais sobre a comunidade de anfíbios anuros do interior e entorno de uma unidade de conservação federal de proteção integral, utilizando como bioindicadores girinos da espécie *Hypsiboas albopunctatus*.
2. Verificar se a espécie *Hypsiboas albopunctatus* pode ser utilizada como ferramenta bioindicadora de qualidade ambiental em ambientes agrícolas e naturais.
3. Avaliar a efetividade da unidade de conservação (Parque Nacional das Emas) na proteção de anfíbios anuros, em relação ao impacto das atividades agrícolas de produção intensiva, predominantes na região estudada.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Área de estudo

O Parque Nacional das Emas localiza-se na porção central do Bioma Cerrado e porção oeste da Bacia do Paraná, fronteira entre os estados de Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (Figura 2). Sua altitude está entre 650 e 1.000 m e sua extensão é de 132 mil hectares. É uma Unidade de Conservação cercada por lavouras e pastagens, onde são encontradas áreas representativas de todos os tipos de fitofisionomias de Cerrado (IBAMA, 2004).

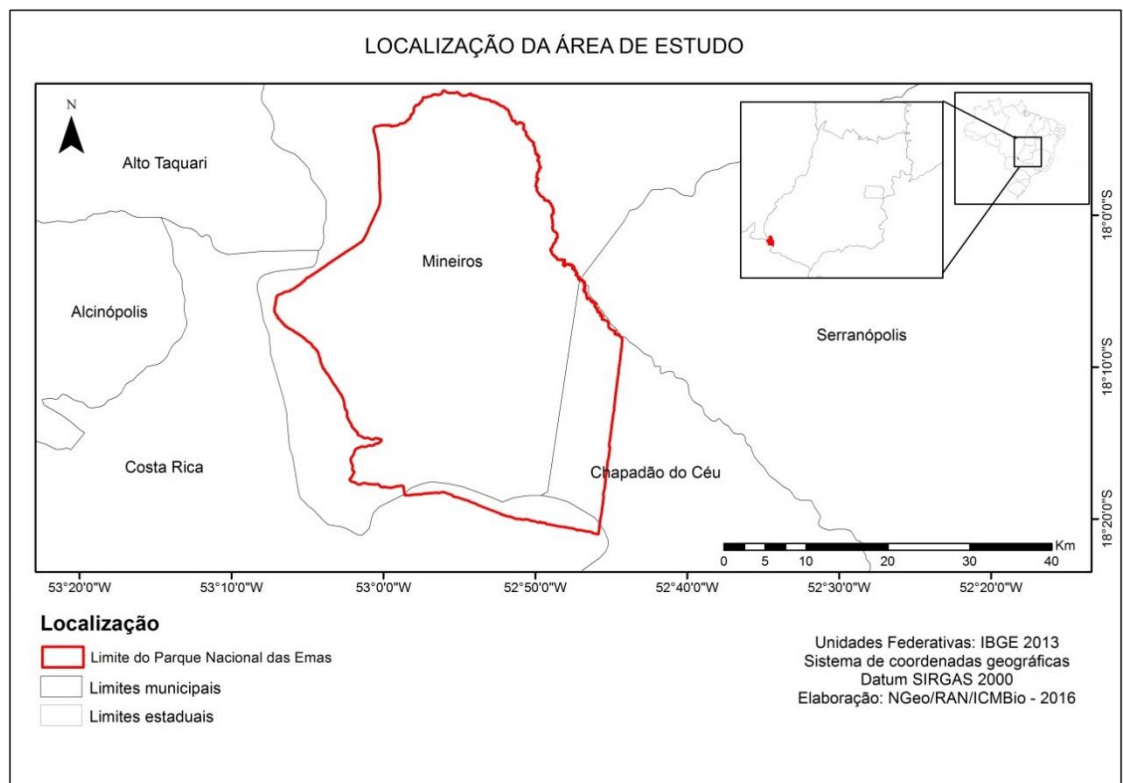


Figura 2: Mapa do Parque Nacional das Emas, no Sudoeste Goiano (RAN/ICMBio - 2016).

4.2. Espécie do estudo, ambiente e método de coleta

Para o presente estudo foi escolhida uma espécie mencionada por KOPP et al (2010), em sua lista de anfíbios anuros do Parque Nacional das Emas. Trata-se de um representante da família Hylidae, a qual é caracterizada por espécies arborícolas.



Figura 3: Espécime de *H. albopunctatus* vocalizando (Fábio Maffei).

Hypsiboas albopunctatus (Figura 3) possui ampla distribuição geográfica, ocorrendo nas regiões central, sul e sudeste do Brasil (Figura 4), além de Argentina, Bolívia, Paraguai e Uruguai (IUCN, 2016).

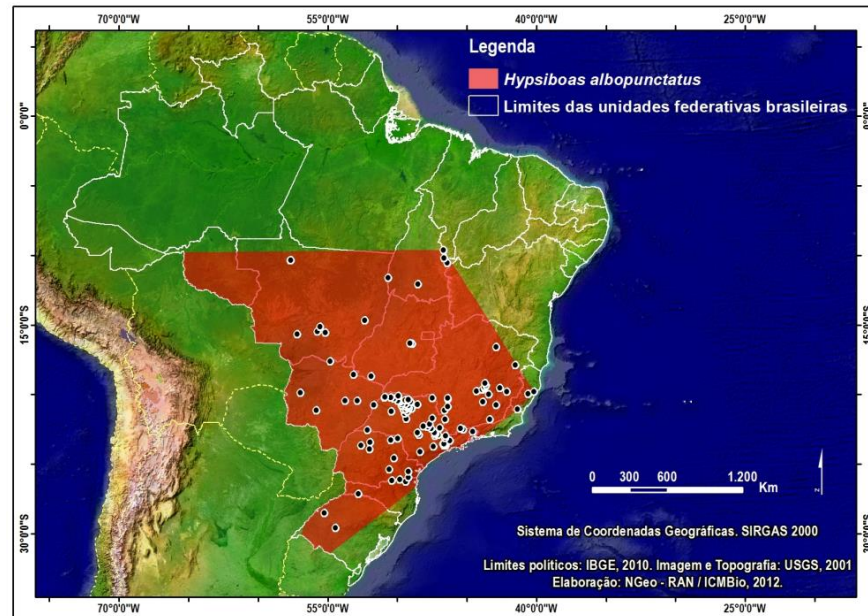


Figura 4: Distribuição geográfica de *H. albopunctatus* no Brasil (ICMBio - 2012).

O foco deste estudo foram apenas os girinos da espécie *H. albopunctatus* (Figura 5), entre os estágios 38 e 40, os girinos estão mais expostos a contaminação química, pelo fato de estarem na água em tempo integral, sendo o ambiente aquático o local onde poluentes costumam ficar concentrados.

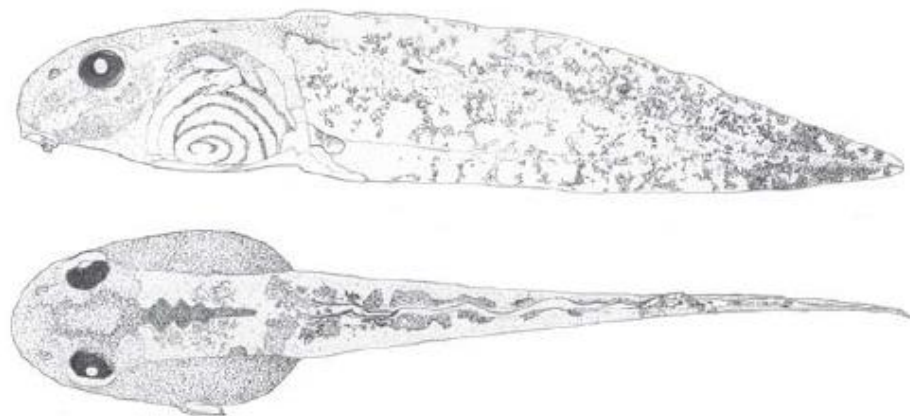


Figura 5: Girino de *H. albopunctatus* em vistas lateral e dorsal, extraído de Rossa-Feres, D.C and Nomura, F. - Biota Neotropica, v6 (n1) 2006.

Os anuros foram localizados sempre em ambientes de Veredas, tal ambiente foi definido pelo IBGE (2002) como “zona deprimida, com forma que pode ser ovalada, linear ou dirigida dentro de uma área estruturalmente plana ou aplainada pela erosão. A vereda resulta

de processos epidérmicos e exsudação do lençol freático, cujas águas geralmente convergem para um talvegue de drenagem concentrada, assinalada por um renque arbustivo e/ou arbóreo, caracterizado por palmeiras de diferentes espécies, particularmente os Buritis”.

