



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO

NATHALI GARCIA RISTAU

CONTAMINAÇÃO POR COMPOSTOS ORGANOCLORADOS EM BOTO-VERMELHO
Inia geoffrensis DE BLAINVILLE, 1817 (CETARTIODACYLA: INIIDAE) NOS RIOS
NEGRO E BRANCO, NORTE DO BRASIL

SÃO LUIS - MA
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO

NATHALI GARCIA RISTAU

**CONTAMINAÇÃO POR COMPOSTOS ORGANOCLORADOS EM BOTO-VERMELHO
INIA GEOFFRENSIS DE BLAINVILLE, 1817 (CETARTIODACTYLA: INIIDAE) NOS
RIOS NEGRO E BRANCO, NORTE DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação, área de concentração Mutagênese, Carcinogênese e Ecotoxicologia, da Universidade Federal do Maranhão, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Conservação.

Orientador: Ricardo Luvizotto Santos, Dr.
Co-orientadora: Miriam Marmontel, Ph.D.
Co-orientador: Gilvan Takeshi Yogui, Ph.D.

SÃO LUÍS - MA
2016

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Ristau, Nathali Garcia.

CONTAMINAÇÃO POR COMPOSTOS ORGANOCORADOS EM BOTO-
VERMELHO *Inia geoffrensis* de BLAINVILLE, 1817
CETARTIODACTYLA: INIIDAE NOS RIOS NEGRO E BRANCO, NORTE DO
BRASIL / Nathali Garcia Ristau. - 2016.

65 p.

Coorientador(a) 1: Miriam Marmontel, Gilvan Takeshi
Yogui.

Orientador(a): Ricardo Luvizotto Santos.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Biodiversidade Conservação/ccbs, Universidade Federal do
Maranhão, São Luís - Ma, 2016.

1. Amazônia. 2. Boto-rosa. 3. Conservação. 4.
Poluentes Orgânicos Persistentes (pops). I. Gilvan
Takeshi Yogui, Miriam Marmontel. II. Santos, Ricardo

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO

NATHALI GARCIA RISTAU

**CONTAMINAÇÃO POR COMPOSTOS ORGANOCLORADOS EM BOTO-
VERMELHO *Inia geoffrensis* de BLAINVILLE, 1817 (CETARTIODACTYLA:
INIIDAE) NOS RIOS NEGRO E BRANCO, NORTE DO BRASIL**

BANCA EXAMINADORA

05/08/2016

Prof^a Dra. Raimunda Nonata Fortes de Carvalho Neta

Prof^a Dra. Débora dos Santos Martins

Prof^o Dr. Ricardo Luvizotto Santos

Aos bravos da família Ristau (*in memoriam*) Suzana, Gustavo, Guilherme, Ernesto, Henrique, Fritz e Frida, que mesmo não havendo laços com o judaísmo escolheram deixar sua pátria em não concordância ao regime nazista.

*Ao maior exemplo de força em vida que pude conhecer. Ao meu pai, **Guilherme Ristau**, com amor.*

AGRADECIMENTOS

Aos mamíferos aquáticos, seres fantásticos que me fascinam desde a infância e me trazem a vontade diária de tornar esse mundo um pouco melhor, por eles.

Aos meus pais, **Guilherme** e **Irene**, por todo apoio durante essa caminhada. Por compreenderem as dificuldades do caminho e ainda assim estarem sempre dispostos a me ajudar. A vocês a minha eterna gratidão!

Aos professores **Tomas Hrbek** e **Izeni Farias** pelo crédito e confiança de sempre, pela disponibilização das amostras e parceria nos trabalhos. Vocês são dois grandes exemplos para mim.

A **Ricardo Luvizotto** pela confiança imediata, por viabilizar nosso projeto e ser um grande parceiro sempre. Golfinhos também se encontram nas curvas de rios!

À **Miriam Marmontel** pelo acolhimento, pelas incontáveis orientações, pelo eterno aprendizado, por tamanha generosidade em ensinar e dividir. Mi, você é meu grande espelho de conduta pessoal e profissional. Sinto-me honrada em poder partilhar de experiências profissionais ao seu lado. Muito obrigada!

Ao **Gilvan Yogui** pela colaboração, orientação e exemplar dedicação. Obrigada por me receber no OrganoMAR, por pacientemente me ensinar e explicar o que muitas vezes não mais caberia mais explicação. Você é um profissional admirável, daqueles que só se pensava ver nos filmes de ficção ☺. Muito obrigada!

À **Carla, Rodrigo, Peu, Duda, dona Lúcia, Paiva, Naldo, Themis, Estelinha e Henrique**. Obrigada pela generosidade sem tamanho, por me acolher e me dar mais que um abrigo; uma família capaz de amenizar a saudade de casa. Em especial à Carlinha, o “vem te embora” foi a coisa mais confortante que ouvi nos últimos 32 anos. Muito obrigada!

Aos amigos do OrganoMAR, especialmente à **Daniele Miranda** (Raio 1), **Jéssica Resende** (Nem), **Daniele Maciel** (Raio 2), **Débora** (Chaveirinho) e **Ana Paula** (Anita). Vocês foram o melhor presente que o Mestrado me deu. Vou levar para todo o sempre!

Aos amigos do LEGAL, dos quais sinto imensa saudade, por toda ajuda em campo e no laboratório, mesmo quando sequer imaginava que estes seriam os materiais objeto de estudo da minha dissertação. Em especial à **Valéria Machado** e **José Gregório** – aprendi muito com vocês. Contem sempre comigo!

Aos pescadores **Ney**, **Choca**, **Jair** e **Américo** pela convivência, lições, estórias e os incontáveis risos. Que os botos-vermelho nos permitam novos encontros e momentos incríveis como os já vividos. Sou fã desde o início!

A **Gilberto Salvador**, pela parceria e orientação, pela generosidade em compartilhar o que sabe, sempre! Muito obrigada!

A todos do **Instituto Amares** pelo apoio e compreensão em meio a tantas atividades e necessidades. Obrigada por acreditarem e me ajudarem a realizar esse sonho, por todo esforço e dedicação ao Instituto após 9 anos de gestação. Essa causa é de todos nós!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplos de armas químicas amplamente utilizadas durante a Primeira e Segunda Guerra Mundial. Cartazes divulgados pelo exército americano durante a Segunda Guerra Mundial..... 12

Figura 2. Zyklon B, composto químico fabricado pela Bayer durante a Segunda Guerra Mundial..... 12

ARTIGO

Figura 1. Mapa mostrando os pontos de coleta de amostras (círculos vermelhos) nos rios Negro (NR) e Branco (BR), Amazônia brasileira..... 31

Figura 2. Distribuição da contaminação ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido) por pesticidas organoclorados e bifenilas policloradas em golfinho-da-Amazônia (*I. geoffrensis*) nos rios Negro e Branco, Amazônia, Brasil..... 39

Figura 3. Gráficos (A), (B) e (C) indicando a espacialidade dos compostos estudados por pontos amostrais. Os pontos representam a mediana, as caixas representam os quartis de 25 e 75%. As linhas representam o alcance (range) dos pontos, excluindo outliers. Asteriscos representam extremos, valores muito diferentes do geral encontrado.....41

Figura 4. Gráfico indicando a diferença de contaminação (mediana) de PCBs entre as bacias do rio Negro e rio Branco, Norte do Brasil. Os pontos representam a mediana, as caixas representam os quartis de 25 e 75%. As linhas representam o alcance (range) dos pontos, excluindo outliers. Asteriscos representam extremos, valores muito diferentes do geral encontrado..... 42

Figura 5. Gráfico indicando a porcentagem das bifenilas policloradas quantificadas por esse estudo e a frequência de detecções dos mesmos compostos pelo método analítico utilizado... 45

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Informações sobre local de coleta e parâmetros biológicos dos indivíduos de golfinho-da-Amazônia amostrados neste estudo..... 38
- Tabela 2.** Concentração de pesticidas organoclorados e bifenilas policloradas ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido) no tecido adiposo subcutâneo do golfinho-da-Amazônia (*I. geoffrensis*) amostrado nos rios Negro e Branco, Norte do Brasil..... 46
- Tabela 3.** Comparação da média de contaminação por organoclorados ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido) em tecido adiposo subcutâneo de golfinhos de rio e pequenos cetáceos costeiros de todo o mundo..... 50

RESUMO

As baleias jubarte têm uma distribuição cosmopolita e realizam migrações anuais entre latitudes baixas e altas, onde a reprodução e a alimentação ocorrem, respectivamente. No Brasil, a principal área de reprodução abrange o Banco de Abrolhos na Costa Leste Brasileira e a área de alimentação desta população está localizada nas Ilhas Geórgia do Sul e Sandwich do Sul. Aqui, dois registros recentes de baleias jubarte são relatados para o estado do Maranhão, Costa Equatorial Amazônica (AEC), um dos quais envolve um filhote recém-nascido com restos do cordão umbilical. Além disso, uma revisão aprofundada dos registros de encalhe e observação para esta área é apresentada. A análise filogenética colocou os animais encalhados dentro dos dois haplogrupos mais comuns relatados para as áreas de reprodução do Hemisfério Sul (CD e IJ). Uma possível extensão da área de distribuição da espécie ou a recolonização de uma área histórica de reprodução ao longo da costa brasileira é discutida. Os resultados apresentados fornecem evidências de sobreposição de distribuição entre as populações de baleias jubarte do norte e sul do Oceano Atlântico, o que exigirá o desenvolvimento de estratégias de conservação entre os países vizinhos e ressalta a necessidade de desenvolver estratégias de gestão que permitam o manejo sustentável da Costa Equatorial Amazônica.

Palavras-Chave: Amazônia, boto-rosa, conservação, poluentes orgânicos persistentes (POPs).

ABSTRACT

Humpback whales have a cosmopolitan distribution and undertake annual migrations between low and high latitudes where breeding and feeding takes place, respectively. In Brazil, the main breeding area encompasses the Abrolhos Bank at the Eastern Brazilian Coast and the feeding area of this population is located in South Georgia and South Sandwich Islands. Here, two recent records of humpback whales are reported for Maranhão State, Amazonian Equatorial Coast (AEC), one of which involves a newborn calf with remains of the umbilical cord. Additionally, an in-depth review of the stranding and observation records for this area is presented. Phylogenetic analysis placed the stranded animals within the two most common haplogroups reported for the Southern Hemisphere breeding grounds (CD and IJ). A possible extension of the species range or the recolonization of a historical breeding area along the Brazilian coast is discussed. Presented results provide evidence of distribution overlap between the humpback whale populations of the northern and southern Atlantic Ocean which will require the development of conservation strategies among neighboring countries and underline the need to develop management strategies that will allow sustainable management of the Amazonian Equatorial Coast.

Key-words: Amazon, pink dolphin, conservation, persistent organic substances.

SUMÁRIO

1. Introdução	10
2. Fundamentação Teórica	11
2.1 Os poluentes no mundo	11
2.2. Compostos Organoclorados	13
2.3 Os Cetáceos	14
2.4 O gênero <i>Inia</i> : histórico	15
2.5 Classificação atual	16
2.6 Biologia	18
2.7 Distribuição	19
2.8 Status de conservação e ameaças à espécie	20
Bibliografia	23

ARTIGO

Herança de um mundo antropogênico: contaminação por compostos organoclorados em golfinho-da-amazônia (<i>Inia geoffrensis</i>)	30
--	----

1. Introdução	31
2. Materiais e Métodos	32
2.1 Área de estudo e coleta das amostras	32
2.2 Extração e purificação das amostras	34
2.3 Condições cromatográficas	35
2.4 Identificação e quantificação	36
2.5 Controle de qualidade	36
2.6 Analitos investigados	37
2.7 Interpretação dos dados	38
2.8 Análises estatísticas	38
3. Resultados	41
4. Discussão	49
4.1 Uso de biópsias e o baixo percentual lipídico	49
4.2 A contaminação por compostos organoclorados em golfinhos da Amazônia	50
4.3 DDTs/PCBs, DDT/DDE, α -clordano/ γ -clordano, α -HCH/ β -HCH/ γ -HCH	54
Referencias	56
Anexos	63

1. INTRODUÇÃO

A expansão desordenada da civilização humana, bem como seu consumo massivo, trouxe consigo o conseqüente aumento dos índices de contaminação ambiental, nas mais diversas regiões do planeta (GRISOLIA, 2005). Por sua vez, os compostos organoclorados representam uma das principais fontes potenciais de contaminação de ambientes e organismos aquáticos (BERTI; DUSMAN; SOARES, 2009).

Embora agrotóxicos organoclorados tenham seu uso, produção e comercialização regulamentados no Brasil desde a década de 80 por meio da Portaria Interministerial (MIC/MI/MME), nº 19, de 29/01/1981, seu uso indiscriminado desde a década de 40 representa sérios riscos à saúde do ambiente e organismos até os dias de hoje (BRASIL, 1985). Características como persistência ambiental, alto teor de toxicidade e elevado potencial de biomagnificação, conferem a tais poluentes um caráter de grande e forte ameaça (LeBLANC, 1997). Durante muitos anos, inseticidas organoclorados foram amplamente utilizados na agricultura em todo o Brasil e no combate a vetores de doenças na região Norte, mantendo ecossistemas e organismos expostos à contaminação (TORRES et al., 2009). Com características como o alto teor de lipofilicidade, os PCBs (do inglês *polychlorinated biphenyl compounds*) e DDTs (sigla de *diclorodifeniltricloroetano*) se acumulam facilmente em organismos através de tecidos com altos índices de gordura, como no caso do *blubber*: camada subcutânea densa, caracteristicamente gordurosa, encontrada especialmente nos cetáceos, sirênios e pinípedes (VETTER et al., 1996). Mamíferos aquáticos ocupam o topo da cadeia alimentar e, portanto, são susceptíveis à contaminação por compostos organoclorados [1–3].

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 *Os poluentes no mundo*

Após sua criação durante a Primeira Guerra Mundial, a produção de poluentes pela indústria química ganhou força em 1926, no início da Segunda Guerra Mundial com a formação do consórcio industrial IG Farben (abreviatura de Interessen-Gemeinschaft Farbenindustrie AG - associação de interesses indústria de tintas SA)[4].

Formado pela fusão de inúmeras indústrias alemãs em resposta à derrota do país na Primeira Guerra Mundial e à perda da posição dominante no mercado econômico, o consórcio IG Farben foi o maior doador da campanha eleitoral de Adolph Hitler. Detentora de um monopólio quase que total da produção química na Alemanha nazista, o consórcio atingiu no seu auge a posição de quarta maior empresa do mundo com previsões de produção de trezentas mil toneladas/ano apenas para a ampliação da produção em Leuna – Alemanha (BROWN, 1979). Subsidiando as ações das forças armadas alemãs, à medida que as tropas nazistas conquistavam territórios vizinhos, o IG Farben assumia sistematicamente as indústrias desses países, disseminando seus compostos químicos por onde passaram (BROWN, 1979).

Apoiado pelo regime nazista e composto por empresas como Bayer, Basf, Hoechst (hoje Aventis), AGFA, Casella, Huels, Kalle e outras menores, o consórcio IG Farben produziu uma vasta gama de produtos químicos, como corantes, produtos farmacêuticos, materiais fotográficos, explosivos, combustíveis sintéticos, amplamente utilizados nas ações do Regime (Figura 1), inclusive para testes em humanos nos campos de extermínio [4,5].

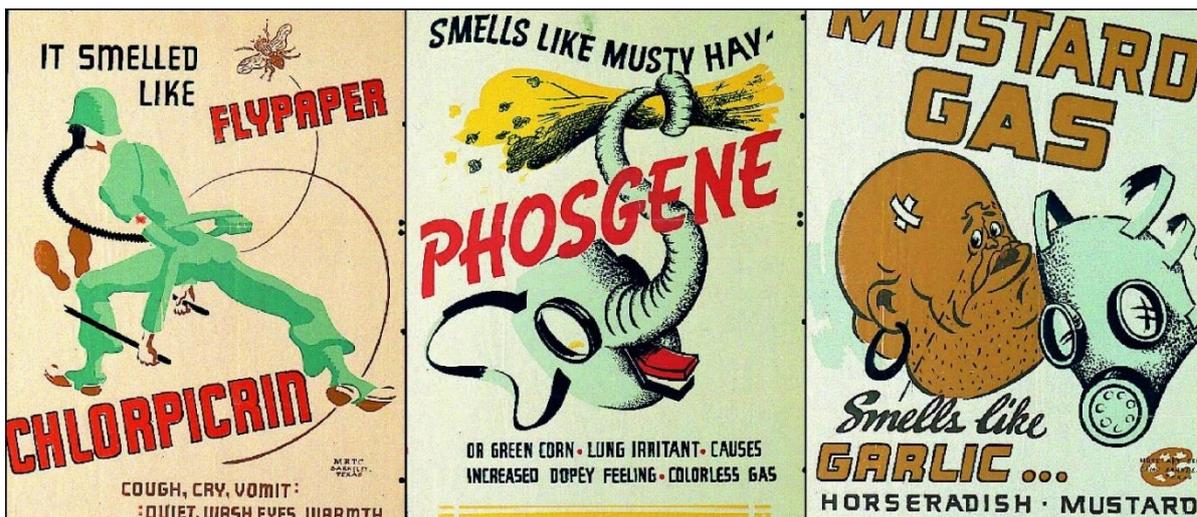


Figura 1. Exemplos de armas químicas amplamente utilizadas durante a Primeira e Segunda Guerra Mundial. Cartazes divulgados pelo exército americano durante a Segunda Guerra Mundial.