Foi observado que a presença da espécie alvo do projeto é constante nesse ambiente, a partir dessa constatação as coletas foram padronizadas para o mesmo (Figuras 7 e 8). Os girinos foram coletados por meio de puçá, tendo sido selecionadas poças temporárias e permanentes para coletas em cada sítio pré-determinado. Com o auxílio de GPS foram registradas as coordenadas de cada local.

Foram definidos um total de oito pontos de coleta (Figura 6), sendo quatro deles dentro da área protegida: CAB (Vereda do Cabeceirão), BUR (Vereda do Buriti Torto), GLO (Vereda do Glória) e FOR (Vereda da Trilha do Formoso), já os pontos situados fora do Parque Nacional das Emas foram: ARA (Vereda do Araguaia), FRI (Vereda da Fazenda do Sr. Frias), ODE (Vereda da fazenda do Sr. Odeilson) e SUC (Vereda do rio Sucuriú). Os pontos de coleta foram definidos com o auxílio de mapas de cobertura e uso do solo e imagens de satélites.

Alguns dos espécimes coletados foram tombados na coleção zoológica da UFG sob os lotes 3031, 3032, 3034, 3036, 3038 e 3039.

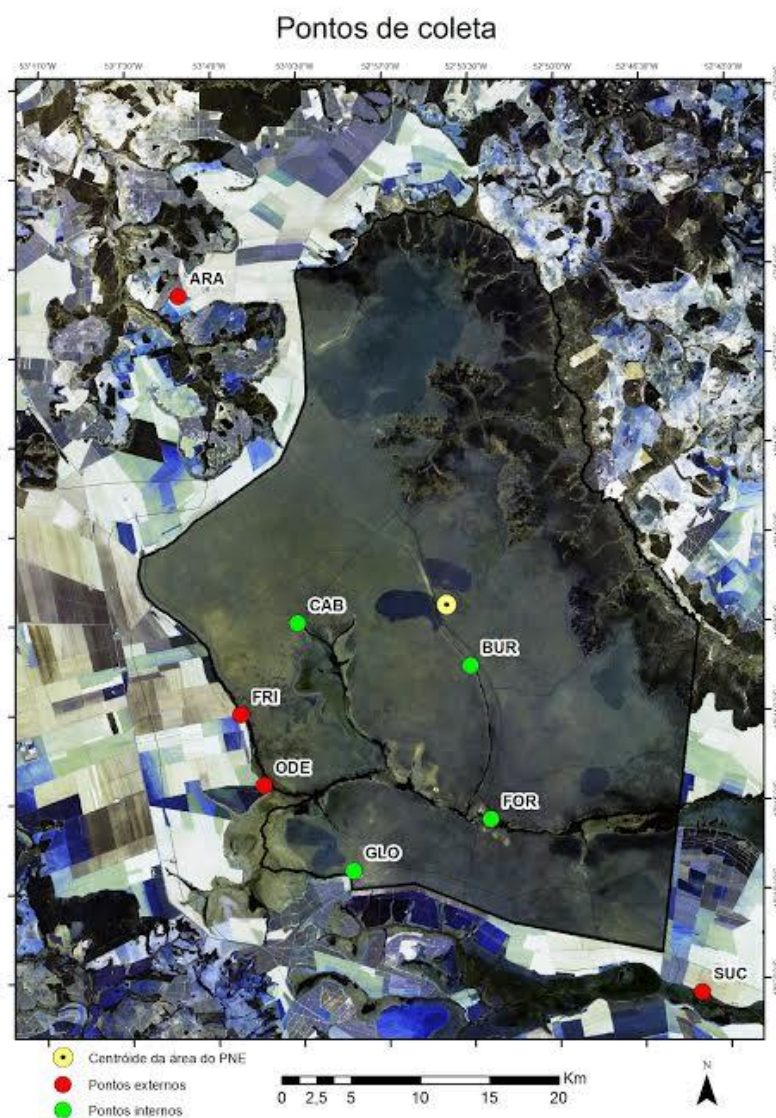


Figura 6: Imagem de satélite do Parque Nacional das Emas contendo o centróide da unidade (AMARELO) e as áreas escolhidas para as coletas, sendo quatro no interior do Parque (VERDE), menos suscetíveis, portanto, a contaminação por agrotóxicos e quatro mais expostas à contaminação (VERMELHO).

Tabela 1: Coordenadas geográficas dos pontos de coletas no Parque Nacional das Emas e entorno.

Ponto de coleta	Y	X
ARA (externo)	-18,000	-53,089
ODE (externo)	-18,238	-53,034
FRI (externo)	-18,192	-53,049
SUC (externo)	-18,375	-52,736
BUR (interno)	-18.161	-52.892
CAB (interno)	-18.132	-53.010
FOR (interno)	-18.261	-52.879
GLO (interno)	-18.294	-52.973



Figura 7: Coleta em poças típicas de ambiente de Veredas, com solo encharcado em função de afloramento de lençol freático, no Parque Nacional das Emas.

Os espécimes foram previamente identificados com auxílio de manual de identificação em campo (ROSSA-FERES & NOMURA, 2006) e posteriormente confirmada a identificação em laboratório com auxílio de lupa e especialistas. Os girinos foram mantidos vivos até a chegada ao laboratório, onde foram eutanasiados (método crioanestésico) para coleta de amostras de sangue, tais amostras são analisadas em buscas de danos em seu DNA. Alguns dos espécimes foram tombados na coleção herpetológica da UFG.



Figura 8: Poça típica de ambiente de Veredas, onde os espécimes foram coletados, dentro e fora dos limites do Parque Nacional das Emas.

4.3. Dados físico-químicos

Em cada corpo d'água foram coletados dados físico-químicos por meio de sonda multiparamétrica modelo YSI 6600, os dados obtidos foram comparados com os resultados das análises obtidas nos espécimes por meio da técnica cometa. Alguns elementos químicos, como o cloro, quando em quantidade muito elevada no ambiente, podem indicar contaminação por agrotóxicos. Com o cruzamento dessas informações pode ser possível avaliar o impacto do uso desses herbicidas e inseticidas sobre a biota, em especial os anfíbios, animais que costumam ser mais sensíveis a poluentes.

4.4. Ensaio cometa

Os animais foram eutanasiados por meio de exposição a uma solução anestésica de benzocaína a 5% seguida de resfriamento e logo após a morte foi feita uma incisão transversal na base da cauda de cada espécime, de forma a seccionar a artéria caudal e assim obter amostras de sangue.

As análises foram realizadas no laboratório de Genética e Mutagênese da UFG, foi feito um ‘pool’ de 5 girinos por amostra (cada amostra corresponde a uma lâmina), visando aumentar o número de células para análise. Foram confeccionadas 4 lâminas por ponto amostral, totalizando 20 girinos e cem células analisadas para cada um dos oito pontos investigados, na figura 9 é possível observar uma dessas células.

O ensaio cometa foi realizado utilizando o método alcalino, tal como descrito por Singh et al. (1988), com algumas modificações. As lâminas foram previamente revestidas com agarose, com um ponto de fusão normal (1,5%). Em seguida, as lâminas foram preparadas com 15 ul de suspensão de células diluídas em 120 uL de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%) a 37°C. As lâminas foram submersas em solução de lise (Triton X-100, DMSO e da solução de lise estoque) durante 24 horas a uma temperatura de 7°C e mantidas protegidas da luz. A eletroforese foi realizada a 25 V, e a corrente ajustada a 300 mA. As lâminas foram expostas a esta corrente elétrica no escuro durante 25 minutos. Após a eletroforese, as lâminas foram colocadas num tabuleiro de coloração, coberto com um tampão de neutralização (0,4 M, Tris-HCl, pH 7,5), e mantidas no escuro durante 5 min.

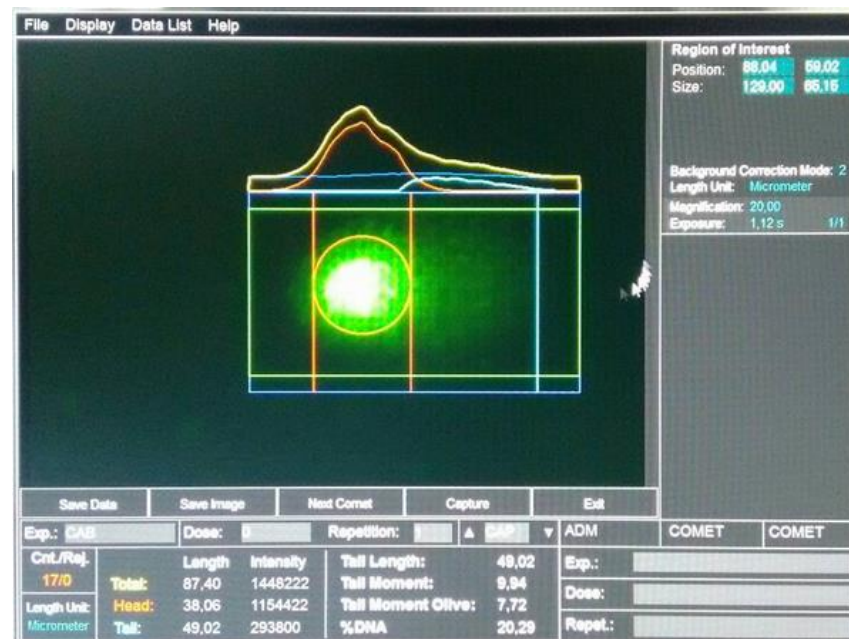


Figura 9: Captura de célula cometa de *H. albopunctatus* em microscópio de epifluorescência no laboratório de radiobiologia e mutagênese da UFG.

Para a análise, as lâminas foram coradas com 10 uL de solução de *SybrGreen Gold* (0,02 mg / mL) e cobertas com uma lamínula. Foram analisados 100 nucleóides por amostra. A análise foi realizada por um sistema de microscopia de fluorescência Axioplan-Imaging®, usando o software Comet Imager, com um filtro de excitação de 510-560nm e um filtro barreira de 590nm, com um aumento de 200x. Para avaliação dos danos no DNA foi utilizado o plug-in *OpenComet* para a plataforma de processamento de imagem popular, ImageJ. O software ImageJ pode exibir, processar e analisar imagens e destina-se principalmente para uso com imagens de microscopia (GYORI et al. 2014). Para a análise foram selecionados os parâmetros comprimento da cauda (CC), porcentagem de DNA na cauda (%DNA) e momento de cauda Olive (MCO).

4.5. Imagens orbitais

Para classificação do uso do solo foram utilizadas imagens de satélites dos tipos descritos a seguir.

4.5.1 Landsat

Operando a bordo dos satélites Landsat 5 e 7, o Thematic Mapper - TM é um sensor imageador óptico multiespectral que coleta dados da superfície terrestre, simultaneamente, em sete bandas espectrais. Seis dessas bandas operam na região refletida do espectro óptico e apresentam uma resolução espacial de 30 metros nas bandas de 1 a 5 e banda 7. A outra banda espectral, designada como banda TM6, capta a radiação termal, e (Novo, 1989). Em 2013 foi lançado o Landsat 8 carregando dois sensores: o Operational Terra Imager (OLI) e o Thermal Sensor infravermelho (TIRS). Eles captam nove faixas de ondas curtas e duas bandas térmicas ondas longas. A resolução espacial é de 30 metros na faixa multiespectral. Os satélites

Landsat 7 e 8 captam ainda a banda pancromática, com resolução espacial de 15 metros. Imagens Landsat são gratuitas, isso torna as imagens utilizadas por estes sensores uma boa opção para este trabalho.

4.5.2 MODIS

Lançado em 1999, opera a bordo dos satélites Terra (EOS AM) e Aqua (EOS PM). Tem uma largura de faixa de visualização de 2,330 km e visualiza a totalidade da superfície da Terra a cada 1-2 dias. Seus detectores medem 36 bandas espectrais entre 0,405 e 14,385 pm, e adquire dados em três resoluções espaciais - 250m, 500m e 1000 m. São imagens gratuitas e de fácil aquisição.

4.6. Simulação de Deriva

Para simulação da deriva na região do Parque Nacional das Emas foi utilizado o software AgDRIFT, desenvolvido pelo US Forest Service e utilizado no Brasil pelo IBAMA, as análises foram feitas com apoio de técnicos especializados desse órgão ambiental federal.

4.7. Análise estatística

Para reduzir o conjunto de variáveis resposta (Momento da Cauda Olive, % de DNA na Cauda e Comprimento da Cauda) em um subconjunto de variáveis não correlacionadas, foi utilizada a Análise de Componentes Principais (ACP ou PCA), na qual os dois primeiros eixos foram considerados na análise estatística subsequente. De modo geral, a PCA é uma técnica que permite reduzir a multidimensionalidade dos dados a um pequeno conjunto de variáveis-chaves (GOTELLI, 2004; LEGENDRE e LEGENDRE, 1998). Para testar a hipótese de que o dano genômico é maior em indivíduos coletados nos ambientes mais distantes do centro da Unidade de Conservação (UC) do que aqueles coletados nas proximidades do

centroide do Parque Nacional das Emas (Figura 6), foi realizado uma Análise de Regressão Linear Simples, na qual os dois primeiros eixos das PCA foram utilizados como variáveis respostas e as distâncias dos pontos amostrais em relação ao centroide da UC foram consideradas como as variáveis preditoras. Os pressupostos do teste foram testados e, uma vez que eles foram atendidos, não foi necessário nenhum tipo de transformação dos dados. As análises estão de acordo com ZAR (1996) e LEGENDRE e LEGENDRE (1998), com nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS

Os oito pontos amostrados, sendo quatro dentro do Parque Nacional das Emas e quatro no entorno da unidade de conservação, apresentaram os resultados listados conforme a tabela 2, na qual estão apresentados os parâmetros obtidos no ensaio cometa e as distâncias de cada ponto amostral em relação ao centróide do Parque Nacional das Emas.

Tabela 2. Pontos de coleta, médias, desvio padrão, valores máximos e mínimos dos três parâmetros considerados no ensaio cometa e distância de cada ponto de coleta em relação ao centróide do Parque Nacional das Emas.

Ponto		Comprimento da Cauda	Momento da Cauda de Olive	% de DNA na Cauda	Distancia para centroide do PNE (km)
Ponto 1 (BUR)	Média (DP)	20,78 (19,82)	2,76 (4,15)	11,19 (12,51)	4,83
	Min - Max	0,00 – 76,11	0,00 – 24,81	0,00 – 63,06	
Ponto 2 (CAB)	Média (DP)	34,74 (14,05)	5,95 (4,40)	24,45 (14,84)	10,78
	Min - Max	0,00 – 84,17	0,00 – 21,38	0,00 – 72,82	
Ponto 3 (FOR)	Média (DP)	25,20 (24,69)	4,02 (7,49)	13,71 (15,63)	16,03
	Min - Max	0,00 – 99,98	0,00 – 60,84	0,00 – 79,37	
Ponto 4 (GLO)	Média (DP)	23,19 (11,81)	2,98 (2,24)	15,25 (10,83)	20,53
	Min - Max	0,00 – 55,15	0,00 – 13,33	0,00 – 47,09	
Ponto 5 (SUC)	Média (DP)	15,32 (11,21)	2,19 (2,53)	14,01 (15,10)	33,24
	Min - Max	0,00 – 50,63	0,00 – 14,73	0,00 – 74,87	
Ponto 6 (FRI)	Média (DP)	21,38 (22,01)	3,32 (4,07)	14,69 (15,19)	16,82
	Min - Max	0,00 – 73,85	0,00 – 16,95	0,00 – 64,68	
Ponto 7 (ODE)	Média (DP)	30,94 (27,14)	5,64 (6,20)	23,28 (20,53)	18,63
	Min - Max	0,00 – 97,07	0,00 – 26,52	0,00 – 74,12	
Ponto 8 (ARA)	Média (DP)	17,61(13,35)	2,77(3,03)	16,18(15,96)	23,6
	Min - Max	0,00-65,47	0,00-15,57	0,00-61,84	

Os eixos 1 e 2 da PCA tiveram, respectivamente, os seguintes autovalores: 2,78 e 0,198 e juntos explicaram 99,27% da variação total encontrada (Tabela 3). O eixo 1 da PCA explicou 92,65% da variação encontrada e foi positivamente correlacionado com o Momento

da Cauda Olive (MCO), enquanto o eixo 2 da PCA explicou 6,62% da variação encontrada, sendo positivamente correlacionado com o percentual de DNA na cauda (% DNA) (Tabela 03). De modo geral, observou-se uma relação positiva entre a distância do ponto amostral em relação ao centróide do PNE com o eixo 2 (tabela 4, figura 10), o que evidencia que há maiores danos genéticos nas células sanguíneas dos indivíduos amostrados em pontos mais distantes ao centróide do PNE e mais expostos, portanto, a atividades antrópicas.