Entre os compostos químicos amplamente utilizados, estava o Zyklon B produzido pela Bayer, um pesticida a base de ácido cianídrico, cloro e nitrogênio, inicialmente empregado no combate a piolhos e a tifo (Figura 2). Contudo, tão logo percebido sua letalidade quando inalado, o Zyklon B foi destinado ao extermínio em massa através das câmaras de gás nos campos de concentração [6].

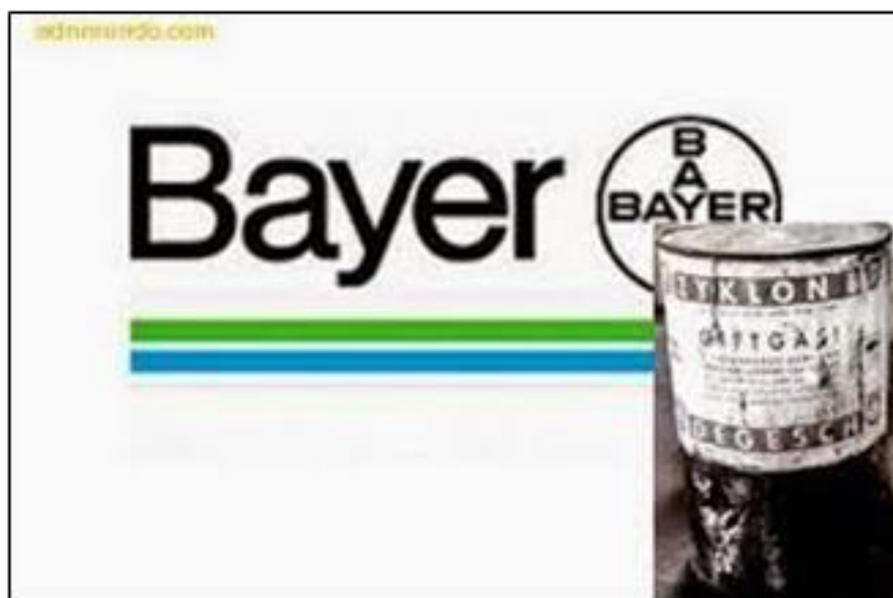


Figura 2. Zyklon B, composto químico fabricado pela Bayer durante a Segunda Guerra Mundial.

As três principais empresas, chamadas de “empresas filhas” do consórcio IG Farben: Bayer, Basf e Hoechst (Aventis) não só resistem até os dias de hoje, como são, cada uma delas, vinte vezes maiores do que o próprio consórcio IG Farben foi no seu auge em 1944 no regime nazista [7].

Com o fim da Segunda Guerra Mundial e a queda do regime, os produtos químicos outrora utilizados como armas químicas foram destinados ao controle de pragas como defensivos agrícolas e em campanhas de saúde pública, disseminados por todo o mundo [8].

2.2. Compostos Organoclorados

Não encontrados de forma natural no ambiente, os compostos organoclorados são hidrocarbonetos clorados sintetizados pelo homem, divergindo de outros compostos pelo seu alto peso molecular. Entre tais compostos estão inseticidas organoclorados (ex: DDTs) e bifenilas policloradas (PCBs) que portam características como a alta capacidade poluidora e cumulativa do ambiente e biota atingida (CLARK, 1992).

Compostos como DDTs e PCBs possuem alta toxicidade e são classificados como Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs), cujas principais características são a persistência ambiental, elevado potencial de bioacumulação (com posterior biomagnificação na cadeia trófica) e o alto teor de toxicidade (LeBLANC, 1997). Uma vez no ambiente, os POPs são facilmente absorvidos por organismos aquáticos através da alimentação, respiração ou pele, com posterior carreamento pelo sangue até tecidos de maiores concentrações lipídicas (EVANS; HINDELL; HINCE, 2004).

Embora pesticidas organoclorados tenham tido seu uso proibido pelo Ministério da Agricultura (Portaria 329, setembro de 1985) para atividades agrícolas, apenas em 1998 sua proibição foi aplicada ao uso em campanhas de saúde pública (MA, 1985; OLIVEIRA FILHO, 1997). Dessa forma, considerando a persistência ambiental desses compostos é de se esperar que espécies da fauna Amazônica apresentem contaminação por tais poluentes, principalmente animais que ocupam o topo da cadeia alimentar, a exemplo o boto-vermelho (*Inia geoffrensis*), espécie de cetáceo amplamente distribuída pela região.

2.3 Os Cetáceos

Cetáceos são mamíferos aquáticos placentários, agrupados na Ordem Cetartiodactyla (LUSSEAU, 2003; AGNARSSON; MAY-COLLADO, 2008; ZHOU et al., 2011) e representados pelos botos, baleias e golfinhos. São considerados os animais mais bem adaptados ao ambiente aquático em função de modificações morfológicas para a vida na água (WERTH, 2007; REIDENBERG, 2007). Com aproximadamente 90 espécies, sendo uma espécie de boto fluvial extinta e outra recém-descoberta em território brasileiro (HRBEK et al., 2014), os cetáceos são encontrados em todos os oceanos, alguns mares e bacias fluviais da Ásia e América do Sul (LODI & BOROBIA, 2013). Das espécies viventes, quatro habitam sistemas fluviais da América do Sul, como *Sotalia fluviatilis* e *Inia geoffrensis*, nos principais rios da bacia Amazônica e Orinoco (BEST; DA SILVA, 1989a;1989b; DA SILVA; GOLDING; BARTHEN, 2008), *Inia boliviensis* na Bolívia, alto e médio rio Madeira (ALLIAGA-ROSSEL, 2006; GRAVENA, 2013) e *Inia araguaiensis* na bacia Tocantins-Araguaia (HRBEK et al., 2014).

Os cetáceos fluviais são fortemente ameaçados por ações antropogênicas, tais como a pesca, a caça direcionada, o turismo desordenado, a fragmentação por hidrelétricas, a poluição

e degradação de seus habitats, etc. Esses animais são suscetíveis à contaminação por serem predadores de topo nos níveis tróficos, além de possuir um ciclo de vida relativamente longo e elevadas reservas de gordura (BECKER, 2000). Em estudos anteriores com alguns poucos indivíduos de *Inia geoffrensis* no Amazonas, foram encontrados índices preocupantes de contaminação por organoclorados e metais pesados (LAILSON-BRITO Jr et al., 2008; TORRES et al., 2009).

2.4 O gênero *Inia*: histórico

No ano de 1790 um exemplar do golfinho amazônico coletado pelo naturalista português Alexandre Rodríguez Ferreira nas mediações dos rios Negro e Amazonas, foi levado ao Museu da Ajuda, em Lisboa – Portugal [9,10]. Posteriormente, o então líder político e militar Napoleão Bonaparte deu ordens ao naturalista Étienne Geoffroy que vasculhasse o museu português em busca de exemplares de valor científico durante a invasão francesa [11]. Entre as peças encontradas, estava um crânio e fragmentos de pele de um exemplar do golfinho fluvial amazônico, considerado por Geoffroy uma raridade, já que naquela época a única espécie de golfinho fluvial conhecida pela ciência era o golfinho do Ganges (*Platanista gangetica*). Posteriormente, o exemplar Sulamericano foi superficialmente analisado por Georges Cuvier, que erroneamente o associou ao parente Asiático [10]. Já no ano de 1817, em Paris, o zoólogo e anatomista francês Henri Marie Ducrotay de Blainville descreveu com maior atenção a espécie dando a ela o nome *Delphinus geoffrensis*, atribuindo o epíteto específico ao naturalista que resgatou o exemplar do museu português [11]. Em 1826, Henri de Blainville enviou o naturalista Alcides Dessalines d’Orbigny ao continente Sulamericano a fim de encontrar mais exemplares da espécie. D’Orbigny ao se deparar com outros espécimes do golfinho amazônico

acreditou se tratar de uma espécie distinta daquela depositada no museu francês, ao qual deu o nome de *Inia boliviensis*, fazendo menção do primeiro nome aos índios Guarayos que atribuíam o termo a tais golfinhos na Bolívia [9–11]. Dessa forma, o nome indígena foi mantido para o gênero, nomeando *Inia boliviensis* a espécie encontrada na Bolívia e regiões fronteiriças, fazendo deste o espécie-tipo [9]. Anos depois, John Edward Gray recombinau o nome criado por de Blainville para *Inia geoffroyii* (GRAY, 1846). Porém, em 1855 Paul Gervais se deu conta de que *D. geoffrensis*, *I. geoffroyii* e um terceiro exemplar, capturado pelo naturalista alemão Johann Baptiste von Spix, denominado de *Delphinus amazonicus* se tratavam da mesma espécie, combinando os nomes e estabelecendo a denominação *Inia geoffrensis* para golfinho encontrado na Amazônia Central [12,13].

A indefinição entre as espécies *Inia geoffrensis* e *Inia boliviensis* perdurou por mais de um século, até então a expedição de Giorgio Pilleri, que capturando mais de uma dezena desse golfinho pode apoiar a teoria de d’Orbigny e sustentar *Inia boliviensis* como uma espécie diversa de *Inia geoffrensis* [10].

2.5 Classificação atual

A classificação mais comumente utilizada até os dias de hoje para o gênero *Inia* é baseada em diagnósticos morfológicos, sendo o gênero considerado monotípico com a existência de três subespécies: *Inia geoffrensis geoffrensis*, para indivíduos distribuídos pela Amazônia brasileira, Peru e Equador; *Inia geoffrensis humboldtiana*, para as populações da bacia do Orinoco, na Venezuela e Colômbia; e ainda *Inia geoffrensis boliviensis*, para os animais do alto rio Madeira e Bolívia (BEST; DA SILVA, 1989a, 1993; DA SILVA, 1994; GRABERT, 1984; TREBBAU; BREE, 1974). Porém, estudos sugerem através de medidas morfométricas que *I. g. geoffrensis* e *I. g. humboldtiana* não podem ser diferenciadas em função

da parafilia existente em relação as populações do Orinoco às da Amazônia, além de não haver embasamento molecular para a sustentação de *I. g. humboldtiana* [17,18].

Uma segunda linha de pesquisa, baseada na combinação de análises morfológicas e moleculares, sugere a manutenção de duas espécies: *Inia boliviensis* e *Inia geoffrensis*, sendo essa última representada por duas subespécies: *Inia geoffrensis geoffrensis*, para os indivíduos da Amazônia Central; e *Inia geoffrensis humboldtiana* para aqueles ocorrentes na bacia do Orinoco (PILLERI; GIHR, 1977). Porém, alguns autores consideram as diferenças taxonômicas insuficientes para divisão do gênero em duas espécies, alertando para a possibilidade de apenas uma variação clinal [20]. Por outro lado, autores defendem a ascensão de *I. g. boliviensis* ao nível de espécie, indicando divergências genéticas [21], além da existência de Unidades Evolutivamente Significativas (ESUs) nas populações bolivianas, considerando-a uma espécie distinta das subespécies *I. g. geoffrensis* e *I. g. humboldtiana* [22], como sugere Da Silva (1994) com base na morfometria craniana de alguns poucos indivíduos. Recentemente, estudos genéticos têm solucionado incertezas taxonômicas sobre o gênero. Utilizando-se de genes mitocondriais e nucleares, Gravena et al. (2014) confirmaram a divergência entre os indivíduos da Amazônia Central e os do alto Madeira e regiões fronteiriças entre Brasil e Bolívia, reforçando a manutenção da espécie *I. boliviensis*. Do mesmo modo, Hrbek et al. (2014) identificou grande diferenciação genética e na morfologia do crânio da espécie encontrada na bacia Tocantins-Araguaia, região central do Brasil, atribuindo a estes indivíduos o nome *Inia araguaiaensis* e ampliando o número de espécies do gênero para três.

Desse modo, alguns autores optam por manter a combinação taxonômica de *Inia boliviensis* como uma espécie distinta das demais [25], enquanto que outros preferem a manutenção da subdivisão da espécie monotípica [26]. O presente estudo adotará a classificação

do gênero *Inia* de acordo com Pilleri e Gehr (1977), assumindo a espécie *Inia geoffrensis* para os indivíduos encontrados em território brasileiro, com exceção do alto Madeira e regiões fronteiriças entre Brasil e Bolívia e bacia Tocantins-Araguaia.

De acordo com a taxonomia atual, a classificação do golfinho amazônico *Inia geoffrensis* (de Blainville, 1817) é apresentada a seguir:

DOMÍNIO: Eukariota
REINO: Animalia
Subreino: Metazoa
FILO: Chordata
Subfilo: Gnathostomata
CLASSE: Mammalia
Subclasse: Theria
ORDEM: Artiodactyla
Superordem: Eparctocyonia
Clado: Cetartiodactyla
Subordem: Odontoceti
FAMÍLIA: Iniidae
Superfamília: Platanistoidea
GÊNERO: *Inia*
ESPÉCIE: *Inia geoffrensis*

[27]

2.6 Biologia

O boto é o maior dos golfinhos fluviais e os machos adultos são maiores em tamanho e robustez que as fêmeas, podendo atingir 2,55 m de comprimento e pesar até 215 kg. Já as fêmeas, um pouco menores, alcançam em média 2,25m em seu comprimento total e pesam aproximadamente 155 kg [28]. Apresenta nadadeiras largas e triangulares, e um corpo roliço com moderado afilamento na região posterior que limita ao animal mobilidade nos movimentos [10]. Graças ao não fusão das duas primeiras vértebras cervicais (atlas e axis), é

garantido ao boto grande flexibilidade, o que lhe permite adentrar as florestas de igapó com facilidade e mover o pescoço para todas as direções [29]. Possuem olhos pequenos e um rosto longo, podendo apresentar vibrissas nessa região, uma espécie de pelo com funções sensoriais [16]. O melão, órgão de grande concentração lipídica integrante do complexo sistema de ecolocalização, é bulboso e de formato variado devido às contrações musculares exercidas pelos animais [16]. A nadadeira dorsal é baixa em formato de quilha, conferindo ao boto característica peculiar e servindo como caractere diagnóstico em observações *in situ* [30].

A maturidade sexual é atingida nas fêmeas quando as mesmas alcançam cerca de 170-180 cm, enquanto que nos machos essa relação é variável [11]. O tempo de gestação ocorre em torno de 11 meses e fêmeas podem apresentar prenhez e gestação ao mesmo tempo, podendo a lactação durar mais de dois anos [11].

2.7 Distribuição

A distribuição dos golfinhos do gênero *Inia* é considerada ampla quando comparada com outros golfinhos fluviais [30]. Endêmico dos sistemas fluviais da América do Sul, o boto é encontrado nos principais rios das bacias Amazônica e do Orinoco, em países como Brasil, Colômbia, Venezuela, Peru, Bolívia, Equador e Guiana [9,12,13,16,30], atingindo aproximadamente 7 milhões de km² [31].

Encontrado nas principais bacias do território brasileiro como a do Amazonas e Tocantins-Araguaia, região Norte do Brasil, *I. geoffrensis* está presente também em seus principais afluentes contabilizando mais de 40 rios com registros da espécie [16]. Porém, autores ressaltam que a distribuição do gênero *Inia* é conhecida de uma forma generalista,

baseada em registros oportunistas e carente de informações [32]. Pode-se atribuir esse fato a escassez ou ausência de esforços amostrais nas mais remotas áreas da distribuição da espécie [32](Da Silva & Martin, 2010).

2.8 Status de conservação e ameaças à espécie

No Brasil, 16 espécies de cetáceos foram protegidas inicialmente em 1986 pela portaria da extinta Superintendência do Desenvolvimento da Pesca (SUDEPE), posteriormente estendida na forma de Lei Federal nº 7.643 em 18 de dezembro de 1987, que garantiu o fim do comércio baleeiro proibindo “qualquer tipo de molestamento intencional de cetáceos em águas jurisdicionais brasileiras” [29].

Atualmente existem no Brasil cerca de 24 regulamentações entre leis, decretos, portarias e instruções normativas distribuídas por instâncias federais, estaduais, municipais e distritais que objetivam a garantia de proteção e conservação de cetáceos em território brasileiro [29].

As leis federais dispõem sobre proteção à fauna, proibição da pesca de cetáceos, estipulação de penalidades sobre danos à fauna e a instituição de Unidades de Conservação para proteção da biodiversidade em consideradas áreas prioritárias [29]. Outros regimentos no âmbito regional declaram algumas espécies de cetáceos como Patrimônio Natural de municípios brasileiros, regulamentam o turismo de observação de cetáceos e a delimitação do uso de transportes náuticos potenciais causadores de molestamento, criação de Áreas de Proteção Ambiental (APAs) e santuários de baleias e golfinhos em águas jurisdicionais brasileiras, entre outros [29]. Entre as leis que regem a proteção às espécies fluviais além das genéricas, está a portaria “Nº47 do ICMBio (09 de abril de 2012), em seu artigo 1º onde estabelece normas para o ordenamento da visitação do Parque Nacional de Anavilhanas até a

publicação do seu Plano de Manejo, vedando aos visitantes a alimentação artificial aos botos (*I. geoffrensis*)”.

Embora o Brasil tenha avançado nas últimas décadas em relação às legislações de proteção aos cetáceos, práticas antropogênicas têm levado centenas de golfinhos à morte todo ano na Amazônia [33]. Especialmente aos golfinhos fluviais ou ainda, mais especificamente ao boto-vermelho, situações como a poluição dos corpos hídricos pela prática do garimpo e o uso histórico desordenado de pesticidas agrícolas, superstições que envolvem o uso de derivados desse animal, a captura incidental em redes de pesca ou ainda intencional para a pesca da piracatinga ou mota (*Calophysus macropterus*), bem como as alterações nos regimes fluviais devido à fragmentação de habitats ocasionados por hidrelétricas, compõem as principais ameaças à espécie [10,32].

Resultados de monitoramentos das populações de boto-vermelho na Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá apontam uma redução de cerca de 10% ao ano no número de botos que frequentam a reserva desde o ano 2000 [34]. Porém, informações como essas, assim como outras também importantes, não se estendem às demais áreas de sua distribuição [32].

Dessa forma, o boto ou golfinho-da-amazonia (*Inia geoffrensis*) foi classificado pela União para a Conservação da Natureza (IUCN) como dados insuficientes (Data Deficient), devido principalmente à ausência de informações ou limitação das informações disponíveis sobre densidade, abundância e impactos das ameaças sobre essas populações (IUCN, 2014). Além disso, a espécie foi incluída nos apêndices II da CITES (Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção) e CMS (Convenção sobre a Conservação das Espécies Migratórias Pertencentes à Fauna Selvagem).

BIBLIOGRAFIA

AGNARSSON, Ingi; MAY-COLLADO, Laura J. The phylogeny of Cetartiodactyla: The importance of dense taxon sampling, missing data, and the remarkable promise of cytochrome-b to provide reliable species-level phylogenies. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 48, n. 3, p. 964-985, 2008.

ALIAGA-ROsSEL, Enzo. Distribution and encounter rates of the river dolphin (*Inia geoffrensis boliviensis*) in the central Bolivian Amazon. *J. Cetacean Res. Manage.* 8(1):87–92, 2006.

1. Minh TB, Watanabe M, Nakata H, Tanabe S, Jefferson TA. Contamination by persistent organochlorines in small cetaceans from Hong Kong coastal waters. *Mar Pollut Bull.* 1999;39: 383–392. doi:10.1016/S0025-326X(99)00066-1
2. Kajiwara N, Matsuoka S, Iwata H, Tanabe S, Rosas FCW, Fillmann G, et al. Contamination by Persistent Organochlorines in Cetaceans Incidentally Caught Along Brazilian Coastal Waters. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2004;46: 124–134. doi:10.1007/s00244-003-2239-y
3. Tanabe S, Mori T, Tatsukawa R, Miyazaki N. Global pollution of marine mammals by PCBs, DDTs and HCHs (BHCs). *Chemosphere.* 1983;12: 1269–1275. doi:10.1016/0045-6535(83)90132-7
4. Carneiro FF, Lia Giraldo da Silva Augusto, Friedrich RMRK, Campos A, Búriço. Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Carneiro FF, organizador. Rio de Janeiro; 2015.
5. Taylor Telford. *Sword and swastika: the Wehrmacht in the Third Reich.* Gollancz, 1953. 1952.
6. PITA R. *Armas químicas: La ciencia en manos del mal.* Madrid: Pl. 2008.
7. Augusto LG da S, Carneiro FF, Pignati WA, Rigotto RM, Friedrich K, Faria NMX, et al. SAÚDE, AMBIENTE E SUSTENTABILIDADE. Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Rio de Janeiro; 2015. p. 624.
8. Carneiro FF, Pignati WA, Rigotto RM, Augusto LG da S, Pinheiro AR de O, Faria NMX, et al. SEGURANÇA ALIMENTAR E NUTRICIONAL E SAÚDE. Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Rio de Janeiro; 2015. p. 624.
9. Best R, Da Silva VMF. Biology, status and conservation of *inía geoffrensis* in the Amazon and Orinoco river basins. *Occas Pap IUCN SSC 3 (Biology Conserv River Dolphins).* 1989; 23–34.
10. Bastida R, Secchi E, da Silva VMF. *Mamíferos acuáticos de Sudamérica y Antártida.* Buenos Aires: Vázquez Mazzini; 2007.

11. Da Silva VMF, Golding M, Barthem RB. Golfinhos da Amazônia. Manaus: INPA; 2008.
12. Best RC, Da Silva MF. Amazon river dolphin, Boto *Inia geoffrensis* (de Blainville, 1817). In: Harrison SHR and RJ, organizador. Handbook of Marine Mammals. River Dolp. London: Academic Press, London; 1989. p. 1–23.
13. Best R, da Silva VMF. Mammalian Species: *Inia geoffrensis*. Am Soc Mammal. 1993;426: 1–8.
14. Trebbau P, Bree JH van. Notes concerning the freshwater dolphin *Inia geoffrensis* (de Blainville, 1817). in Venezuela Zeitschrift des Saugetierk 39. 1974. p. 50– 57.
15. Grabert H. Migrações e especiação dos Iniidae da America do Sul (Cetacea, Mammalia). Geogr 9. 1984; 145–154.
16. da Silva VMF. Aspects of the biology of the Amazonian dolphins genus *Inia geoffrensis* and *Sotalia fluviatilis*. University of Cambridge, Cambridge. England. 1994.
17. Ruiz-Garcia M. SCMM-AJMS. Molecular Differentiation among *Inia geoffrensis* and *Inia boliviensis* (Iniidae, Cetacea) by Means of Nuclear Intron Sequences. Popul Genet Res Prog. 2008;6: 1– 29.
18. Castellanos-Mora L, Trujillo F, Ruíz-García M. Morphometric skull analyses in pink river dolphins (*Inia* sp.): Congruent results with molecular and body morphometrics. XXVII Congresso Brasileiro de Zoologia. Curitiba; 2008. p. 17–21.
19. Pilleri G, M. Gühr. Observations on the Bolivian, *Inia boliviensis*, (D’Orbigny, 1834) and the Amazonian bufeo, *Inia geoffrensis* (Blainville, 1817), with a description of a new subspecies (*Inia geoffrensis humboldtiana*). Invest Cetacea 8. 1977; 11–76.
20. Casinos A, Ocaña J. A craniometrical study of the genus *Inia d’orbigny*, 1834 (Cetacea, Platanistidae). Saugetierkundliche Mitteilungen. 1979;27: 197–206.
21. Hamilton H, Caballero S, Collins AG, Jr RLB. Evolution of river dolphins. 2001; doi:10.1098/rspb.2000.1385
22. Banguera-Hinestroza E. Molecular Identification of Evolutionarily Significant Units in the Amazon River Dolphin *Inia* sp. (Cetacea: Iniidae). J Hered. 2002;93: 312–322. doi:10.1093/jhered/93.5.312
23. Gravena W, Farias IP, da Silva MNF, da Silva VMF, Hrbek T. Looking to the past and the future: were the Madeira River rapids a geographical barrier to the boto (Cetacea: Iniidae)? Conserv Genet. 2014;15: 619–629. doi:10.1007/s10592-014-0565-4
24. Hrbek T, da Silva VMF, Dutra N, Gravena W, Martin AR, Farias IP. A New Species of River Dolphin from Brazil or: How Little Do We Know Our Biodiversity. Turvey ST, organizador. PLoS One. 2014;9: e83623. doi:10.1371/journal.pone.0083623

25. Nowak RM. Walker's mammals of the world. Johns Hopkins Univ Press Balt MD. 1999;
26. Rice DW. Marine mammals of the world. Systematics and distribution. Soc Mar Mammal. 1998;
27. Simpson G. The principles of classification and a classification of mammals. Bulletin of the American Museum of Natural History. 1945.
28. Martin AR, Da Silva VMF. SEXUAL DIMORPHISM AND BODY SCARRING IN THE BOTO (AMAZON RIVER DOLPHIN) *INIA GEOFFRENSIS*. Mar Mammal Sci. 2006;22: 25–33. doi:10.1111/j.1748-7692.2006.00003.x
29. LODI, Liliane; BOROBIA M. Baleias, botos e golfinhos do Brasil: guia de identificação. 1ª edição. Rio de Janeiro: Technical Books; 2013.
30. Trujillo F. HABITAT USE AND SOCIAL BEHAVIOUR OF THE FRESHWATER DOLPHIN *Inia geoffrensis* (DE BLAINVILLE 1817) IN THE AMAZON AND ORINOCO BASINS. University of Aberdeen, Scotland. 2000.
31. Nordin CF, Meade RH. The Amazon and the Orinoco. McGraw-Hill Yearbook of Science and Technology. McGraw-Hil. 1986. p. 385–391.
32. da Silva VMF, Martin AR. Status, threats, conservation initiatives and possible solutions for *Inia geoffrensis* and *Sotalia fluviatilis* in Brazil. In: Trujillo F, Crespo E, Damme P Van, Usma S, organizadores. The Action Plan for South American rivers dolphins 2010-2020. Bogotá - Colombia: WWF, Fundación OMACHA, WDS, WDSC; 2010. p. 249.
33. Loch C, Marmontel M, Simões-Lopes PC. Conflicts with fisheries and intentional killing of freshwater dolphins (Cetacea: Odontoceti) in the Western Brazilian Amazon. Biodivers Conserv. 2009;18: 3979–3988. doi:10.1007/s10531-009-9693-4
34. da Silva VMF, Martin AR. Impact of human activities upon two species of dolphins. in Amazon flooded forest, Brazil. Cape Town, South Africa: 17th Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals; 2007.
35. Turvey ST, Pitman RL, Taylor BL, Barlow J, Akamatsu T, Barrett LA, et al. First human-caused extinction of a cetacean species ? 2007; 537–540. doi:10.1098/rsbl.2007.0292
36. Mead JG, Brownell RL. Order Cetacea. In: Wilson, Don E. and DMR, organizador. Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference. 2005. p. 723–743.
37. Banguera-Hinestroza E, Cardenas H, Ruiz-Garcia M, Marmontel M, Gaitan E, Vazquez R, et al. Genetic differentiation in populations of the river dolphins genus *Inia* (Blainville, 1817) and apports to the taxonomic status with molecular analysis. Rev la Acad Colomb Ciencias Exactas Fis y Nat. 2003;26: 575–588.
38. da Silva V. Boto-cor-de-rosa. Plano de Ação nacional para a conservação dos Mamíferos Aquáticos - Pequenos Cetáceos. IcmBio, 20. Brasília; 2011. p. 17–20.

39. Reeves RR, Jefferson TA, Karczmarski L, Laidre K, O'Corry-Crowe G, Rojas-Bracho L, et al. *Inia geoffrensis*. In: The IUCN Red List of Threatened Species 2013: e.T10831A3220342. 2013. doi:<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2011-1.RLTS.T10831A3220342.e>.
40. Borrell A. PCB and DDT in blubber of cetaceans from the northeastern north Atlantic. *Mar Pollut Bull.* 1993;26: 146–151. doi:10.1016/0025-326X(93)90125-4
41. Yogui GT. Ocorrência de compostos organoclorados (pesticidas e PCBs) em mamíferos marinhos da costa de São Paulo (Brasil) e da Ilha Rei George (Antártica). 2002;
42. Evans K, Hindell M, Hince G. Concentrations of organochlorines in sperm whales (*Physeter macrocephalus*) from Southern Australian waters. 2004;48: 486–503. doi:10.1016/j.marpolbul.2003.08.026
43. Dallaire R, Dewailly É, Ayotte P, Forget-Dubois N, Jacobson SW, Jacobson JL, et al. Exposure to organochlorines and mercury through fish and marine mammal consumption: Associations with growth and duration of gestation among Inuit newborns. *Environ Int.* Elsevier Ltd; 2013;54: 85–91. doi:10.1016/j.envint.2013.01.013
44. Santos-Neto EB, Azevedo-Silva CE, Bisi TL, Santos J, Meirelles ACO, Carvalho VL, et al. Organochlorine concentrations (PCBs, DDTs, HCHs, HCB and MIREX) in delphinids stranded at the northeastern Brazil. *Sci Total Environ.* Elsevier B.V.; 2014;472: 194–203. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.10.117
45. Balmer BC, Ylitalo GM, McGeorge LE, Baugh KL, Boyd D, Mullin KD, et al. Persistent organic pollutants (POPs) in blubber of common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) along the northern Gulf of Mexico coast, USA. *Sci Total Environ.* Elsevier B.V.; 2015;527-528: 306–312. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.05.016
46. Becker PR. Concentration of Chlorinated Hydrocarbons and Heavy Metals in Alaska Arctic Marine Mammals. 2000;40: 819–829.
47. Houde M, Hoekstra PF, Solomon KR, Muir DCG. Organohalogen contaminants in delphinoid cetaceans. *Rev Environ Contam Toxicol.* 2005;184: 1–57. doi:10.1007/0-387-27565-7_1
48. Yordy JE, Pabst DA, Mclellan WA, Wells RS, Rowles TK, Kucklickz JR. Tissue-specific distribution and whole-body burden estimates of persistent organic pollutants in the bottlenose dolphin (*tursiops truncatus*). *Environ Toxicol Chem.* 2010;29: 1263–1273. doi:10.1002/etc.152
49. Stephanie Mossner KB. MARINE MAMMALS AS GLOBAL POLLUTION INDICATORS FOR ORGANOCHLORINES. *Chemosphere.* 1997;34: 1285–1296.
50. Miranda AL, Roche H, Randi MAF, Menezes ML, Ribeiro CAO. Bioaccumulation of chlorinated pesticides and PCBs in the tropical freshwater fish *Hoplias malabaricus*: Histopathological, physiological, and immunological findings. *Environ Int.* 2008;34:

939–949. doi:10.1016/j.envint.2008.02.004

51. Fernandez-Alvarez M, Llompart M, Lamas JP, Lores M, Garcia-Jares C, Cela R, et al. Simultaneous determination of traces of pyrethroids, organochlorines and other main plant protection agents in agricultural soils by headspace solid-phase microextraction–gas chromatography. *J Chromatogr A*. 2008;1188: 154–163. doi:10.1016/j.chroma.2008.02.080
52. Oga S. Fundamentos de toxicologia. 2.ed. ed. São Paulo: Atheneu; 2003.
53. Tanabe S. Contamination and toxic effects of persistent endocrine disrupters in marine mammals and birds. *Mar Pollut Bull*. 2002;45: 69–77. doi:10.1016/S0025-326X(02)00175-3
54. Tanabe S, Iwata H, Tatsukawa R. Global contamination by persistent organochlorines and their ecotoxicological impact on marine mammals. *Sci Total Environ*. 1994;154: 163–177. doi:10.1016/0048-9697(94)90086-8
55. Cipro CVZ, Yogui GT, Bustamante P, Taniguchi S, Sericano JL, Montone RC. Organic pollutants and their correlation with stable isotopes in vegetation from King George Island, Antarctica. *Chemosphere*. Elsevier Ltd; 2011;85: 393–398. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.07.047
56. Godduhn A, Duffy LK. Multi-generation health risks of persistent organic pollution in the far north: use of the precautionary approach in the Stockholm Convention. *Environ Sci Policy*. 2003;6: 341–353. doi:10.1016/S1462-9011(03)00061-3
57. Hardy C, Maguire S. Discourse, field-configuring events, and change in organizations and institutional fields: Narratives of DDT and the Stockholm convention. *Acad Manag J*. 2010;53: 1365–1392. doi:10.5465/AMJ.2010.57318384
58. D’Amato C, Torres JPM, Malm O. DDT (dicloro difenil tricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental - uma revisão. *Quim Nova*. 2002;25: 995–1002. doi:10.1590/S0100-40422002000600017
59. Flores AV, Ribeiro JN, Neves AA, Queiroz ELR de. Organoclorados: um problema de saúde pública. *Ambient Soc*. 2004;7. doi:10.1590/S1414-753X2004000200007
60. Coura JR, Suárez-Mutis M, Ladeia-Andrade S. A new challenge for malaria control in Brazil: asymptomatic Plasmodium infection - a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101. doi:10.1590/S0074-02762006000300001
61. Rita de Cássia B. Barata. Malaria in Brazil: Trends in the Last Ten Years. *Cad Saúde Pública*, Rio Janeiro. 1995;11 (1): 128–136.
62. SINGER BH, CASTRO MC. Agricultural Colonization and Malaria on the Amazon Frontier. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;954: 184–222. doi:10.1111/j.1749-6632.2001.tb02753.x