Tabela 3. Descrição da PCA, com os eixos 1 e 2, que juntos explicam 99,27% da variação encontrada. Sendo o Eixo 1 positivamente correlacionado com o Momento da Cauda Olive e o Eixo 2 com a % de DNA na cauda.

Parâmetro	Eixo 1	Eixo 2
Comprimento da Cauda	0,578	-0,552
Momento da Cauda de Olive	0,593	-0,219
% de DNA na Cauda	0,559	0,805
Autovalor	2,78	0,198
% variação	92,65	6,65

Mesmo os pontos situados dentro do PARNA, porém, mais próximos de sua borda, apresentaram maior quantidade de danos que os pontos mais centrais, um indicativo de que as áreas mais periféricas da UC estão sofrendo maior impacto das pressões antrópicas do entorno.

Tabela 4. Parâmetros da regressão linear simples.

Parâmetros	r	r ²	p	Equação
Eixo 1 vs. Distância para centróide	0,343	0,117	0,4	$y = 1,2216 - 0,0676*x$
Eixo 2 vs. Distância para centróide	0,718	0,516	<0,05	$y = -0,683 + 0,0378*x$

A figura 10 aponta para a existência de um gradiente nos níveis de danos encontrados no DNA da espécie *Hypsiboas albopunctatus* na região estudada. Foi possível observar uma maior quantidade de danos nos espécimes coletados no entorno da UC, na periferia do Parque Nacional das Emas os danos se mostraram intermediários, já na zona mais central a quantidade de danos atinge os menores níveis, o que pode ser observado nos pontos BUR e FOR. Já o ponto CAB apresentou níveis intermediários de danos, mesmo estando próximo do centróide. No caso de GLO, que está dentro do parque, porém próximo de sua borda, o nível de dano também foi intermediário, o mesmo ocorreu com ODE e FRI, externos ao PARNA e próximos da borda. Os pontos ARA e SUC, fora do parque e distantes do centroide e da borda apresentaram os maiores níveis de danos.

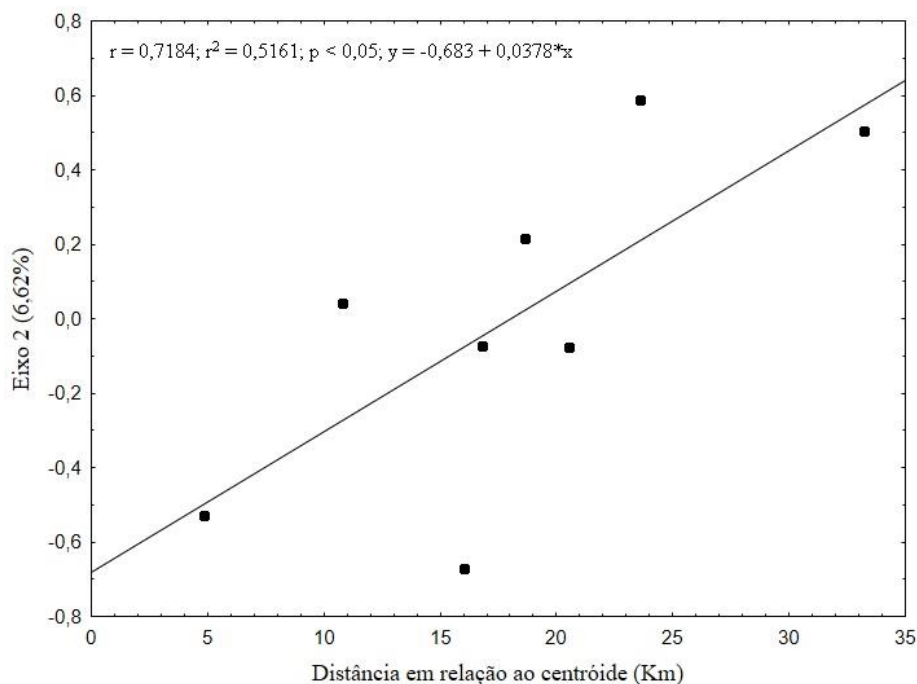


Figura 10: Gráfico contendo o eixo 2 da PCA, sendo este positivamente correlacionado com o percentual de DNA na cauda.

Em relação aos dados físico-químicos, foi observado um resultado mais discrepante, a relativamente elevada concentração de cloretos em um dos pontos de coleta, externo ao parque (Tabela 5). Trata-se da Vereda do rio Sucuriú (SUC), onde a concentração média do elemento químico supracitado atingiu valores bem acima dos demais pontos de coleta, de 115.65 mg/L, porém tal valor ainda se encontra abaixo do limite máximo tolerado pela resolução CONAMA N° 357/2005, que é de 250 mg/L. Os valores encontrados para amônia (NH₃) também estavam acima dos limites utilizados como referência pelo Plano de Manejo do parque nos pontos FOR (0.384 mg/L, muito acima da referência do Plano de Manejo) e ARA (0.026 mg/L, no limite da referência utilizada pelo Plano de Manejo) (IBAMA, 2005). No que tange a pH, o Plano de Manejo utiliza como referência valores entre 6.6 e 9.0, porém os pontos SUC e ODE apresentaram valores abaixo do mínimo estabelecido, de 5.08 e 5.43, respectivamente. Já o ponto da trilha do rio Formoso apresentou valor de 9.25, acima, portanto, do máximo estabelecido como referência.

Tabela 05: Médias e DP* obtidos de dados físico-químicos da água, a partir da sonda modelo YSI 6600.

Pontos	Média ± DP					
	pH	Condutividade (uS/cm)	NH4 + N mg/L	Rodamina ug/L	Cl - mg/L	NH3 N mg/L
FOR	9.25 ± 0.29	9.37 ± 1.60	0.176 ± 0.01	433.06 ± 79.01	0.724 ± 0.18	0.384 ± 0.82
BUR	7.08 ± 0.20	7.00 ± 0.00	0.016 ± 0.00	441.13 ± 24.88	4.055 ± 1.31	0.000 ± 0.00
CAB	7.06 ± 0.11	1.21 ± 1.12	0.180 ± 0.03	524.13 ± 0.92	0.252 ± 0.02	0.001 ± 0.00
GLO	7.65 ± 0.05	4.00 ± 0.00	0.041 ± 0.00	485.01 ± 0.90	1.401 ± 0.09	0.001 ± 0.00
ARA	7.94 ± 0.11	6.00 ± 0.00	0.452 ± 0.39	486.92 ± 3.89	0.837 ± 0.29	0.026 ± 0.01
FRI	7.31 ± 0.20	28.93 ± 0.35	0.088 ± 0.12	428.87 ± 4.06	2.755 ± 1.53	0.001 ± 0.00
ODE	5.43 ± 0.04	9.00 ± 0.00	0.151 ± 0.00	443.78 ± 0.59	0.523 ± 0.02	0.000 ± 0.00
SUC	5.08 ± 0.06	0.00 ± 0.00	0.004 ± 0.00	503.12 ± 91.81	115.65 ± 44.33	0.000 ± 0.00

* Desvio padrão

6. DISCUSSÃO

A espécie *Hypsiboas albopunctatus* se mostrou um bom bioindicador de qualidade ambiental em ambientes agrícolas e naturais, a mesma foi vista em ambientes de veredas no interior e entorno da unidade, seus girinos eram abundantes nos pontos de coleta e são facilmente identificáveis em campo.

Nossos resultados corroboraram a hipótese inicial, indicando que os animais protegidos pelo Parque Nacional das Emas estão menos expostos a pressões antrópicas e contaminantes ambientais que são comuns nas fazendas ao redor da unidade de conservação. O parâmetro % de DNA na cauda explicou 6,62% da variação encontrada e apresentou valor de $p < 0.05$, estando positivamente correlacionado com o eixo 2 da PCA. O nível de dano no DNA diminui conforme as populações estejam mais distantes da borda do parque e mais próximas do centróide, essa correlação existente entre o eixo 2 da PCA e a distância do centroide pode ser observada na figura 10. O poder de explicação da regressão é da ordem de 50% (r^2), podendo ser observado na Tabela 4. O fato de haver populações na periferia do parque com um nível de danos no DNA maior que o encontrado em espécimes coletados na zona mais central da unidade de conservação sugere a existência de efeitos de deriva de agrotóxicos dentro do parque, ou a contaminação de lençol freático, pois não há alterações antrópicas aparentes no ambiente periférico da UC, restando como hipótese a penetração de componentes químicos através do vento ou água. Pelos resultados obtidos podemos concluir que esses agrotóxicos não conseguem atingir a região mais central da unidade, ou a atingem em escala reduzida, pela maior distância das áreas de cultivo e pela presença da vegetação do parque, capaz de funcionar como um filtro ou barreira, principalmente quando há vegetação arbórea, como no caso de FOR e BUR. Modelos gerados pelo software AgDrift indicam uma maior possibilidade de ocorrer deriva até 300 metros de distância do ponto de pulverização. Esses números, porém, variam muito, em função das condições ambientais (vento,

temperatura e umidade relativa do ar) e de pulverização (tipo de bico, altura da pulverização em relação ao solo e tamanho da gota).

Os espécimes coletados na zona central da unidade, mais próximos de seu centroide (BUR) apresentaram baixos índices de danos no DNA, demonstrando esse incremento na quantidade de danos, quando os pontos de coleta se distanciam do centroide da UC, o ponto denominado FOR apresenta a terceira menor distância do centroide (16,03 Km) e apresentou o menor nível de danos, provavelmente por estar distante da borda do parque e por estar protegido pela presença de mata ciliar entre o referido ponto e a borda da UC.

O ponto mais periférico situado dentro da unidade de conservação (GLO) está mais exposto a contaminantes capazes de serem transportados pelo vento (agrotóxicos), visto que no entorno da unidade os produtores rurais pulverizam inseticidas e herbicidas constantemente, por meio de aeronaves, prática originalmente proibida pelo plano de manejo da unidade, mas que voltou a ser utilizada após os produtores rurais derrubarem tal proibição judicialmente. Essa atividade deve potencializar ainda mais o fenômeno da deriva, pelo fato das aeronaves realizarem a pulverização a uma maior altura do solo que as máquinas agrícolas, expondo ainda mais os agrotóxicos a ação do vento. O ponto GLO está a menos de 300 metros da borda, estando, portanto, mais exposto a contaminação que os pontos mais internos. De acordo com CUNHA (2008a), as maiores distâncias percorridas por agrotóxicos em situações de deriva foram de 40 metros, em um estudo controlado com pulverização realizada a 0,8 metro do solo e vento de 5m/s. No entanto, no entorno do Parque Nacional das Emas a pulverização é feita por aeronaves, a uma distância do solo muito superior a testada pelo autor, chegando a 5 metros de altura, com ventos que também chegam a velocidades superiores, de até 9 m/s segundo o INMET (2011). CUNHA (2008b) informa que o tamanho das gotas pulverizadas, a intensidade do vento e a distância do bico pulverizador em relação ao solo são os fatores determinantes do impacto da deriva, sendo a maior distância percorrida

pelo agrotóxico quando as gotas são menores (mais leves), o vento mais intenso e a altura em relação ao solo maior (mais expostas à ação do vento). O mesmo autor afirmou que a pulverização aérea é a que provoca maiores impactos, em função da maior altura no momento da pulverização, fazendo que o agrotóxico percorra maiores distâncias. A partir de tais informações, podemos inferir que os agrotóxicos pulverizados em lavouras do entorno podem estar derivando para dentro da unidade de conservação e causando danos em suas áreas mais periféricas.

A hipótese para a maior quantidade e intensidade de danos no DNA em amostras provenientes de áreas externas ao parque (ARA, SUC, ODE e FRI), além de áreas internas situadas próximas de seu perímetro (GLO), ser provocada pela presença de agrotóxicos, como glifosato e atrazina, largamente utilizados nas lavouras de soja da região, encontra eco na bibliografia consultada. De acordo com ROUSTAN et al (2014), ambos componentes, assim como o produto da degradação dos mesmos (AMPA) possuem um potencial genotóxico para ecossistemas e a saúde humana.

De acordo com ALVAREZ-MOYA et al (2013), comparações de células *in vivo* e *in vitro* de diferentes organismos, através do ensaio cometa, podem ser importantes na tentativa de mensurar a genotoxicidade do glifosato. CAVALCANTE et al (2008) afirmaram que herbicidas a base de glifosato são os mais amplamente distribuídos ao redor do mundo, sendo os mais utilizados, inclusive no Brasil. Os autores ainda afirmaram que o efeito genotóxico do mesmo ainda não é completamente conhecido, havendo estudos conflitantes do efeito desse produto sobre o material genético de várias espécies analisadas. ALVAREZ-MOYA et al (2013) pesquisaram o efeito genotóxico do glifosato em humanos, tilápias (*Oreochromis niloticus*) e uma planta do gênero *Tradescantia*, tanto em condições *in vitro*, quanto em condições *in vivo*. Os autores encontraram uma relação positiva entre o tamanho da cauda do cometa (CC) e a concentração de glifosato a que os organismos foram expostos.

YADAV et al (2013) relataram que o glifosato é considerado um herbicida emergente, que vem se tornando um pilar da agricultura moderna e, apesar de evidências contrárias, continua não sendo considerado perigoso para o meio ambiente, o seu efeito sobre espécies de anfíbios vem sendo pesquisado na América do Norte e Austrália. O impacto do glifosato sobre organismos não-alvo tem sido motivo de preocupação e intensos debates, principalmente para os anfíbios, permanecendo a controvérsia em relação aos seus possíveis efeitos genotóxicos. YADAV (2013) examinaram, por meio do teste dos micronúcleos, os efeitos genotóxicos do glifosato nos girinos da espécie *Euflyctis cyanophlyctis*, os espécimes foram submetidos a diferentes concentrações de glifosato. Os resultados obtidos mostraram que concentrações mais baixas do glifosato podem induzir a formação de micronúcleos nos eritrócitos dos girinos, tal descoberta aponta que, dependendo da concentração, o glifosato tem potencial genotóxico em *E. cyanophlyctis* e isso poderia ter consequências para o fitness da espécie a longo prazo.

MEZA-JOYA et al (2013) também demonstraram a existência de potencial genotóxico no glifosato. O mesmo é utilizado em pulverizações aéreas na Colômbia, com o objetivo de combater cultivos de drogas. Foi avaliado o impacto dessa prática sobre uma espécie de anuro, o *Eleutherodactylus johnstonei*, e os resultados indicaram que espécimes juvenis são altamente vulneráveis a concentração de 37,4 mg a.e./cm². O estudo demonstrou ainda que concentrações acima de 5,4 mg a.e./cm² (*in vivo*) e concentrações acima de 95 mg a.e./mL (*in vitro*) possuem clara evidência de citotoxicidade. As exposições *in vivo* e *in vitro* de eritrócitos de *E. Johnstonei* ao glifosato induziram a quebras das moléculas de DNA, com valores estatisticamente significativos ($p < 0.05$), apontando para a existência de risco ecotoxicológico para as comunidades de anfíbios.

Mesmo havendo muitas evidências contrárias, a EPA ainda classifica o glifosato como “categoria E”, o que significa que não existiria comprovação de que o mesmo seja

carcinogênico para a espécie humana (EPA, 1993). No entanto, vários autores têm demonstrado os efeitos genotóxicos do glifosato, em espécies distintas e diferentes modelos experimentais, além dos já relatados, podemos mencionar SIVIKOVA e DIANOVSKY, 2006; SPARLING et al., 2006; CAVAS e KONEN, 2007; ALVAREZ et al., 2011; GUILHERME et al., 2012 ALVAREZ-MOYA et al. 2013.

Outros agrotóxicos também seriam capazes de causar danos ao DNA em anfíbios, para RELYEA (2004), o declínio global desses animais despertou o interesse para a influência dos agrotóxicos nesse processo. O pesquisador avaliou o efeito de quatro diferentes agrotóxicos (diazinon, carbaryl, malation e glifosato) e suas combinações sobre a sobrevivência e desenvolvimento de girinos de 5 espécies de anuros (*Rana pipiens*, *Rana clamitans*, *Rana catesbeiana*, *Bufo americanus* e *Hyla versicolor*). A pesquisa demonstrou que esses agrotóxicos, tanto isolados quanto combinados entre si, provocam aumento de mortalidade e redução das taxas de crescimento nas espécies estudadas. Segundo PÉREZ-IGLESIAS et al (2014) o inseticida sistêmico imidacloprid (IMI), utilizado em lavouras, age afetando o sistema nervoso central dos insetos, sendo efetivo no controle das populações de espécies que atacam monoculturas. Na pesquisa desses autores foi investigado o efeito genotóxico do IMI, em uma versão comercial denominada “Glacoxan Imida”, sobre girinos da espécie *Hypsiboas pulchellus* (Anura: Hylidae) por meio de exposição in vitro. O DL 50 em 96 horas de exposição encontrado foi de 56.622 mg/L, tendo sido observado um incremento na frequência de micronúcleos (MN) já na dose de 25.0 mg/L nesse mesmo tempo de exposição. Também foi observado danos moleculares no DNA da espécie em tempo de exposição de 48h e concentração de 37.5 mg/L. Tais fatos demonstram que o IMI possui efeito genotóxico sobre anfíbios