63. GILBERTO HOCHMAN. From Autonomy to Partial Alignment: National Malaria Programs in the Time of Global Eradication, Brazil, 1941-1961. CBMH/BCHM. 2008;Volume 25: p. 161–192.
64. Griffing SM, Tauil PL, Udhayakumar V, Silva-Flannery L. A historical perspective on malaria control in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110: 701–718. doi:10.1590/0074-02760150041
65. Zeidemann VK. O rio das águas negras. Florestas do rio Negro. 2001. p. 61–87.
66. Goulding, M., Barthem, R., Ferreira E. The Smithsonian atlas of the Amazon. Washington; 2003.
67. Por FD. River hydrology. The Pantanal of Mato Grosso (Brazil). Springer Netherlands; 1995. p. 19–22. doi:10.1007/978-94-011-0031-1_7
68. Robinson EM, Jia M, Trumble SJ, Usenko S. Selective pressurized liquid extraction technique for halogenated organic pollutants in marine mammal blubber: A lipid-rich matrix. *J Chromatogr A*. 2015;1385: 111–115. doi:10.1016/j.chroma.2015.01.064
69. Tanabe S. Contamination and toxic effects of persistent endocrine disruptors in marine mammals and birds. *Mar Pollut Bull*. 2002;45: 69–77. doi:10.1016/S0025-326X(02)00175-3
70. Ramu K, Kajiwara N, Tanabe S, Lam PKS, Jefferson TA. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and organochlorines in small cetaceans from Hong Kong waters: Levels, profiles and distribution. *Mar Pollut Bull*. 2005;51: 669–676. doi:10.1016/j.marpolbul.2005.02.041
71. Kajiwara N, Kamikawa S, Ramu K, Ueno D, Yamada TK, Subramanian A, et al. Geographical distribution of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and organochlorines in small cetaceans from Asian waters. *Chemosphere*. 2006;64: 287–295. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.12.013
72. Ellisor D, McLellan W, Koopman H, Schwacke L, McFee W, Kucklick J. The distribution and stratification of persistent organic pollutants and fatty acids in bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) blubber. *Sci Total Environ*. Elsevier B.V.; 2013;463-464: 581–588. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.06.017
73. Méndez-Fernandez P, Galluzzi Polesi P, Taniguchi S, de O. Santos MC, Montone RC. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Mar Pollut Bull*. 2016;107: 364–369. doi:10.1016/j.marpolbul.2016.04.021
74. Wu Y, Shi J, Zheng GJ, Li P, Liang B, Chen T, et al. Evaluation of organochlorine contamination in Indo-Pacific humpback dolphins (*Sousa chinensis*) from the Pearl River Estuary, China. *Sci Total Environ*. Elsevier B.V.; 2013;444: 423–429. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.11.110

75. Rheims CA, Brescovit AD, Paulo S. On the Amazonian species of the genus *Scytodes* Latreille Amazonian genus Latreille (Arachnida). *Ar.* 2004;21: 525–533.
76. Torres JPM, Lailson-Brito J, Saldanha GC, Dorneles P, Malm O, Bastos WR, et al. Persistent Toxic Substances in the Brazilian Amazon: Contamination of Man and the Environment. *J Braz Chem Soc.* 2009;20: 1175–1179.
77. Azeredo A, Torres JPM, de Freitas Fonseca M, Britto JL, Bastos WR, Azevedo e Silva CE, et al. DDT and its metabolites in breast milk from the Madeira River basin in the Amazon, Brazil. *Chemosphere.* 2008;73: 246–251. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.04.090
78. Kannan K, Tanabe S, Tatsukawa R, Sinha RK. Biodegradation capacity and residue pattern of organochlorines in Ganges river dolphins from India. *Toxicol Environ Chem.* 1994;42: 249–61. doi:10.1080/02772249409358010
79. Yordy JE, Pabst DA, McLellan WA, Wells RS, Rowles TK, Kucklick JR. Tissue-specific distribution and whole-body burden estimates of persistent organic pollutants in the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *Environ Toxicol Chem.* 2010; n/a–n/a. doi:10.1002/etc.152
80. Das K, Vossen A, Tolley K, Víkingsson G, Thron K, Müller G, et al. Interfollicular Fibrosis in the Thyroid of the Harbour Porpoise: An Endocrine Disruption? *Arch Environ Contam Toxicol.* 2006;51: 720–729. doi:10.1007/s00244-005-0098-4
81. Schnitzler JG, Siebert U, Jepson PD, Beineke A, Jauniaux T, Bouquegneau J-M, et al. HARBOR PORPOISE THYROIDS: HISTOLOGIC INVESTIGATIONS AND POTENTIAL INTERACTIONS WITH ENVIRONMENTAL FACTORS. *J Wildl Dis.* 2008;44: 888–901. doi:10.7589/0090-3558-44.4.888
82. Wu B-Z, Chen H-Y, Wang SJ, Wai CM, Liao W, Chiu K. Reductive dechlorination for remediation of polychlorinated biphenyls. *Chemosphere.* 2012;88: 757–768. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.03.056

ARTIGO

HERANÇA DE UM MUNDO ANTROPOGÊNICO: CONTAMINAÇÃO POR COMPOSTOS ORGANOCLORADOS EM GOLFINHO-DA-AMAZÔNIA (*INIA GEOFFRENSIS*)

Nathali Garcia Ristau^{1,2,3*}, Gilvan Takeshi Yogui⁴, Miriam Marmontel² and Ricardo Luvizotto Santos³

¹. Instituto Amares – Pesquisa e Conservação de Ecossistemas Aquáticos, São Luís, Maranhão, Brasil

². Grupo de Pesquisa em Mamíferos Aquáticos Amazônicos, Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, Tefé, Amazonas, Brasil

³. Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação – PPGBC, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Maranhão, Brasil

⁴. Laboratório de Compostos Orgânicos em Ecossistemas Costeiros e Marinhos (OrganoMAR), Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

*nathaliristau@yahoo.com.br

Palavras-chave: Boto, Rio Negro, Rio Branco, Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs), DDT, PCB, Ameaça, Conservação

Resumo:

Biopsias de golfinho -da-Amazônia *Inia geoffrensis* distribuídos pela bacia do rio Negro, um dos principais rios da Amazônia, foram realizadas para análises de contaminantes emergentes. Ao total, 24 amostras de *blubber* foram obtidas e submetidas à cromatografia gasosa para avaliação da contaminação em golfinhos-da-Amazônia. Pesticidas organoclorados são considerados poluentes orgânicos persistentes (POPs) pelo seu alto poder de contaminação e persistência ambiental e biomagnificação na biota atingida, especialmente em mamíferos aquáticos. Os resultados obtidos apontam a contaminação da espécie estudada, não indicando diferenças de contaminação por DDTs e PCBs entre machos e fêmeas (**Machos:** DDTs: 0,434; PCBs: 0,355 e mirex: 0,309 $\mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido; **Fêmeas:** DDTs: 0,374, PCBs: 0,313 e mirex: 0,303 $\mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido). Além de pesticidas organoclorados, 71 congêneres de bifelinlas policloradas foram detectadas nas amostras obtidas. *Inia geoffrensis* é classificado pela IUCN como ‘Data deficient’ e informações como essa auxiliarão na definição do estado de conservação da espécie e na construção de medidas mitigadoras dos impactos por pesticidas organoclorados na Amazônia.

1. INTRODUÇÃO

Apenas seis espécies de golfinhos fluviais habitam os continentes sulamericano e asiático. Uma delas, o golfinho-do-baiji (*Lipotes vexilifer*), foi considerada ecologicamente extinta e sua causa atribuída a ações antrópicas [35]. Golfinhos do gênero *Inia* são endêmicos do continente sulamericano e distribuem-se pelas bacias do Orinoco, Amazonas e Tocantins-Araguaia [9,12,16,24]. Apesar da classificação atual reconhecê-lo como um gênero monoespecífico [13,36], estudos genéticos têm apoiado sua diferenciação em pelo menos três espécies: *Inia geoffrensis*: Amazônia Central - Brasil, Colômbia e Venezuela; *Inia boliviensis*: alto rio Madeira - Brasil e Bolívia [23,37]; e *Inia araguaiaensis*: Brasil [24].

O mais conhecido dentre os golfinhos fluviais, o golfinho-da-Amazônia *I. geoffrensis* (de Blainville, 1817) ou boto como é regionalmente conhecido, possui ampla distribuição na Amazônia Central, com ocorrência registrada em mais de 40 rios da bacia Amazônica [38]. Considerado pela União Internacional para a Conservação da Natureza (UICN) como “deficientes em dados” pela quantidade limitada de informações disponíveis sobre ameaças, ecologia, números e tendências populacionais [39], a recente diferenciação da espécie distribuída pela bacia Tocantins-Araguaia demonstra o baixo conhecimento sobre a biodiversidade sulamericana e alerta para o risco iminente da perda de espécies antes mesmo de conhecê-las [24].

Golfinhos de rio estão entre os cetáceos mais ameaçados por ações antrópicas [35]. Estudos identificando a contaminação por organoclorados em cetáceos têm sido freqüentes e reportados em diversas partes do mundo (ex.: [40–45]). Suscetíveis à contaminação por ocuparem o topo nos níveis tróficos, um ciclo de vida relativamente longo e elevadas reservas de gordura [46–48], cetáceos são considerados biomonitores e sentinelas da qualidade ambiental [49].

Compostos organoclorados de alto peso molecular são considerados poluentes orgânicos persistentes (POPs), e representam uma grande ameaça ao ambiente aquático e biota associada [50]. Neles estão inclusos os pesticidas organoclorados (DDTs) e as bifenilas policloradas (PCBs), que foram amplamente utilizados em atividades agrícolas, processos industriais [51] e campanhas de saúde pública [52,53]. Compostos organoclorados atingem o

ambiente aquático por meio da lixiviação após sua disponibilização no ambiente [54], assim como processos de transporte atmosférico e circulação oceânica carregam PCBs e DDTs para áreas remotas e desabitadas como a Antártica, por exemplo [55]. Com características peculiares como persistência ambiental, bioacumulação (seguida de posterior biomagnificação), lipofilicidade e alta toxicidade [56], os compostos organoclorados uma vez no ambiente aquático são facilmente absorvidos pelos organismos através da alimentação, respiração e pele, sendo armazenados preferencialmente em tecidos com elevado teor lipídico [42].

Considerando toda a problemática, a Convenção de Estocolmo sobre POPs, realizada em 2001, propôs a adoção de medidas de controle e banimento relacionadas a todas as etapas do ciclo de vida dessas substâncias: produção, importação, exportação, uso e destinação final. Dentre as substâncias inseridas na lista de POPs de uso proibido estão PCBs, heptacloros, clordanos e mirex [57].

Apesar de abrigar áreas preservadas, a região amazônica possui histórico do uso indiscriminado de DDTs no combate a vetores de doenças tropicais como a malária [58,59]. Embora a doença tenha sido registrada em todo o país e atingindo metade da população brasileira [60], a região Amazônica chegou a concentrar 97,5% dos casos de malária no Brasil [61,62], levando tais compostos para toda a região Amazônica em campanhas de saúde pública [63,64], em função da sua eficiência contra insetos.

O presente estudo teve como objetivo avaliar a contaminação por compostos organoclorados no golfinho-da-Amazônia que habita a bacia hidrográfica do rio Negro.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Área de estudo e coleta das amostras

A bacia hidrográfica em questão abriga o rio Negro: o maior rio de água negra do mundo, mais extenso e o segundo maior em volume de água, atrás somente do Amazonas, ao qual ajuda formar [65,66]. Tem sua origem nas bacias Amazônica e do Orinoco ao qual possui conectividade pelo canal Cassiquiare [67].

Para sistematização dos pontos de coleta, os rios Negro e Branco foram subdivididos em trechos, sendo eles: alto rio Negro (NR01, 02, 03 e 04), médio rio Negro (NR05, 06, 07 e 08); alto rio Branco (BR01 e 02), conforme abaixo (Figura 1).

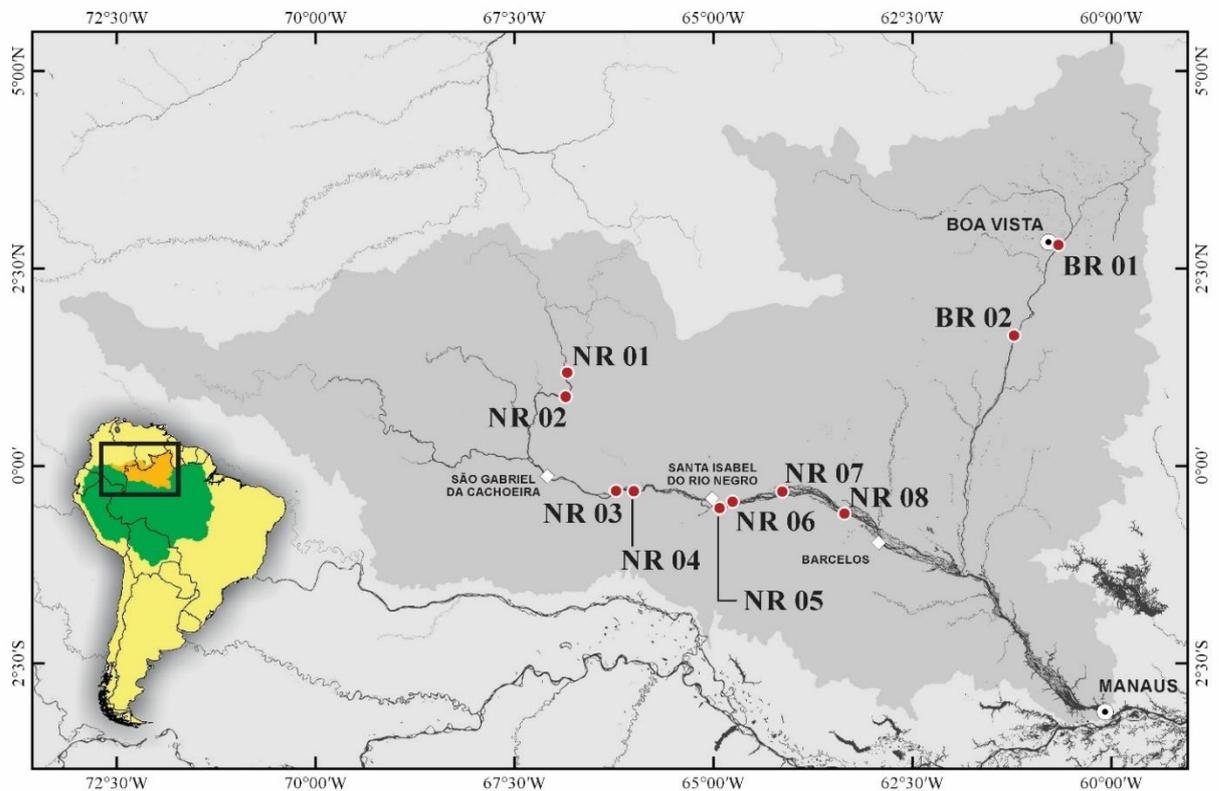


Figura 1. Mapa mostrando os pontos de coleta de amostras (círculos vermelhos) nos rios Negro (NR) e Branco (BR), Amazônia brasileira.

Vinte e quatro amostras de tecido adiposo subcutâneo foram obtidas através de biópsias coletadas do golfinho-da-Amazônia no rio Negro e seu maior tributário, o rio Branco (Figura 1). As coletas de *I. geoffrensis* foram conduzidas por equipe de pescadores experientes em capturas da espécie na Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá e pesquisadores do Laboratório de Evolução e Genética Animal, da Universidade Federal do Amazonas (LEGAL/UFAM). Os animais foram capturados manualmente e soltos logo após a coleta de dados. A estimativa do grau de maturidade dos indivíduos, assim como a identificação do sexo,

foram realizadas visualmente *in loco* a partir das diferenças de comprimento, classe de idade e sexo (Tabela 1). Animais com comprimentos inferiores a 170 cm foram considerados imaturos conforme literatura disponível [11]. Contudo, indivíduos menores acompanhados de fêmeas lactantes com evidências de cuidado parental, além de imaturos, foram identificados neste estudo como filhotes (Tabela 1).

O tecido adiposo subcutâneo foi extraído da região dorsal dos animais com o auxílio de *punch* (4 mm) e pinça de aço inoxidável. Em seguida, a matriz gordurosa foi envolvida em papel alumínio, acondicionada em tubos de vidro e armazenada em recipiente refrigerado até a deposição no laboratório, em *freezer* a -20°C , para posterior análise de contaminantes organoclorados no Laboratório de Compostos Orgânicos em Ecossistemas Costeiros e Marinhos (OrganoMAR), da Universidade Federal de Pernambuco.

O referido projeto (CNPq 482662/2013-1, CNPq 482253/2012-6, CNPq 563348/2010-0), foi submetido à avaliação e obteve aprovação pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), observando os princípios do bem-estar animal.

2.2 Extração e purificação das amostras

As amostras de tecido adiposo subcutâneo provenientes das biópsias do golfinho-da-Amazônia foram pesadas (0.2 a 1 cm/comprimento; 0,0264 – 0,1182 g), foram misturadas com sulfato de sódio (~5 g) e maceradas manualmente com o auxílio de almofariz e pistilo. O produto da maceração foi transferido para cartuchos de vidro. Padrões internos (DBOFB, PCB-103 e PCB-198) foram adicionados às amostras e a extração dos analitos de interesse foi realizada em extrator Soxhlet contendo 70 mL de uma mistura de n-hexano e diclorometano

(1:1, v/v). Após 8 h de extração, uma alíquota do extrato foi retirada para determinação gravimétrica da matéria orgânica extraível (M.O.E.). Os extratos foram concentrados em evaporador rotativo a vácuo (marca Fisatom, modelo 801) até 5 mL. Os extratos concentrados foram purificados por meio de tratamento com ácido sulfúrico concentrado (95-98%) sob agitação em vórtex (10 s). As fases foram separadas em centrífuga (3000 rpm, 5 min) para separação de fases. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e o tratamento ácido foi repetido mais duas vezes. O extrato purificado foi lavado duas vezes com água destilada (livre de compostos orgânicos) para remoção de resíduos de ácido. Em seguida, os extratos foram transferidos para *vials* de 1,5 mL e concentrados a 150 µL em fluxo suave de nitrogênio. Por fim, adicionou-se padrão interno cromatográfico (PICG) aos extratos e estes foram armazenado em *freezer* (-20 °C).

2.3 Condições cromatográficas

Os extratos foram injetados em cromatógrafo a gás acoplado a espectômetro de massas (CG/MS - Agilent Technologies: modelo 7820A/5975C), sem divisão de fluxo (*splitless*). A coluna capilar utilizada foi HP-5ms (30m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura da fase estacionária). Gás hélio (99,9990% de pureza) foi utilizado como gás de arraste, com fluxo constante de 1,2 mL min⁻¹. A temperatura do injetor foi de 270° C para PCBs e 300° C para pesticidas. Para PCBs, as condições do forno do cromatógrafo foram as seguintes: 75° C (isotérmico por 3 min), rampa de 15° C min⁻¹ até 150° C, rampa de 2° C min⁻¹ até 260° C e rampa de 20° C min⁻¹ até 300° C (isotérmico por 1 min). Para pesticidas, as condições foram as seguintes: 100° C, rampa de 10° C min⁻¹ até 200° C e rampa de 5° C min⁻¹ até 300° C (isotérmico por 3 min). Em ambas as análises, as temperaturas da fonte de íons,

quadrupolo e interface foram 230, 150 e 300 °C, respectivamente. O espectrômetro de massas foi equipado com fonte de ionização de elétrons (70 eV). O quadrupolo foi operado em modo de monitoramento de íons selecionados (SIM, *selected ion monitoring*). Quatro íons m/z de cada analito foram monitorados.

2.4 Identificação e quantificação

A identificação dos PCBs e pesticidas organoclorados nas amostras foi baseada no tempo de retenção (comparando com soluções padrão disponíveis comercialmente) e na abundância relativa dos íons m/z (comparando com espectros de massa disponíveis na biblioteca NIST 2011). A quantificação baseou-se na padronização interna, tendo como referência a área do pico do íon m/z primário de cada analito. As curvas analíticas foram preparadas com seis soluções padrão contendo de 1 a 500 ng mL⁻¹ de cada analito de interesse. Elas foram consideradas aceitáveis quando o coeficiente de determinação (R^2) da análise de regressão foi igual ou superior a 0,995.

O limite de quantificação (LQ) foi considerado com base na menor concentração do analito quantificada com confiança, utilizando-se a solução mais diluída da curva analítica. Para efeitos de cálculos, foi utilizado o quociente entre a massa nominal do analito e a massa extraída da amostra.

2.5 Controle de qualidade

Para avaliar a qualidade e confiabilidade dos resultados obtidos, utilizou-se como controles de qualidade o Branco (BCO), Branco Fortificado (BF) e Branco Fortificado Duplicata (BFD), todos passando pelos mesmos processos de análise das amostras.

O BCO consistiu na extração sulfato de sódio em peso equivalente às amostras, porém sem a adição dos analitos de interesse. Para avaliar a exatidão e precisão do método, ao BF e BFD adicionou-se uma quantidade conhecida dos analitos de interesse e calculou-se a diferença percentual relativa (DPR) para cada um deles, conforme a seguir:

$$DPR = \left[\left[\frac{BF - BFD}{\frac{BF + BFD}{2}} \right] \times 100 \right]$$

Onde:

BF = contração do analito na matriz fortificada;

BFD = concentração do analito na matriz fortificada duplicata;

DPR = diferença percentual relativa (%).

2.6 Analitos investigados

Os pesticidas clorados analisados no presente estudo foram DDTs, HCHs, clordanos e mirex. Dentre os DDTs, seis compostos foram investigados: *o,p'*-DDT, *p,p'*-DDT, *o,p'*-DDD, *p,p'*-DDD, *o,p'*-DDE e *p,p'*-DDE. No grupo dos clordanos (CHLs) foram determinados: γ -clordano e α -clordano e HCHs: α -HCH, β -HCH, γ -HCH e δ -HCH. Além dos pesticidas já mencionados, 184 bifenilas policloradas também foram investigadas, incluindo os seguintes isômeros e congêneres da IUPAC: PCB-1, 2, 3, 4/10, 5, 6, 7/9, 8, 11, 12/13, 14, 15, 16/32, 17,18, 19, 20/33, 21, 22, 23/34, 24/27, 25, 26, 28, 29, 30, 31, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47/75, 49, 50, 51, 52/73, 53, 54, 55, 56/60, 57, 58, 59, 61/74, 63, 64/71/72, 65, 66/80, 67, 68, 69, 70/76, 77, 78, 79, 84, 86/97, 87/115, 88/91, 90/101, 93, 94, 95, 96, 98/102, 99, 100, 104, 105/127, 107/108, 109, 110, 111/116/117, 112, 114, 118, 121, 123, 125, 126, 128, 131/142,

134, 135/144, 137, 138/160, 139/149, 140, 141, 143, 145, 146, 147, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 162, 163/164, 165, 169, 170/190, 171, 172/192, 173, 174/181, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 182/187, 183, 184, 185, 186, 188, 189, 191, 193, 194, 195, 196/203, 197, 199, 200, 201, 202, 204, 205, 206, 207, 208 e 209.

2.7 Interpretação dos dados

Em geral, os resultados das análises de compostos organoclorados são apresentados em peso lipídico, embora avaliações com base em tecido úmido tenham sido cada vez mais frequentes (ex.: [68]). Devido à complicada logística envolvendo a coleta e transporte das amostras até o laboratório, identificou-se um problema de conservação das mesmas que culminou na perda de lipídios. Ao comparar os teores lipídicos das amostras deste trabalho com outros estudos realizados a partir de biópsias de cetáceos, percebeu-se diferenças significativas nos percentuais lipídicos. Por essa razão, a concentração dos compostos organoclorados presentes no tecido adiposo subcutâneo do golfinho-da-Amazônia será apresentada e discutida com base no peso úmido. Vale ressaltar que também existem diversos estudos na literatura que apresentam resultados de organoclorados em cetáceos com base no peso lipídico ex.: [69–71].

2.8 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram testados quanto à normalidade e homocedasticidade utilizando os testes de Kolmogorov-Smirnov e Levene. Mesmo após tentativas de transformação dos dados não foi possível obter distribuições normais e homocedásticas. Por esse motivo, optou-se pela utilização de testes não paramétricos.

A fim de testar possíveis diferenças de contaminação entre os compostos analisados (PCBs, DDTs e Mirex), foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. HCHs e CHLs não foram incorporados na análise em função da baixa representatividade, sendo ambos detectados em apenas uma das amostras. Após detectadas as diferenças, testes de Mann-Whitney foram executados entre pares de dados. O mesmo teste foi utilizado a fim de se avaliar as diferenças entre a contaminação das bacias dos rios Negro e Branco. Todos os testes estatísticos foram executados utilizando o pacote estatístico MINITAB 14.

Tabela 1. Informações sobre local de coleta e parâmetros biológicos dos indivíduos de golfinho-da-Amazônia amostrados neste estudo. Abreviações: M = macho, F = fêmea, Fi = filhote, S = subadulto, A = adulto, FG/NL = fêmea grávida/não-lactante.

ID OrganoMAR	Sexo	Classe de idade	Grau de maturidade	Prenha/Lactante	Comprimento (cm)	Localidade	Pontos de coleta
OM01722	M	A	Maturo	-	234	Boa Vista	BR01
OM01723	F	A	Maturo	-	183	Boa Vista	BR01
OM01725	M	A	Maturo	-	199	Vista Alegre 1	BR02
OM01726	M	A	Maturo	-	193	Vista Alegre 2	BR02
OM01728	M	A	Maturo	-	212	Vista Alegre 2	BR02
OM01729	F	S	Imaturo	-	148	Lago Cucuí	NR01
OM01730	M	A	Maturo	-	183	Lago Cucuí	NR01
OM01733	F	A	Maturo	-	184	Lago Cucuí	NR01
OM01734	F	A	Maturo	FG/NL	174	Lago Cucuí	NR01
OM01736	F	A	Maturo	FG/NL	171	Lago Cucuí	NR01
OM01737	F	A	Maturo	-	171	Lago Cucuí	NR01
OM01738	M	Fi	Imaturo	-	127	Lago Cucuí	NR01
OM01742	M	A	Maturo	-	202	Lago Cucuí	NR01
OM01739	M	A	Maturo	-	177	Lago Mabi	NR02
OM01746	M	S	Imaturo	-	143	Vila Nova	NR03
OM01750	F	A	Maturo	-	175	Sítio Caristino	NR04
OM01753	M	S	Imaturo	-	148	Tapuruguara	NR05
OM01756	F	Fi	Imaturo	-	128	Darará	NR06
OM01758	M	A	Maturo	-	220	Nova Vida	NR07
OM01760	M	Fi	Imaturo	-	133	Nova Vida	NR07
OM01762	M	S	Imaturo	-	161	Darauacá	NR08
OM01764	M	S	Imaturo	-	159	Darauacá	NR08
OM01767	M	S	Imaturo	-	169	Darauacá	NR08
OM01768	M	A	Maturo	-	183	Darauacá	NR08

3. RESULTADOS

Os compostos organoclorados encontrados nos tecidos amostrados de golfinho-da-Amazônia (*I. geoffrensis*) distribuídos pelo rio Negro e seu principal afluente, o rio Branco, são apresentados abaixo (Figura 2).

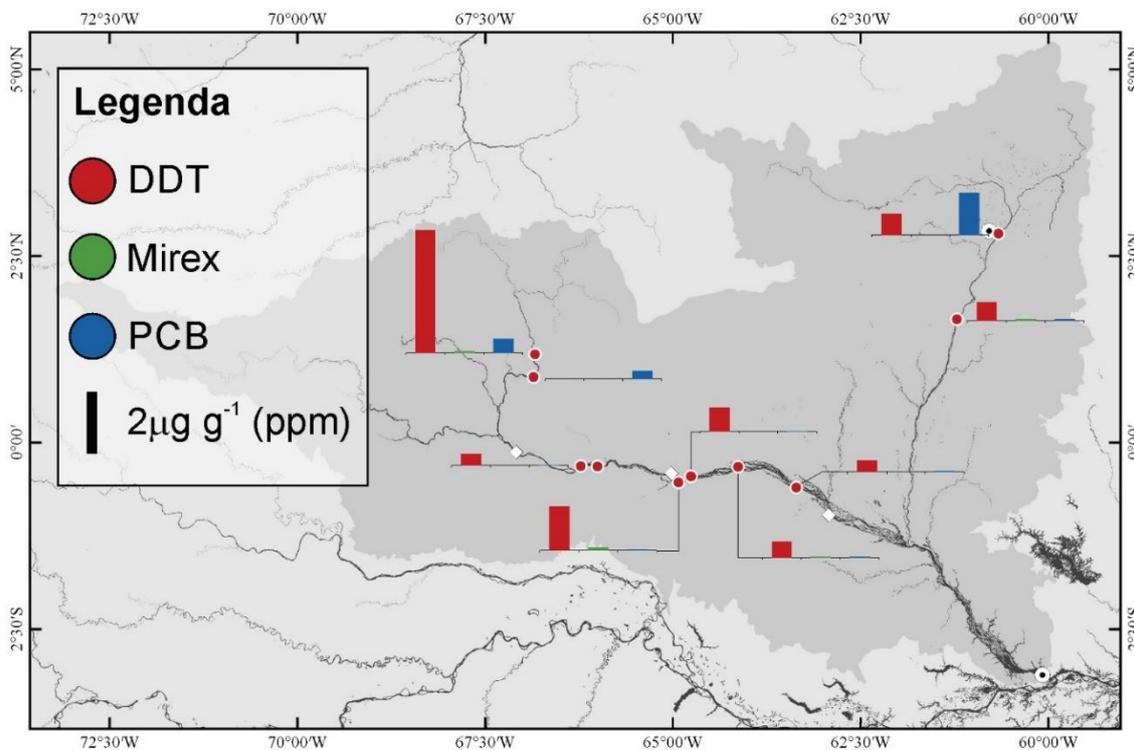


Figura 2. Distribuição da contaminação ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido) por pesticidas organoclorados e bifenilas policloradas em golfinho-da-Amazônia (*I. geoffrensis*) nos rios Negro e Branco, Amazônia, Brasil.

Dentre os pesticidas organoclorados detectados por esse estudo estão DDTs: *o,p'*-DDT, *p,p'*-DDT, *o,p'*-DDD, *p,p'*-DDD, *o,p'*-DDE e *p,p'*-DDE; CHLs: γ -clordano e α -clordano; HCHs: α -HCH e mirex.

Entre as 182 bifenilas policloradas analisadas (PCBs), 71 congêneres foram detectados, sendo eles: 4/10, 8, 18, 28, 31, 43, 44, 47/75, 49, 52/73, 53, 59, 61/74, 66/80, 69, 70/76, 77,

90/101, 93, 95, 99, 105/127, 109, 110, 118, 128, 135/144, 138/160, 139/149, 141, 146, 151, 153,154, 155, 157, 158, 163/164, 169, 170/190, 171, 172/192, 173, 174/181, 175, 177, 178, 180, 182/187, 183, 196/203, 201, 206 e 209.

Dos pesticidas organoclorados analisados por este estudo (DDTs, HCHs, CHLs e mirex), apenas β -HCH, γ -HCH e δ -HCH não foram detectados por este estudo. Os valores médios encontrados para DDTs, PCBs e mirex foram $0,894 \mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido (amplitude: $0,013 - 10,8 \mu\text{g g}^{-1}$), $0,291 \mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido ($0,023 - 3,41 \mu\text{g g}^{-1}$) e $0,030 \mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido ($0,066 - 0,267 \mu\text{g g}^{-1}$). CHLs e HCHs foram detectados em um único indivíduo (OM01723). As concentrações encontradas corresponderam: α -clordano (cis-clordano) $0,151 \mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido e γ -clordano (trans-clordano) $0,098 \mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido. Para HCHs a única concentração encontrada correspondeu a $0,165 \mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido (Tabela 2).