Além dos efeitos negativos dos agrotóxicos, outro fator relevante que deve ser levado em consideração na tentativa de explicar uma maior quantidade de danos no DNA dos

espécimes originários do entorno do parque, seria a supressão da vegetação nativa. É possível que em ambientes desmatados, com maior insolação, aumente a exposição à radiação UV-B em girinos, ocasionando esse incremento nos danos genéticos. De acordo com ASSIS (2012), as mudanças climáticas associadas a outros impactos antrópicos, como o desmatamento, podem estar causando alterações microclimáticas nos habitats de anfíbios. Existe um crescente número de casos de epidemias em anfíbios se alastrando pelo planeta, provavelmente tais epidemias estão associadas a essas modificações ambientais, as quais podem estar fragilizando o sistema de reparo desses animais. TEVINI (1993), destacou que a radiação UV-B é a que causa maiores danos a organismos na superfície terrestre. Tal radiação é capaz de reduzir taxas de crescimento, provocar disfunções no sistema imunológico e causar danos subletais a nível molecular. A radiação UV-B pode provocar mutações e morte celular, porém existem evidências sugerindo que a radiação UV-A também pode ser danosa, especialmente quando combinada a outros fatores de estresse (BLAUSTEIN et al 2003). Segundo COCKELL (2001) a radiação UV é um importante fator causador de estresse em organismos vivos. BLAUSTEIN et al (1998) afirmam que a radiação do tipo UV-B é capaz de matar anfíbios diretamente, além de causar danos moleculares subletais, de forma isolada ou associada a contaminantes ambientais. Tais afirmações demonstram que os agrotóxicos podem não ser uma causa isolada desse aumento de danos no DNA de anfíbios da periferia do parque e das áreas cultivadas de seu entorno, o que pode estar ocorrendo é uma associação desses agrotóxicos com a supressão quase que total de vegetação nativa nas áreas de cultivo, expondo os girinos a uma maior incidência de radiação solar. Nesse aspecto, as alterações no código florestal (Lei nº 12.651, de 25 de maio de 2012) fragilizam a proteção ao meio ambiente ao reduzir as áreas de preservação permanente (APP) em propriedades rurais, expondo as espécies silvestres contidas nessas áreas a radiação UV-B direta. TOLEDO et al (2010) criticavam essas alterações na legislação, antes mesmo destas se efetivarem, afirmando

que tais modificações na lei incentivam o desmatamento, gerando as principais causas de declínios de anfíbios no mundo: redução e fragmentação de hábitat. Tal abrandamento na proteção ambiental também leva a consequências derivadas, como endogamia (perda de diversidade genética e todos seus efeitos associados) por causa do isolamento, perda de microhábitats, aumento da radiação UV-B pela insolação direta sobre ovos, larvas e juvenis e aquecimento global, sendo este com múltiplas consequências para os anfíbios, como aumento da letalidade de doenças pré-existentes, redução do tempo de corpos d'água temporários e aumento de mortalidade dos ovos e larvas.

Além das ações antrópicas já mencionadas, não podemos descartar ainda a possibilidade de contaminação do lençol freático, também pelas atividades agrícola e industrial da região. RIBEIRO et al (2007) afirmaram que o cultivo e manejo do solo exercem grande influência na qualidade de águas subterrâneas, sendo que algumas práticas agrícolas são capazes de provocar contaminação difusa por nutrientes e agrotóxicos. Segundo esses autores, as extensas áreas de monoculturas são as atividades agrícolas mais preocupantes, isso porque práticas agrícolas de culturas perenes estão menos propensas a perdas por lixiviação que as plantações sazonais, devido a menor distúrbio e aeração do solo e ainda aumento da demanda de nutrientes pelas plantas. RIBEIRO et al (2007) também alertam que a vinhaça ou vinhoto, efluente principal da indústria do álcool, pode contaminar o lençol freático. A vinhaça possui altas concentrações de potássio, cloreto, nitrogênio total, cálcio, sulfato, fósforo total, concentrações significativas de alguns metais e demanda bioquímica de oxigênio (DBO) elevada a ponto de causar sérios danos aos cursos d'águas superficiais

Em relação aos dados físico-químicos, os valores de cloretos obtidos foram bem superiores ao listados pelo plano de manejo, relativos ao ano de 1997. Foram encontrados, naquele ano, 0,5 mg/L Cl nas nascentes dos rios Sucuriú e Araguaia. Os números atuais foram de 115,65 mg/L para o ponto SUC, situado a 25 km da nascente do rio Sucuriú e de 0.837

mg/L Cl no ponto ARA, situado na RPPN Nascentes do Araguaia, nas proximidades de onde foi realizada a coleta 20 anos atrás. Tais resultados evidenciam um aumento bastante expressivo da quantidade de cloreto na bacia do rio Sucuriú (Tabela 5), porém esses valores ainda são inferiores ao máximo tolerado pela resolução N° 357/05 do CONAMA, que é de 250mg/L. É conhecida também a presença de organoclorados em alguns agrotóxicos, e valores elevados poderiam indicar uma pulverização de agrotóxicos organoclorados no local. O uso de organoclorados foi proibido no Brasil em 1985 (BRASIL, 1985), porém é sabido que esses produtos podem permanecer no ambiente por mais de 20 anos. Segundo SANTAMARTA (2001), os fabricantes de agrotóxicos querem, atualmente, que seus produtos tenham uma toxicidade aguda alta e uma toxicidade crônica baixa. O objetivo é desenvolver produtos que matem rapidamente, mas que não permaneçam no ambiente por longos períodos, como os organoclorados, que, por possuírem toxicidade crônica elevada, estão caindo em desuso, já sendo proibidos em muitos países. Segundo o autor, os mais novos agrotóxicos provavelmente não contem cloro em sua formulação, o que reduz a possibilidade do cloro encontrado no entorno do parque, ser proveniente de agrotóxicos. Porém, mesmo proibidos, os organoclorados continuam sendo utilizados ilegalmente em muitas lavouras. CIRCUNVIS (2010) relatou o efeito genotóxico de tais compostos, o que pode ser uma explicação para uma maior quantidade e intensidade de danos encontrados no DNA de espécimes coletados fora do parque. Dentre os mais sérios danos destes compostos está a genotoxicidade, que merece atenção especial, em função de sua natureza irreversível (NUNES, 1998). Uma outra possibilidade é que a presença de cloro seja resultado de contaminação provocada pela indústria do álcool, também presente na região de entorno do parque, tal atividade gera resíduos de vinhaça, com altas concentrações de cloreto, e o ponto SUC está situado a menos de 20 quilômetros de uma usina produtora de etanol (Cerradinho Bioenergia S/A, Usina Porto das Águas), cuja instalação é de 2009, a hipótese de tal

contaminação ser proveniente da usina deve ser melhor investigada. É provável, portanto, que a presença de cloreto no ponto SUC em uma taxa muito mais elevada que nos demais pontos, e 230 vezes mais elevada que a coleta feita em 1997 no mesmo local, esteja associada à atividade agrícola.

Em relação a amônia e amônio, foram detectadas concentrações abaixo dos limites estabelecidos pela resolução N° 357 do CONAMA, segundo RESENDE (2002) a amônia e o nitrato podem provocar perda de qualidade da água, podendo a amônia ser letal para peixes, pela toxicidade que representa para tais organismos aquáticos. A amônia aplicada via fertilizantes tende a ser transformada em amônio e esse, por sua vez, é convertido em nitrato, sendo o nitrato a principal forma de nitrogênio associada a contaminação da água por atividades agropecuárias. No entanto foi possível observar que em um dos pontos de coleta deste trabalho, o da trilha do rio Formoso (FOR), a concentração de amônia foi bem superior aos demais pontos (0.384 mg/L), mas ainda abaixo do máximo recomendado pela portaria N° 518/2004 do Ministério da Saúde (MS), que estabelece uma concentração máxima de 1.5 mg/L N-NH₃ para águas de consumo humano, porém esse valor está bem acima do limite de referência presente no Plano de Manejo do PARNA Emas (0.02 mg/L). Isso possivelmente pode ser explicado pelo fato de o rio Formoso não nascer dentro dos limites do parque, trata-se de um rio de grande volume de água, afluente do Correntes, que por sua vez deságua no Paranaíba (Bacia do Prata). O Formoso passa por um grande número de propriedades rurais produtoras de grãos da região, antes de atravessar o parque no sentido Oeste/Leste, sendo essa amônia possivelmente proveniente das atividades de adubação química dessas propriedades, podendo a mesma ter lixiviado para dentro desse curso d'água.