A média das concentrações de DDTs (somatório de *o,p'*-DDT, *p,p'*-DDT, *o,p'*-DDD, *p,p'*-DDD, *o,p'*-DDE e *p,p'*-DDE) encontrada foi maior que dos demais contaminantes, porém não houve diferença entre os valores médios de contaminação de PCBs (somatório de 182 congêneres) e mirex (Kruskal-Wallis: $H = 19,13$; $gl = 2$; $p < 0,001$; DDT x PCB: $p=0,003$; DDT x Mirex: $p<0,001$ PCB x Mirex: $p=0,554$).

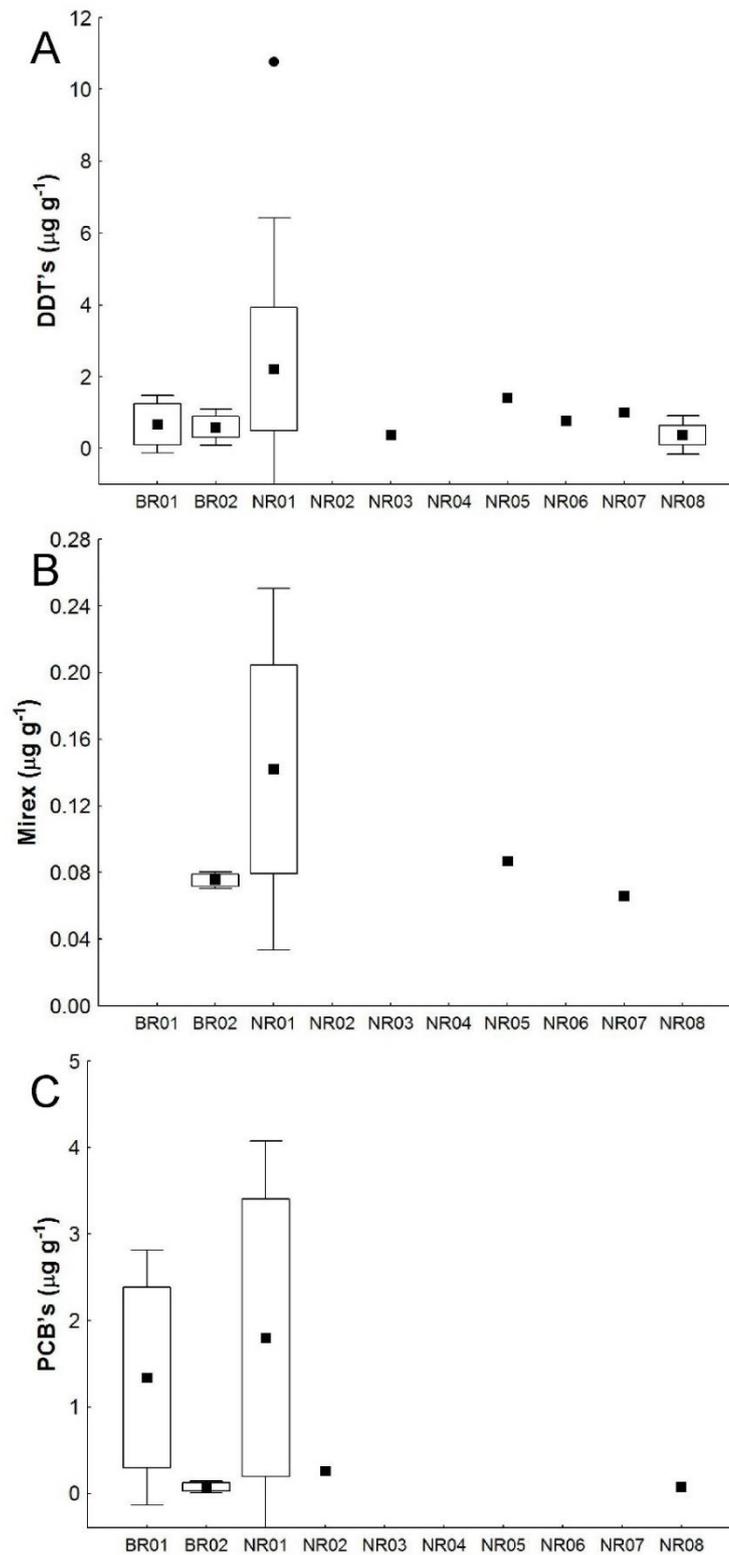


Figura 3. Gráficos (A), (B) e (C) indicando a espacialidade dos compostos estudados por pontos amostrais. Os pontos representam a mediana, as caixas representam os quartis de 25 e 75%. As linhas representam o alcance (range) dos pontos, excluindo outliers.

A comparação dos dados obtidos entre os rios Negro e Branco mostraram-se significativos para indivíduos contaminados por PCBs (Figuras 3 e 4), onde a média encontrada para indivíduos contaminados por PCBs no rio Branco foi de $0,56 \mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido ($\pm 1,022$) e no rio Negro foi de $0,20 \mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido ($\pm 0,778$) (Mann-Whitney; $U = 89,5$; $p = 0,0248$). Já para os demais grupos de contaminantes (DDTs e Mirex), não houve diferença significativa entre as médias de contaminação (Mann-Whitney; DDT: $U=73,0$; $p=0,4753$; Mirex: $U=67,0$; $p=0,7234$).

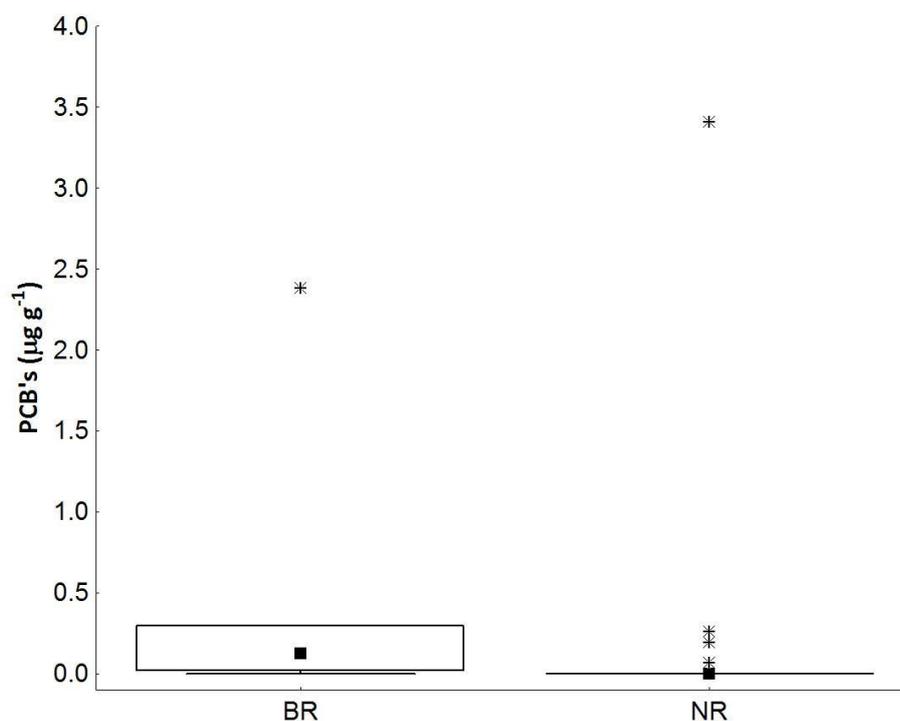


Figura 4. Gráfico indicando a diferença de contaminação (mediana) de PCBs entre as bacias do rio Negro e rio Branco, Norte do Brasil. Os pontos representam a mediana, as caixas representam os quartis de 25 e 75%. As linhas representam o alcance (range) dos pontos, excluindo outliers. Asteriscos representam extremos, valores muito diferentes do geral encontrado.

A elevada frequência de detecções não quantificadas (concentrações menores que o limite de quantificação do equipamento: $<LQ$) e de não detecções (nd) obtidas para HCHs, CHLs e mirex, inviabilizou inferências estatísticas mais detalhadas sobre a espacialidade da

contaminação encontrada. No entanto, fatores como as concentrações, padrões de contaminação, distâncias entre pontos de amostragem e histórico de uso na região Amazônica são informações importantes, algumas delas inéditas para a região e a espécie em questão, e são apresentadas na Tabela 2.

As concentrações médias encontradas de contaminação foram: 0,894 ($\pm 2,157$) $\mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido para DDTs (BR: 0,6260 e NR: 0,9639 $\mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido); 0,291 ($\pm 0,822$) $\mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido para PCBs (BR: 0,5652 e NR: 0,2067 $\mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido); 0,030 ($\pm 0,061$) $\mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido para Mirex (BR: 0,0302 e NR: 0,305 $\mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido); 0,010 ($\pm 0,051$) $\mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido para CHLs (BR: 0,0498 $\mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido) e 0,007 ($\pm 0,034$) $\mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido para HCHs (BR: 0,033 $\mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido).

Para DDT, uma elevada frequência de contaminação foi encontrada amplamente distribuída por toda a área amostrada, tendo apenas três dos 24 indivíduos amostrados com contaminação não detectada (nd) e dois com detecção abaixo do limite de quantificação do instrumento ($< \text{LQ}$). As concentrações máximas encontradas neste trabalho foram identificadas no indivíduo identificado pelo código OM01730 capturado no alto rio Negro (NR01), área onde foram encontrados os maiores valores de contaminação tanto para PCBs quanto para pesticidas organoclorados (Tabela 2).

Mirex, embora em concentrações mais baixas que os demais compostos, foi identificado tanto no rio Negro quanto no rio Branco em concentrações similares, equivalentes a 0,030 ($\pm 0,061$) $\mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido. Já compostos como HCHs e CHLs foram identificados em um único indivíduo no alto rio Branco (NR01; HCH: 0,165 $\mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido; CHL: 0,249 $\mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido). No mesmo indivíduo também foi identificado níveis elevados de contaminação por DDT (1,240 $\mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido).

O número de machos analisados correspondeu a cerca de 70% do total das amostras (M = 17; F = 7). Machos apresentaram a maior frequência de contaminação por indivíduos, assim como os valores máximos encontrados tanto para bifenilas policloradas quanto para pesticidas organoclorados (OM01730: máx PCB: 3,407 $\mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido; máx DDT: 10,766 $\mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido; máx mirex: 0,267 $\mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido), com exceção de CHL (0,249 $\mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido) e HCH (0,165 $\mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido) identificados em uma única fêmea adulta (OM01723). Contudo, quando avaliada a média de contaminação por sexo, os valores obtidos para machos e fêmeas foram equivalentes (DDTs: 0,434; PCBs: 0,355 e mirex: 0,309 $\mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido e DDTs: 0,374, PCBs: 0,313 e mirex: 0,303 $\mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido, respectivamente).

Um alto índice de detecção (<LQ) foi encontrado para bifenilas policloradas. Os PCBs com frequência de detecção em pelo menos dez dos 24 indivíduos amostrados foram PCB 47/75, 153, 154 e 175 (Figura 5). Dos congêneres encontrados em maiores concentrações nos indivíduos amostrados estão PCBs 138/160 (0,753 $\mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido), PCB 61/79 (0,410 $\mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido), PCB 70/76 (0,398 $\mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido), PCB 153 (0,397 $\mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido), PCB 66/80 (0,345 $\mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido), PCB 170/190 (0,304 $\mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido).

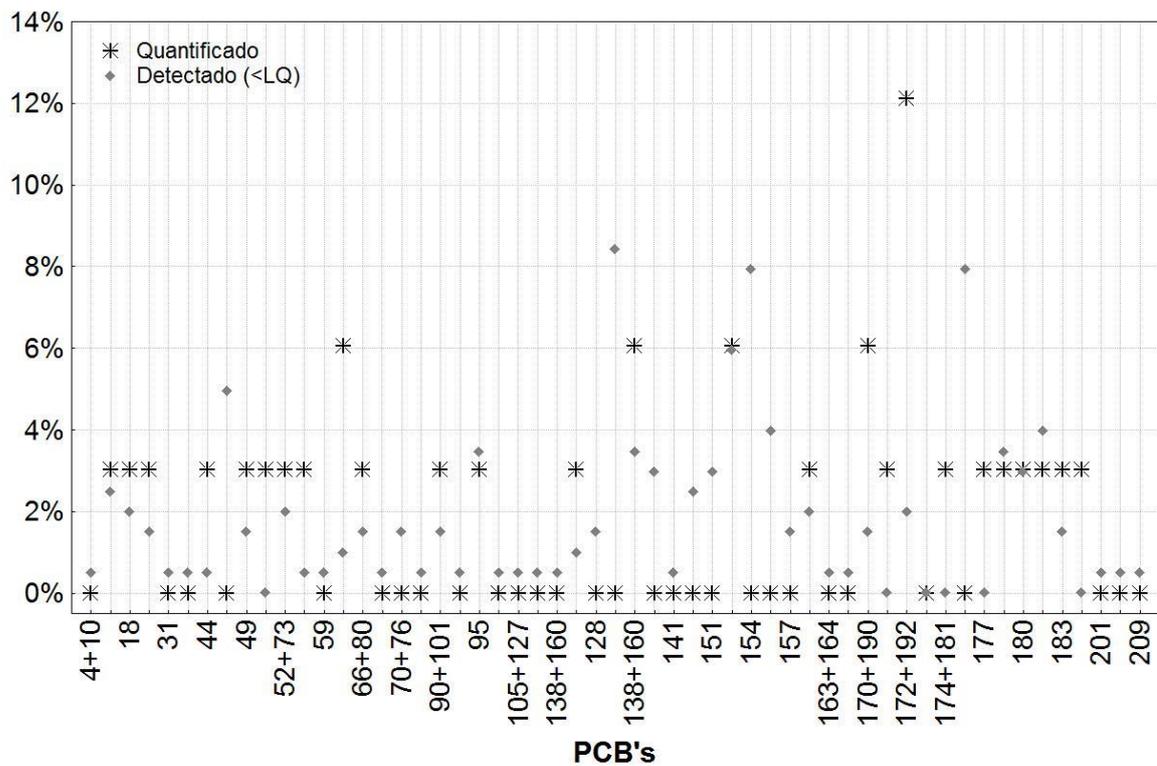


Figura 5. Gráfico indicando a porcentagem das bifenilas policloradas quantificadas por esse estudo e a frequência de detecções dos mesmos compostos pelo método analítico utilizado.

Tabela 2. Concentração de pesticidas organoclorados e bifenilas policloradas ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido) no tecido adiposo subcutâneo do golfinho-da-Amazônia (*I. geoffrensis*) amostrado nos rios Negro e Branco, Norte do Brasil.

Código n° (ID)	Rio	Sexo	Lipídios (%)	ΣHCH^1 ($\mu\text{g g}^{-1}$)	ΣCHL^2 ($\mu\text{g g}^{-1}$)	ΣDDT^3 ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Mirex ($\mu\text{g g}^{-1}$)	ΣPCB^4 ($\mu\text{g g}^{-1}$)
OM01723	BR01	F	1.50	0,165	0,249	1,240	nd	0,296
OM01729	NR01	F	9.80	nd	Nd	0,631	0,075	< 0,012
OM01733	NR01	F	1.10	nd	Nd	nd	nd	0,191
OM01734	NR01	F	4.20	nd	Nd	< 0,018	nd	< 0,013
OM01736	NR01	F	8.40	nd	Nd	0,092	nd	nd
OM01737	NR01	F	-	nd	Nd	0,097	nd	-
OM01756	NR06	F	10.8	nd	Nd	0,776	nd	< 0,012
OM01722	BR01	M	0.90	nd	Nd	0,110	nd	2,383
OM01725	BR02	M	0.40	nd	Nd	0,013	nd	0,124
OM01726	BR02	M	6.20	nd	Nd	0,806	0,079	0,023
OM01728	BR02	M	3.40	nd	Nd	0,961	0,072	< 0,011
OM01730	NR01	M	1.10	nd	Nd	10,776	0,267	3,407
OM01738	NR01	M	2.70	nd	Nd	0,840	nd	< 0,038
OM01739	NR02	M	0.10	nd	Nd	< 0,039	nd	< 0,034
OM01742	NR01	M	2.40	nd	Nd	0,833	0,084	0,261
OM01746	NR03	M	4.20	nd	Nd	0,374	nd	< 0,013
OM01750	NR04	M	2.30	nd	Nd	nd	nd	< 0,011
OM01753	NR05	M	7.80	nd	Nd	1,405	0,087	< 0,022
OM01758	NR07	M	9.40	nd	Nd	1,005	0,066	< 0,014
OM01760	NR07	M	6.10	nd	Nd	nd	nd	< 0,010
OM01762	NR08	M	3.70	nd	Nd	0,130	nd	< 0,022
OM01764	NR08	M	2.50	nd	nd	1,186	nd	< 0,020
OM01767	NR08	M	3.70	nd	nd	0,122	nd	< 0,016
OM01768	NR08	M	3.70	nd	nd	0,058	nd	< 0,015
Σ				0,165	0,249	21,455	0,730	6,981
Média				0,007 ($\pm 0,034$)	0,010 ($\pm 0,051$)	0,894 ($\pm 2,157$)	0,030 ($\pm 0,061$)	0,291 ($\pm 0,822$)
N=24								

1: Somatório de α -HCH, β -HCH, γ -HCH e δ -HCH; 2: Somatório de α -clordano e γ -clordano; 3: Somatório de *o,p'*-DDT, *p,p'*-DDT, *o,p'*-DDD, *p,p'*-DDD, *o,p'*-DDE e *p,p'*-DDE; 4: Somatório dos congêneres 8, 18, 28, 44, 49, 52, 61, 66, 70, 73, 74, 76, 77, 80, 87, 90, 95, 99, 101, 105, 110, 115, 118, 126, 127, 128, 138, 139, 149, 151, 153, 158, 160, 169, 170, 180, 182, 183, 187, 190, 194, 195, 201, 206 e 209. nd = não detectado

4. DISCUSSÃO

4.1 *Uso de biópsias e o baixo percentual lipídico*

Características como a lipofilicidade permitem a bioacumulação de compostos organoclorados em tecidos de maiores teores lipídicos na biota aquática, especialmente aqueles que ocupam o topo da cadeia alimentar, como os golfinhos. Estudos científicos indicam uma estratificação da camada de gordura subcutânea e diferenças na composição bioquímica entre tais camadas do tecido vivo [72]. Entretanto, análises de POPs a partir de biópsias apontam uma homogeneidade da deposição de tais compostos nas diferentes camadas independentemente da profundidade do tecido adiposo subcutâneo, validando o uso dessa técnica para avaliação da contaminação por POPs em cetáceos [73].