7. CONCLUSÕES

O Ensaio Cometa se mostrou uma ferramenta eficiente na avaliação de impactos sobre anuros e, indiretamente, sobre a biodiversidade como um todo. Paralelamente, a espécie *Hypsiboas albopunctatus* demonstrou ser um bom bioindicador de qualidade ambiental, dessa forma ambos podem ser utilizados para mensurar e monitorar impactos antrópicos sobre áreas protegidas do Cerrado.

O Parque Nacional das Emas não se mostrou totalmente eficiente na proteção da biodiversidade, e no que tange a impactos de agrotóxicos, ele provavelmente não a protege em toda sua extensão, apenas em sua zona central. Há impactos das atividades agrícolas sobre a anurofauna no interior e entorno da unidade de conservação, em um gradiente de impacto, que diminui de intensidade de fora para dentro do PARNA, sendo maior no seu entorno, intermediário na sua periferia, até atingir os níveis mais baixos na zona central da unidade de conservação.

Embora não seja possível estabelecer uma relação de causa e efeito a partir dos resultados deste trabalho, a hipótese mais plausível é que os agrotóxicos sejam uma das causas do dano genético encontrado, considerando o seu uso intensivo na região e potencial danoso relatado na literatura. Seria possível, portanto, reduzir os impactos sobre o PARNA tornando as normas para uso de agrotóxicos mais restritivas em seu entorno, proibindo as pulverizações aéreas e controlando o tamanho das gotas de agrotóxicos no momento da pulverização, além de proibir a pulverização nos horários de vento mais intenso, de forma a evitar a deriva para dentro da unidade de conservação.

As atividades agrícolas presentes na região também podem estar promovendo a contaminação de águas subterrâneas, visto que foi detectada elevada concentração de cloretos no ponto SUC, essa possibilidade deve ser melhor investigada, a suspeita é que a fonte dessa

contaminação seja a indústria do álcool, presente na região, ou as monoculturas de grãos, a elevada concentração de amônia no ponto FOR também deve ser proveniente da atividade agrícola.

O novo código florestal (Lei nº 12.651, de 25 de maio de 2012) fragiliza a proteção ao meio ambiente ao reduzir as áreas de APP em propriedades rurais, a supressão de vegetação nativa expõe as espécies silvestres contidas nessas áreas a radiação UV direta e pulverização direta e indireta por agrotóxicos e fertilizantes, além de destruir áreas de abrigo e reprodução, tais perturbações ambientais também podem estar associadas a uma maior quantidade de danos observada em espécimes coletados fora da UC e em suas áreas mais periféricas

BIBLIOGRAFIA

ALVAREZ-MOYA, C., SILVA, M. R., RAMÍREZ C. V., GALLARDO, D. G., SANCHEZ, R. L., AGUIRRE, A. C., VELASCO, A. F. **Comparison of the in vivo and in vitro genotoxicity of glyphosate isopropylamine salt in three different organisms.** *Genetics and Molecular Biology*, 37, 1, 105-110 (2014).

ANACLETO, T. C.; MIZIARA, F. **Expansão de fronteiras e ocupação do espaço no cerrado: o caso de Goiás.** *Geografia*. Rio Claro, v. 31, n. 3, p. 527- 538 (2006).

ASSIS A. B. **Microbiota, secreções cutâneas e microclima: consequências para os anfíbios.** *Revista da Biologia* 8: 45-48 (2012).

BERNARDE P. S. & MACEDO L. C. **Impacto do desmatamento e formação de pastagens sobre a anurofauna de serapilheira em Rondônia.** *Ilheringia, Sér. Zool.*, Porto Alegre, 98 (4): 454-459 (2008).

BLAUSTEIN, A. R. & KIESECKER, J. M. **Complexity in conservation: lessons from the global decline of amphibian populations.** *Ecology Letters* 5, 597 – 608 (2002).

BLAUSTEIN A. R., ROMANSIC J. M., KIESECKER J. M., HATCH A.C. **Ultraviolet radiation, toxic chemicals and amphibian population declines.** *Divers. Distrib.* 9:123-140 (2003).

BRASIL, Supremo Tribunal Federal. Portaria n.329 de 2 de setembro de 1985. Ementa da portaria do Diário Oficial [da República Federativa do Brasil], Brasília, v.123, n.168, p.12941, 3 Set. (Seção 1) (1985).

CAVALCANTE, D. G. S. M., MARTINEZ C. B. R., SOFIA S. H. **Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*** *Mutation Research* 655 41–46 (2008).

CAVAS T. and KONEN S. **Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to glyphosate formulation using the micronucleus test and comet assay.** *Mutagenesis* 22:263-268 (2007).

COCKELL, C.S. **A photobiological history of earth.** *Ecosystems, evolution and ultraviolet radiation* p. 1–35. Springer, New York (2001).

CONAMA – CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução CONAMA nº 357 de 17 de março de 2005.** Brasília: D.O.U. 18/03/2005. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459> Acesso em 16 de agosto de 2016.

CUNHA, J. P. A. R. **Simulação de deriva de agrotóxicos em diferentes condições de pulverização.** *Ciênc. Agrotec.*, Lavras, v. 32, n. 5, p. 1616-1621, (set. /out. 2008a).

CUNHA, J. P. A. R. **Simulação de deriva de agrotóxicos em diferentes métodos de aplicação.** Rev. Ciênc. Agron., v. 39, n. 4 p. 487-493, (out-dez, 2008b).

DA SILVA, JULIANA 2007. **O uso do ensaio cometa para o ensino de genética toxicológica.** Laboratório de Genética Toxicológica, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), obtido via internet, acesso em 31/08/2015.

DAVIDSON C., BRADLEY S. H., JENNINGS M.R. **Declines of the California red-legged frog: climate, UV-B, habitat and pesticides hypotheses.** Ecol. Appl. 11:464-479 (2001).

DE PAULA, C. Z. **O Campo da Morte: Uma leitura do Município de Maringá na Década de 80.** Revista de História Regional. 3(2) 139-156 (1998).

EPA Environmental Protection Agency **Registration Eligibility Decision (RED) Glyphosate.** EPA-738-R-93-014. Environmental Protection Agency, Washington DC, 74 p. (1993).

FISHER R. N. SHAFFER H. B. **The decline os amphibians in California's Great Central Valley.** Conservation Biology 10:1387-1397 (1996).

FEMAS **Controle De Gramíneas Invasoras No Parque Nacional Das Emas.** Relatório parcial (2003).

FROST, D. R. Amphibian species of the world: na online reference. Disponível em <<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php>>. Acesso em Ago. 2016.

GIBBONS, J. W. et. al. **The Global Decline of Reptiles, Déjà Vu Amphibians.** Bioscience, v. 50, p. 653-666 (2000).

Goiás em Dados 2012 / Secretaria de Estado de Gestão e Planejamento; Instituto Mauro Borges de Estatísticas e Estudos Socioeconômicos - Goiânia: SEGPLAN, (2013).

GONÇALVES M. W. **Detecting genomic damages in the frog *Dendropsophus minutus*: preserved versus perturbed areas.** Environmental Science and Pollution Research (2014).

GONÇALVES M. W., CARVALHO W. F., PEREIRA R. R. SILVA D. M., BASTOS R. P. CRUZ A. D. **Avaliação de danos genômicos em anfíbios anuros do Cerrado goiano.** Estudos, Goiânia, V. 41, especial, p. 89-104 (2014).

GOTELLI N. J., ELLISON A. M. **Princípios de estatística em ecologia.** Porto Alegre: Artmed (2011).

GYORI, B. M., VENKATACHALAM, G., THIGARAJAN, P.S., HSU, D., CLEMENT, M. **Open Comet: An automated tool for comet assay image analysis.** *Redox Biology*, n. 2, p. 457-465 (2014).

HEYER, W. R. **On frog distributions patterns east of the Andes.** Proceedings of a workshop on neotropical distribution patterns (1988).

IBAMA **Plano de Manejo do Parque nacional das Emas** (2005).

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. **Vocabulário básico de recursos naturais e meio ambiente.** Brasília: IBGE 146 p. (2002).

ICMBio. Parque Nacional das Emas. **Web site oficial do instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade.** Obtido via internet em <<http://www.icmbio.gov.br/portal/o-que-fazemos/visitacao/ucs-abertas-a-visitacao/204-parque-nacional-das-emas.html>> acesso em 10/01/2015.

Instituto Nacional de Meteorologia - INMET. **Web site oficial do Instituto Nacional de Meteorologia.** Obtido via internet em <<http://www.inmet.gov.br/portal/>> acesso em 2012.