O baixo percentual lipídico encontrado por esse estudo provavelmente reflete as condições não ideais de armazenamento dos tecidos amostrados. Durante o processo de coleta e transporte, uma provável perda de lipídios pode ter ocorrido no processo de descongelamento das mesmas durante as diversas etapas de transporte das regiões remotas de coleta até o laboratório. Outro fator relevante a ser considerado é o tamanho da ponteira (*punch*) utilizada para realização de biópsia (4 mm). A mesma passou por avaliação do Comitê de Ética Animal, onde levou-se em consideração as dimensões do animal com o objetivo de proporcionar uma coleta minimamente invasiva. Considerando as dificuldades enfrentadas nas análises, sugere-se um aumento do diâmetro do *punch* utilizado de 4 para 6 mm.

Reforçando a hipótese anterior, o baixo percentual lipídico encontrado nesse estudo pode ser justificado pelo uso de biópsias, assim como o encontrado por outros trabalhos [72,74]. Para compostos altamente persistentes como os pesticidas organoclorados, esse não parece ser um fator preocupante, visto as concentrações encontradas para DDTs e PCBs na maioria dos

indivíduos amostrados. A perda de lipídios pode ter sido influenciada nos valores encontrados nos compostos organoclorados abaixo do limite de quantificação do equipamento. Contudo, biópsias realizadas no golfinho-nariz-de-garrafa (*Tursiops truncatus*) indicaram altos índices de contaminação por compostos organoclorados mesmo com percentuais lipídicos baixos (3,8, 5,1 e 6,9%), não havendo diferenças para as demais amostras com percentuais esperados para a espécie [72].

4.2 A contaminação por compostos organoclorados em golfinhos da Amazônia

Todos os compostos investigados por esse estudo foram encontrados nas amostras coletadas a partir de biópsias de tecido adiposo subcutâneo do golfinho-da-Amazônia (*I. geoffrensis*). Em geral, as concentrações dos compostos organoclorados encontrados nesse trabalho foram DDTs > PCBs > mirex > CHL > HCH.

Apesar do reconhecido histórico de uso de pesticidas organoclorados na Amazônia brasileira no combate ao vetor da malária [75], estudos que avaliam a contaminação por tais compostos na região ainda são escassos. As informações existentes fazem poucas inferências sobre a contaminação no ambiente e no próprio homem [8]. Um estudo avaliou a contaminação por organoclorados em quatro indivíduos de *I. geoffrensis*, três deles provenientes do rio Solimões e um do rio Madeira [76]. Os resultados, apresentados em base lipídica, indicaram concentrações médias de DDTs de 6494 (190 - 3176) $\mu\text{g g}^{-1}$ peso lipídico e concentrações médias de PCBs de 5144 (151 - 3216) $\mu\text{g g}^{-1}$ peso lipídico. O referido estudo representa a única avaliação realizada para *I. geoffrensis* encontrada na literatura [76]. O mesmo não apresentou os percentuais lipídicos para cada uma das amostras analisadas, inviabilizando comparações com os resultados deste trabalho (Tabela 3). Tais valores se equiparam aos encontrados por esse

estudo e são considerados elevados, contudo os valores encontrados pelo presente estudo podem estar subestimados em função da perda de lipídios.

Em estudos de contaminação do golfinho do rio Ganges *Platanista gangetica* (Tabela 3), a ordem de contaminação foi a mesma encontrada por esse trabalho (DDTs > PCBs > HCHs > CHLs). Em relação às concentrações, os valores médios encontrados para DDTs foram de 9,7 (4,7 - 13) $\mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido, enquanto que para PCBs foi de 0,453 (0,36 - 0,62) $\mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido, para HCHs 0,425(160 - 610) $\mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido e para CHLs foi de 0,037 (9,1 - 60) $\mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido [78]. Os resultados indicam uma maior contaminação principalmente por DDTs para a espécie do Ganges, contudo alertamos para a subestimação dos resultados obtidos por esse trabalho, o que pode levar a números ainda maiores.

Quando avaliados as diferentes concentrações entre machos e fêmeas, DDTs apresentaram média correspondente a 845,7 (0,013 - 10,776) $\mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido em machos e 177,37 (0,092 - 1,240) $\mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido em fêmeas; PCBs: 340,6 (0,023 - 3,407) $\mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido em machos e 0,0696 (0,191 - 0,296) $\mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido em fêmeas e Mirex: 0,039 (0,066 - 0,267) $\mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido em machos e 0,012 (0,075) $\mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido em fêmeas. CHLs e HCHs foram detectados em um único indivíduo fêmea. Alguns indivíduos imaturos (OM01753 e OM01764) apresentaram concentrações mais elevadas de contaminação por DDTs do que alguns indivíduos adultos, correspondendo a 1,403 e 1,186 $\mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido, respectivamente. Tais concentrações podem ser justificadas pela transferência de compostos organoclorados no processo de amamentação [79].

Um alto índice de detecções (principalmente para PCBs) foi verificado durante as análises. Embora os valores de concentração dos contaminantes encontrados tenham ficado

abaixo do limite de quantificação do instrumento, é evidente a presença do composto na amostra.

Tabela 3. Comparação da média de contaminação por organoclorados ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso úmido) em tecido adiposo subcutâneo de golfinhos de rio e pequenos cetáceos costeiros de todo o mundo.

Espécie	Localização	Origem	ΣDDT	ΣPCB	ΣHCH	ΣCHL	Mirex	Referências
Golfinho da Amazônia <i>Inia geoffrensis</i>	Rios Negro e Branco, Brasil	biópsia	0,894 ($\pm 2,157$)	0,291 ($\pm 0,822$)	0,007 ($\pm 0,034$)	0,010 ($\pm 0,051$)	0,030 ($\pm 0,061$)	O presente estudo
Golfinho da Amazônia <i>Inia geoffrensis</i>	Rios Solimões e Madeira, Brasil	carcaça	6,494 ($\pm 3,222$)*	5,144 ($\pm 0,099$)*	-	-	-	Torres et al. (2009)*
Golfinho-do-Ganges <i>Platanista gangetica</i>	Rio Ganges, Índia	carcaça	9,7 ($\pm 3,222$)	0,453 ($\pm 0,099$)	0,425 ($\pm 0,151$)	0,037 ($\pm 0,022$)	-	Kannan et al. (1994)
Golfinho-pintado-do-Atlântico <i>Stenella frontalis</i>	Litoral de São Paulo, Paraná e Santa Catarina, Sudeste e Sul brasileiro	carcaça	405,77($\pm 556,08$)	5,504 ($\pm 3,913$)	0,001 ($\pm 0,001$)	0,226 ($\pm 0,324$)	0,028 ($\pm 0,039$)	Leonel et al. (2012)
Boto-cinza <i>Sotalia guianensis</i>	Litoral do Ceará, Nordeste brasileiro	carcaça	0,042 ($\pm 0,088$)	1,697 ($\pm 2,585$)	0,009 ($\pm 0,013$)	-	0,00001 ($\pm 0,00003$)	Santos-Neto et al. (2014)
Golfinho nariz-de-garrafa <i>Tursiops truncatus</i>	Mar Adriático, Itália	carcaça	0,011 ($\pm 0,016$)	0,022 ($\pm 0,024$)	0,62 ($\pm 1,287$)	-	-	Romanic et al. (2014)

*Torres et al. (2009) representa os únicos dados de *I. geoffrensis* descritos na literatura em $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso lipídico, contudo não apresenta os percentuais lipídicos de cada amostra para que as mesmas pudessem ser convertidas em peso úmido e devidamente comparadas ao presente estudo.

4.3 DDTs/PCBs, DDT/DDE, α -clordano/ γ -clordano, α -HCH/ β -HCH/ γ -HCH

A ampla distribuição e os valores encontrados para DDTs e PCBs representam fonte de grande preocupação, uma vez que tais compostos são reconhecidos disruptores do sistemas endócrino, imunológico e cardiovascular, podendo ocasionar até mesmo câncer [80,81]. Em uma análise preliminar, a disseminação de pesticidas organoclorados como os DDTs na região Amazônica parece confirmar a afirmação de outros estudos que apontam o uso histórico no combate ao vetor da malária. Apesar da proibição em 1998 para uso em companhias de saúde pública, a persistência ambiental de tais compostos garante a presença de seus metabolitos no ambiente e na biota local mesmo após décadas após o seu uso [82].

Para PCBs, os maiores valores encontrados correspondem à proximidade com centros urbanos da região (ex.: Boa Vista, Roraima - BR01) e às regiões de cabeceira dos rios. Considerando o possível transporte atmosférico desses compostos, uma relação negativa pode ser estabelecida entre essas áreas (NR01 e 02) e o índice pluviométrico da região, uma vez que é sabido as elevadas chuvas nas regiões de cabeceiras. Contudo, os valores superiores encontrados para PCBs no BR01 e verificando os índices pluviométricos mais baixos de toda região, sugerem os centros urbanos como uma fonte emissora de maior ameaça.

A conservação de *I. geoffrensis* na região Amazônica brasileira depende em grande parte da preservação de seus habitats e de medidas efetivas de proteção à espécie, principalmente no que diz respeito às ações antropogênicas que podem os levar à morte. O estudo em questão poderá contribuir não só para ampliação do conhecimento relativo às ameaças da espécie, mas de ecossistemas importantes que compõem a maior floresta tropical do mundo. Além disso, o diagnóstico da contaminação encontrada pelo presente trabalho poderá subsidiar novos estudos

e auxiliar na tomada de medidas de controle e avaliação dos compostos organoclorados no ambiente Amazônico.

REFERENCIAS

1. Minh TB, Watanabe M, Nakata H, Tanabe S, Jefferson TA. Contamination by persistent organochlorines in small cetaceans from Hong Kong coastal waters. *Mar Pollut Bull.* 1999;39: 383–392. doi:10.1016/S0025-326X(99)00066-1
2. Kajiwara N, Matsuoka S, Iwata H, Tanabe S, Rosas FCW, Fillmann G, et al. Contamination by Persistent Organochlorines in Cetaceans Incidentally Caught Along Brazilian Coastal Waters. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2004;46: 124–134. doi:10.1007/s00244-003-2239-y
3. Tanabe S, Mori T, Tatsukawa R, Miyazaki N. Global pollution of marine mammals by PCBs, DDTs and HCHs (BHCs). *Chemosphere.* 1983;12: 1269–1275. doi:10.1016/0045-6535(83)90132-7
4. Carneiro FF, Lia Giraldo da Silva Augusto, Friedrich RMRK, Campos A, Búrigo. Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Carneiro FF, organizador. Rio de Janeiro; 2015.
5. Taylor Telford. *Sword and swastika: the Wehrmacht in the Third Reich.* Gollancz, 1953. 1952.
6. PITA R. *Armas químicas: La ciencia en manos del mal.* Madrid: Pl. 2008.
7. Augusto LG da S, Carneiro FF, Pignati WA, Rigotto RM, Friedrich K, Faria NMX, et al. SAÚDE, AMBIENTE E SUSTENTABILIDADE. Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Rio de Janeiro; 2015. p. 624.
8. Carneiro FF, Pignati WA, Rigotto RM, Augusto LG da S, Pinheiro AR de O, Faria NMX, et al. SEGURANÇA ALIMENTAR E NUTRICIONAL E SAÚDE. Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Rio de Janeiro; 2015. p. 624.
9. Best R, Da Silva VMF. Biology, status and conservation of inia geoffrensis in the Amazon and Orinoco river basins. *Occas Pap IUCN SSC 3 (Biology Conserv River Dolphins).* 1989; 23–34.
10. Bastida R, Secchi E, da Silva VMF. *Mamíferos acuáticos de Sudamérica y Antártida.* Buenos Aires: Vázquez Mazzini; 2007.
11. Da Silva VMF, Golding M, Barthem RB. *Golfinhos da Amazônia.* Manaus: INPA; 2008.
12. Best RC, Da Silva MF. Amazon river dolphin, Boto Inia geoffrensis (de Blainville, 1817). In: Harrison SHR and RJ, organizador. *Handbook of Marine Mammals. River Dolp.* London: Academic Press, London; 1989. p. 1–23.
13. Best R, da Silva VMF. *Mammalian Species: Inia geoffrensis.* *Am Soc Mammal.* 1993;426: 1–8.

14. Trebbau P, Bree JH van. Notes concerning the freshwater dolphin *Inia geoffrensis* (de Blainville, 1817). in *Venezuela Zeitschrift des Saugetierk* 39. 1974. p. 50– 57.
15. Grabert H. Migrações e especiação dos Iniidae da America do Sul (Cetacea, Mammalia). *Geogr* 9. 1984; 145–154.
16. da Silva VMF. Aspects of the biology of the Amazonian dolphins genus *Inia geoffrensis* and *Sotalia fluviatilis*. University of Cambridge, Cambridge. England. 1994.
17. Ruiz-Garcia M. SCMM-AJMS. Molecular Differentiation among *Inia geoffrensis* and *Inia boliviensis* (Iniidae, Cetacea) by Means of Nuclear Intron Sequences. *Popul Genet Res Prog*. 2008;6: 1– 29.
18. Castellanos-Mora L, Trujillo F, Ruíz-García M. Morphometric skull analyses in pink river dolphins (*Inia* sp.): Congruent results with molecular and body morphometrics. XXVII Congresso Brasileiro de Zoologia. Curitiba; 2008. p. 17–21.
19. Pilleri G, M. Gühr. Observations on the Bolivian, *Inia boliviensis*, (D’Orbigny, 1834) and the Amazonian bufeo, *Inia geoffrensis* (Blainville, 1817), with a description of a new subspecies (*Inia geoffrensis humboldtiana*). *Invest Cetacea* 8. 1977; 11–76.
20. Casinos A, Ocaña J. A craniometrical study of the genus *Inia d’orbigny*, 1834 (Cetacea, Platanistidae). *Saugetierkundliche Mitteilungen*. 1979;27: 197–206.
21. Hamilton H, Caballero S, Collins AG, Jr RLB. Evolution of river dolphins. 2001; doi:10.1098/rspb.2000.1385
22. Banguera-Hinestroza E. Molecular Identification of Evolutionarily Significant Units in the Amazon River Dolphin *Inia* sp. (Cetacea: Iniidae). *J Hered*. 2002;93: 312–322. doi:10.1093/jhered/93.5.312
23. Gravena W, Farias IP, da Silva MNF, da Silva VMF, Hrbek T. Looking to the past and the future: were the Madeira River rapids a geographical barrier to the boto (Cetacea: Iniidae)? *Conserv Genet*. 2014;15: 619–629. doi:10.1007/s10592-014-0565-4
24. Hrbek T, da Silva VMF, Dutra N, Gravena W, Martin AR, Farias IP. A New Species of River Dolphin from Brazil or: How Little Do We Know Our Biodiversity. Turvey ST, organizador. *PLoS One*. 2014;9: e83623. doi:10.1371/journal.pone.0083623
25. Nowak RM. Walker’s mammals of the world. Johns Hopkins Univ Press Balt MD. 1999;
26. Rice DW. Marine mammals of the world. Systematics and distribution. *Soc Mar Mammal*. 1998;
27. Simpson G. The principles of classification and a classification of mammals. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 1945.
28. Martin AR, Da Silva VMF. SEXUAL DIMORPHISM AND BODY SCARRING IN

- THE BOTO (AMAZON RIVER DOLPHIN) *INIA GEOFFRENSIS*. *Mar Mammal Sci.* 2006;22: 25–33. doi:10.1111/j.1748-7692.2006.00003.x
29. LODI, Liliane; BOROBIA M. Baleias, botos e golfinhos do Brasil: guia de identificação. 1ª edição. Rio de Janeiro: Technical Books; 2013.
 30. Trujillo F. HABITAT USE AND SOCIAL BEHAVIOUR OF THE FRESHWATER DOLPHIN *Inia geoffrensis* (DE BLAINVILLE 1817) IN THE AMAZON AND ORINOCO BASINS. University of Aberdeen, Scotland. 2000.
 31. Nordin CF, Meade RH. The Amazon and the Orinoco. *McGraw-Hill Yearbook of Science and Technology*. McGraw-Hil. 1986. p. 385–391.
 32. da Silva VMF, Martin AR. Status, threats, conservation initiatives and possible solutions for *Inia geoffrensis* and *Sotalia fluviatilis* in Brazil. In: Trujillo F, Crespo E, Damme P Van, Usma S, organizadores. *The Action Plan for South American rivers dolphins 2010-2020*. Bogotá - Colombia: WWF, Fundación OMACHA, WDS, WDCS; 2010. p. 249.
 33. Loch C, Marmontel M, Simões-Lopes PC. Conflicts with fisheries and intentional killing of freshwater dolphins (Cetacea: Odontoceti) in the Western Brazilian Amazon. *Biodivers Conserv.* 2009;18: 3979–3988. doi:10.1007/s10531-009-9693-4
 34. da Silva VMF, Martin AR. Impact of human activities upon two species of dolphins. in Amazon flooded forest, Brazil. Cape Town, South Africa: 17th Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals; 2007.
 35. Turvey ST, Pitman RL, Taylor BL, Barlow J, Akamatsu T, Barrett LA, et al. First human-caused extinction of a cetacean species ? 2007; 537–540. doi:10.1098/rsbl.2007.0292
 36. Mead JG, Brownell RL. Order Cetacea. In: Wilson, Don E. and DMR, organizador. *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference*. 2005. p. 723–743.
 37. Banguera-Hinestroza E, Cardenas H, Ruiz-Garcia M, Marmontel M, Gaitan E, Vazquez R, et al. Genetic differentiation differentiation in populations of the river dolphins genus *Inia* (Blainville, 1817) and apports to the taxonomic status with molecular analysis. *Rev la Acad Colomb Ciencias Exactas Fis y Nat.* 2003;26: 575–588.
 38. da Silva V. Boto-cor-de-rosa. Plano de Ação nacional para a conservação dos Mamíferos Aquáticos - Pequenos Cetáceos. *IcmBio*, 20. Brasília; 2011. p. 17–20.
 39. Reeves RR, Jefferson TA, Karczmarski L, Laidre K, O’Corry-Crowe G, Rojas-Bracho L, et al. *Inia geoffrensis*. In: *The IUCN Red List of Threatened Species 2013*: e.T10831A3220342. 2013. doi:http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2011-1.RLTS.T10831A3220342.e.
 40. Borrell A. PCB and DDT in blubber of cetaceans from the northeastern north Atlantic. *Mar Pollut Bull.* 1993;26: 146–151. doi:10.1016/0025-326X(93)90125-4

41. Yogui GT. Ocorrência de compostos organoclorados (pesticidas e PCBs) em mamíferos marinhos da costa de São Paulo (Brasil) e da Ilha Rei George (Antártica). 2002;
42. Evans K, Hindell M, Hince G. Concentrations of organochlorines in sperm whales (*Physeter macrocephalus*) from Southern Australian waters. 2004;48: 486–503. doi:10.1016/j.marpolbul.2003.08.026
43. Dallaire R, Dewailly É, Ayotte P, Forget-Dubois N, Jacobson SW, Jacobson JL, et al. Exposure to organochlorines and mercury through fish and marine mammal consumption: Associations with growth and duration of gestation among Inuit newborns. *Environ Int*. Elsevier Ltd; 2013;54: 85–91. doi:10.1016/j.envint.2013.01.013
44. Santos-Neto EB, Azevedo-Silva CE, Bisi TL, Santos J, Meirelles ACO, Carvalho VL, et al. Organochlorine concentrations (PCBs, DDTs, HCHs, HCB and MIREX) in delphinids stranded at the northeastern Brazil. *Sci Total Environ*. Elsevier B.V.; 2014;472: 194–203. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.10.117
45. Balmer BC, Ylitalo GM, McGeorge LE, Baugh KL, Boyd D, Mullin KD, et al. Persistent organic pollutants (POPs) in blubber of common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) along the northern Gulf of Mexico coast, USA. *Sci Total Environ*. Elsevier B.V.; 2015;527-528: 306–312. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.05.016
46. Becker PR. Concentration of Chlorinated Hydrocarbons and Heavy Metals in Alaska Arctic Marine Mammals. 2000;40: 819–829.
47. Houde M, Hoekstra PF, Solomon KR, Muir DCG. Organohalogen contaminants in delphinoid cetaceans. *Rev Environ Contam Toxicol*. 2005;184: 1–57. doi:10.1007/0-387-27565-7_1
48. Yordy JE, Pabst DA, McLellan WA, Wells RS, Rowles TK, Kucklickz JR. Tissue-specific distribution and whole-body burden estimates of persistent organic pollutants in the bottlenose dolphin (*tursiops truncatus*). *Environ Toxicol Chem*. 2010;29: 1263–1273. doi:10.1002/etc.152
49. Stephanie Mossner KB. MARINE MAMMALS AS GLOBAL POLLUTION INDICATORS FOR ORGANOCHLORINES. *Chemosphere*. 1997;34: 1285–1296.
50. Miranda AL, Roche H, Randi MAF, Menezes ML, Ribeiro CAO. Bioaccumulation of chlorinated pesticides and PCBs in the tropical freshwater fish *Hoplias malabaricus*: Histopathological, physiological, and immunological findings. *Environ Int*. 2008;34: 939–949. doi:10.1016/j.envint.2008.02.004
51. Fernandez-Alvarez M, Llompart M, Lamas JP, Lores M, Garcia-Jares C, Cela R, et al. Simultaneous determination of traces of pyrethroids, organochlorines and other main plant protection agents in agricultural soils by headspace solid-phase microextraction–gas chromatography. *J Chromatogr A*. 2008;1188: 154–163. doi:10.1016/j.chroma.2008.02.080

52. Oga S. Fundamentos de toxicologia. 2.ed. ed. São Paulo: Atheneu; 2003.
53. Tanabe S. Contamination and toxic effects of persistent endocrine disrupters in marine mammals and birds. *Mar Pollut Bull.* 2002;45: 69–77. doi:10.1016/S0025-326X(02)00175-3
54. Tanabe S, Iwata H, Tatsukawa R. Global contamination by persistent organochlorines and their ecotoxicological impact on marine mammals. *Sci Total Environ.* 1994;154: 163–177. doi:10.1016/0048-9697(94)90086-8
55. Cipro CVZ, Yogui GT, Bustamante P, Taniguchi S, Sericano JL, Montone RC. Organic pollutants and their correlation with stable isotopes in vegetation from King George Island, Antarctica. *Chemosphere.* Elsevier Ltd; 2011;85: 393–398. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.07.047
56. Godduhn A, Duffy LK. Multi-generation health risks of persistent organic pollution in the far north: use of the precautionary approach in the Stockholm Convention. *Environ Sci Policy.* 2003;6: 341–353. doi:10.1016/S1462-9011(03)00061-3
57. Hardy C, Maguire S. Discourse, field-configuring events, and change in organizations and institutional fields: Narratives of DDT and the Stockholm convention. *Acad Manag J.* 2010;53: 1365–1392. doi:10.5465/AMJ.2010.57318384
58. D’Amato C, Torres JPM, Malm O. DDT (dicloro difenil tricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental - uma revisão. *Quim Nova.* 2002;25: 995–1002. doi:10.1590/S0100-40422002000600017
59. Flores AV, Ribeiro JN, Neves AA, Queiroz ELR de. Organoclorados: um problema de saúde pública. *Ambient Soc.* 2004;7. doi:10.1590/S1414-753X2004000200007
60. Coura JR, Suárez-Mutis M, Ladeia-Andrade S. A new challenge for malaria control in Brazil: asymptomatic Plasmodium infection - a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006;101. doi:10.1590/S0074-02762006000300001
61. Rita de Cássia B. Barata. Malaria in Brazil: Trends in the Last Ten Years. *Cad Saúde Pública, Rio Janeiro.* 1995;11 (1): 128–136.
62. SINGER BH, CASTRO MC. Agricultural Colonization and Malaria on the Amazon Frontier. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;954: 184–222. doi:10.1111/j.1749-6632.2001.tb02753.x
63. GILBERTO HOCHMAN. From Autonomy to Partial Alignment: National Malaria Programs in the Time of Global Eradication, Brazil, 1941-1961. *CBMH/BCHM.* 2008;Volume 25: p. 161–192.
64. Griffing SM, Tauil PL, Udhayakumar V, Silva-Flannery L. A historical perspective on malaria control in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015;110: 701–718. doi:10.1590/0074-02760150041

65. Zeidemann VK. O rio das águas negras. Florestas do rio Negro. 2001. p. 61–87.
66. Goulding, M., Barthem, R., Ferreira E. The Smithsonian atlas of the Amazon. Washington; 2003.
67. Por FD. River hydrology. The Pantanal of Mato Grosso (Brazil). Springer Netherlands; 1995. p. 19–22. doi:10.1007/978-94-011-0031-1_7
68. Robinson EM, Jia M, Trumble SJ, Usenko S. Selective pressurized liquid extraction technique for halogenated organic pollutants in marine mammal blubber: A lipid-rich matrix. *J Chromatogr A*. 2015;1385: 111–115. doi:10.1016/j.chroma.2015.01.064
69. Tanabe S. Contamination and toxic effects of persistent endocrine disrupters in marine mammals and birds. *Mar Pollut Bull*. 2002;45: 69–77. doi:10.1016/S0025-326X(02)00175-3
70. Ramu K, Kajiwara N, Tanabe S, Lam PKS, Jefferson TA. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and organochlorines in small cetaceans from Hong Kong waters: Levels, profiles and distribution. *Mar Pollut Bull*. 2005;51: 669–676. doi:10.1016/j.marpolbul.2005.02.041
71. Kajiwara N, Kamikawa S, Ramu K, Ueno D, Yamada TK, Subramanian A, et al. Geographical distribution of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and organochlorines in small cetaceans from Asian waters. *Chemosphere*. 2006;64: 287–295. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.12.013
72. Ellisor D, McLellan W, Koopman H, Schwacke L, McFee W, Kucklick J. The distribution and stratification of persistent organic pollutants and fatty acids in bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) blubber. *Sci Total Environ*. Elsevier B.V.; 2013;463-464: 581–588. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.06.017
73. Méndez-Fernandez P, Galluzzi Polesi P, Taniguchi S, de O. Santos MC, Montone RC. Validating the use of biopsy sampling in contamination assessment studies of small cetaceans. *Mar Pollut Bull*. 2016;107: 364–369. doi:10.1016/j.marpolbul.2016.04.021
74. Wu Y, Shi J, Zheng GJ, Li P, Liang B, Chen T, et al. Evaluation of organochlorine contamination in Indo-Pacific humpback dolphins (*Sousa chinensis*) from the Pearl River Estuary, China. *Sci Total Environ*. Elsevier B.V.; 2013;444: 423–429. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.11.110
75. Rheims CA, Brescovit AD, Paulo S. On the Amazonian species of the genus *Scytodes* Latreille Amazonian genus Latreille (Arachnida), *Ar*. 2004;21: 525–533.
76. Torres JPM, Lailson-Brito J, Saldanha GC, Dorneles P, Malm O, Bastos WR, et al. Persistent Toxic Substances in the Brazilian Amazon: Contamination of Man and the Environment. *J Braz Chem Soc*. 2009;20: 1175–1179.
77. Azeredo A, Torres JPM, de Freitas Fonseca M, Britto JL, Bastos WR, Azevedo e Silva

- CE, et al. DDT and its metabolites in breast milk from the Madeira River basin in the Amazon, Brazil. *Chemosphere*. 2008;73: 246–251. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.04.090
78. Kannan K, Tanabe S, Tatsukawa R, Sinha RK. Biodegradation capacity and residue pattern of organochlorines in Ganges river dolphins from India. *Toxicol Environ Chem*. 1994;42: 249–61. doi:10.1080/02772249409358010
79. Yordy JE, Pabst DA, McLellan WA, Wells RS, Rowles TK, Kucklick JR. Tissue-specific distribution and whole-body burden estimates of persistent organic pollutants in the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *Environ Toxicol Chem*. 2010; n/a–n/a. doi:10.1002/etc.152
80. Das K, Vossen A, Tolley K, Víkingsson G, Thron K, Müller G, et al. Interfollicular Fibrosis in the Thyroid of the Harbour Porpoise: An Endocrine Disruption? *Arch Environ Contam Toxicol*. 2006;51: 720–729. doi:10.1007/s00244-005-0098-4
81. Schnitzler JG, Siebert U, Jepson PD, Beineke A, Jauniaux T, Bouquegneau J-M, et al. HARBOR PORPOISE THYROIDS: HISTOLOGIC INVESTIGATIONS AND POTENTIAL INTERACTIONS WITH ENVIRONMENTAL FACTORS. *J Wildl Dis*. 2008;44: 888–901. doi:10.7589/0090-3558-44.4.888
82. Wu B-Z, Chen H-Y, Wang SJ, Wai CM, Liao W, Chiu K. Reductive dechlorination for remediation of polychlorinated biphenyls. *Chemosphere*. 2012;88: 757–768. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.03.056

ANEXOS

Normas da revista PlosOne

<http://journals.plos.org/plosone/s/submission-guidelines>

Style and Format

File format

Manuscript files can be in the following formats: DOC, DOCX, RTF, or PDF. Microsoft Word documents should not be locked or protected.

LaTeX manuscripts must be submitted as PDFs. Read the LaTeX guidelines.

Length

Manuscripts can be any length. There are no restrictions on word count, number of figures, or amount of supporting information.

We encourage you to present and discuss your findings concisely.

Font

Use any standard font and a standard font size.

Headings

Limit manuscript sections and sub-sections to 3 heading levels. Make sure heading levels are clearly indicated in the manuscript text.

Layout

Manuscript text should be double-spaced.

Do not format text in multiple columns.

Page and line numbers

Include page numbers and line numbers in the manuscript file.

Footnotes

Footnotes are not permitted. If your manuscript contains footnotes, move the information into the main text or the reference list, depending on the content.

Language

Manuscripts must be submitted in English.

You may submit translations of the manuscript or abstract as supporting information. Read the supporting information guidelines.

Abbreviations

Define abbreviations upon first appearance in the text.

Do not use non-standard abbreviations unless they appear at least three times in the text.

Keep abbreviations to a minimum.

Reference style

PLOS uses “Vancouver” style, as outlined in the ICMJE sample references.

See reference formatting examples and additional instructions below.

Equations

We recommend using MathType for display and inline equations, as it will provide the most reliable outcome. If this is not possible, Equation Editor is acceptable.

Avoid using MathType or Equation Editor to insert single variables (e.g., “ $a^2 + b^2 = c^2$ ”), Greek or other symbols (e.g., β , Δ , or ' [prime]), or mathematical operators (e.g., \times , \geq , or \pm) in running text. Wherever possible, insert single symbols as normal text with the correct Unicode (hex) values.

Do not use MathType or Equation Editor for only a portion of an equation. Rather, ensure that the entire equation is included. Avoid “hybrid” inline or display equations, in which part is text and part is MathType, or part is MathType and part is Equation Editor.

Manuscript Organization

Manuscripts should be organized as follows. Instructions for each element appear below the list.

Beginning section

The following elements are required, in order: Title page: List title, authors, and affiliations as first page of manuscript

Abstract

Introduction

Middle section

The following elements can be renamed as needed and presented in any order:

Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusions (optional), Ending section
The following elements are required, in order: Acknowledgments, References, Supporting information captions (if applicable)

Other elements, Figure captions are inserted immediately after the first paragraph in which the figure is cited. Figure files are uploaded separately.

Tables are inserted immediately after the first paragraph in which they are cited. Supporting information files are uploaded separately.