IUCN **The IUCN Red List of Threatened Species.** <<http://www.iucnredlist.org/details/55378/0>> Obtido via internet. Acesso em 09/08/2016.

KATS, L. B. & FERRER, R. P. **Alien predators and amphibian declines: review of two decades of Science and the transition to conservation.** *Diversity and Distributions* 9:99-110 (2003).

KOPP, Katia; SIGNORELLI, Luciana and BASTOS, Rogério P. **Distribuição temporal e diversidade de modos reprodutivos de anfíbios anuros no Parque Nacional das Emas e entorno, Estado de Goiás, Brasil.** *Iheringia, Sér. Zool.* [online]. vol.100, n.3, pp. 192-200 (2010).

LANNOO M.J., LANG K., WALTZ T., PHILLIPS G.S. **An altered amphibian assemblage: Dickinson county, Iowa, 70 years after Frank Blanchard's survey.** *Am. Midl. Nat.* 131:311-319 (1994).

LEGENDRE, P., LEGENDRE, L., **Numerical ecology**, 2nd English edn. Elsevier, Amsterdam (1998).

MARSH D.M., TRENHAM P.C. **Metapopulation dynamics and amphibian conservation.** *Conservation Biology* 15:40-49 (2001).

MEZA-JOYA, F. L., RAMÍREZ-PINILLA M. P., FUENTES-LORENZO, J. L. **Cytotoxic and Genotoxic effects of glyphosate formulation (Roundup SL-Cosmoflux**

411F) in the direct-developing frog *Eleutherodactylus johnstonei* Environmental and Molecular Mutagenesis (2013).

FRENZILLI, G., NIGRO, M., LYONS B. P. **The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments.** Mutation Research 681 (2009) 80-92.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). BIODIVERSIDADE BRASILEIRA. **Avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros.** Brasília: MMA/SBF. 4004p. (2002).

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). **<http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>**. Obtido via internet. Acesso em Abril/2015.

NAKAGOME, F. K., NOLDIN, J. A. & RESGALLA JÚNIOR, C., **Toxicidade aguda e análise de risco de herbicidas e inseticidas utilizados na lavoura de arroz irrigado sobre o cladóceros *Daphnia magna*.** Pesticidas: r. ecotox. meio ambiente, 16: 93-100 (2006).

NOVO, E. M. L. M. **Sensoriamento remoto: princípios e aplicações.** São Paulo: Edgard Blücher. 308 p. (1989).

NUNES, M. V., TAJARA, E. H. **Efeitos tardios dos praguicidas organoclorados no homem.** Rev. Saúde Pública, 32 (4): 372-383 (1998).

PEDROSO, I. L. P. B. **Meio Ambiente, agroindústria e ocupação dos cerrados: o caso do município de Rio Verde no sudoeste de Goiás.** Maringá: Urutágua - revista acadêmica multidisciplinar N° 06. (2005).

PÉREZ-IGLESIAS, J. M., ARCAUTE R. C., NIKOLOFF N., DURY L., SOLONESKI S., NATALE G. S., LARRAMENDY M. L. **The genotoxic effects of the imidacloprid-based insecticide formulation Glacoxan Imida on Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae).** Ecotoxicology and Environmental Safety 104 (2014) 120-126.

PIRES-O'BRIEN, M. J., O'BRIEN, C. M. **Ecologia e modelamento de florestas tropicais.** Belém: FCAP. Serviço de Documentação e Informação. 400 p., 1995.

PIVELLO, V.R. **Invasões Biológicas no Cerrado Brasileiro: Efeitos da Introdução de Espécies Exóticas sobre a Biodiversidade.** ECOLOGIA.INFO. 33 (2011).

POLETTA, G. L., LARRIERA, A., KLEINSORGE, E., MUDRY, M. D. **Genotoxicity of the herbicide formulation Roundup® (glyphosate) in broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) evidenced by the Comet assay and the Micronucleus test.** Mutation Research 672 (2009) 95–102.

RAMOS-NETO, M.B. & PIVELLO, V.R. **Lightning fires in a Brazilian Savanna National Park: rethinking management strategies.** Environ. Manage. 26 (6):675-684. (2000).

REDFORD, K. H. **Emas National Park and the Plight of the Brazilian Cerrados.** Oryx, 19:210-214 (1984).

RELYEA R. A. **Growth and survival of five amphibian species exposed to combinations of pesticides.** Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 23, No. 7, pp. 1737–1742, (2004).

RESENDE A. V. **Agricultura e Qualidade da Água: Contaminação da água por Nitrato.** Planaltina: Embrapa Cerrados, 29 p. - (Documentos / Embrapa Cerrados, ISSN 1517-5111; n. 57) (2002).

RIBEIRO M. L., LOURENCETTI C., PEREIRA S. Y., MARCHI M. R. R. **Contaminação de águas subterrâneas por pesticidas: avaliação preliminar.** Quim. Nova, Vol. 30, No. 3, 688-694 (2007).

ROSSA-FERES, D. C. & NOMURA F. **Characterization and taxonomic key for tadpoles (Amphibia: Anura) from the northwestern region of São Paulo State, Brazil.** Biota Neotropica, v6 (n1). 2006.

ROUSTAN, A., AYE, M., DE MEO M., DI GIORGIO, C. **Genotoxicity of mixtures of glyphosate and atrazine and their environmental transformation products before and after photoactivation** Chemosphere 108 93–100 (2014).

SANTAMARTA, J. **Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável**, Porto Alegre, v.2, n.1, jan./mar.2001.

SBH. 2004. Sociedade Brasileira de Herpetologia. **Lista de espécies de anfíbios do Brasil.** <http://www.sbherpetologia.org.br/images/LISTAS/Lista_Anfibios2016.pdf >. Acesso em 10 Nov. 2016.

SANTORO, G. ; BRANDAO, R. A. . **Reproductive modes, habitat use and richness of anurans from Chapada dos Veadeiros region, Goiás, Brazil.** North-Western Journal of Zoology (Print), v. 10, p. 365-373 (2014).

SCOTT JR., NJ. & B.D. WOODWARD. **Standard techniques for inventory and monitoring: Surveys at Breeding Sites**, p.118-125. In: W.R. Heyer; M.A. Donnelly; R.W. McDiarmid; L.C. Hayek & M.S. Foster (Eds). Measuring and Monitoring Biological Diversity. Standard Methods for Amphibians. Washington, D.C., Smithsonian Institution Press, 364p. (1994).

SINGH, N. P.; MACCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. **A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells.** *Experimental Cell Research.* v. 175, p. 184-191 (1988).

SIVIKOVA K. and DIANOVSKY J. **Cytogenetic effect of technical glyphosate on cultivated bovine peripheral lymphocytes.** *Int J Hyg Environ Health* 209:15-20 (2006).

SPARLING D. W., MATSON C., BICKHAM J. and DOELLING-BROWN P. **Toxicity of glyphosate as Glypro (R) and LI700 to red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*) embryos and early hatchlings.** *Environ Toxicol. Chem.* 25:2768-2774 (2006).

TEVINI, M., **UV-B Radiation and ozone depletion: effects on humans, animals, plants, microorganisms, and materials.** Lewis Publishers, Boca Raton, FL. (1993).

TOLEDO, L. F., CARVALHO-E-SILVA, S. P., SÁNCHEZ, C., ALMEIDA M. A., HADDAD, C. F. B. **A revisão do Código Florestal Brasileiro: impactos negativos para a conservação dos anfíbios** *Biota Neotrop.*, vol. 10, no. 4 (2010).

UETANABARO, M. **Guia de Campo dos Anuros do Pantanal e Planaltos de Entorno.** Campo Grande: Ed. UFMS (2008).

VALDUJO, PAULA H.; CARNAVAL, ANA CAROLINA O. Q.; GRAHAM, CATHERINE H. **Environmental correlates of anuran beta diversity in the Brazilian Cerrado.** *Ecography (Copenhagen)*, v. 35, (2012).

VREDENBURG V.T. **Reversing introduced species effects: experimental removal of introduced fish leads to rapid recovery of a declining frog.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:7646-50 (2004).

WELLS, K. D. **The ecology and behavior of amphibians.** The Chicago University Press (2007).

YADAV S. S., GIRI S., SINGAH U., BORO F., GIRI A. **Toxic and genotoxic effects of Roundup on tadpoles of the Indian skittering frog (*Euflectis cyanophlyctis*) in the presence and absence of predator stress.** *Aquatic Toxicology* 132– 133 (2013).

ZAR J. H., **Biostatistical analysis.** Prentice-Hall, Englewood Cliffs (1996).