



# UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências do Mar e do Meio Ambiente

**Estudo do Impacto do Ecoturismo na ictiofauna do Rio Sucuri (Bonito, MS, Brasil), utilizando as espécies de peixes *Crenicichla lepidota* (Heckel, 1840) e *Moenkhausia bonita* (Benine *et al.*, 2004) como indicadores**



**Ana Carolina Sinigali Alves Lima**

# **UNIVERSIDADE DO ALGARVE**

**Faculdade de Ciências do Mar e do Meio Ambiente**

**Estudo do Impacto do Ecoturismo na ictiofauna do Rio Sucuri (Bonito, MS, Brasil), utilizando as espécies de peixes *Crenicichla lepidota* (Heckel, 1840) e *Moenkhausia bonita* (Benine *et al.*, 2004) como indicadores**

**Ana Carolina Sinigali Alves Lima**

**Mestrado em Biologia Marinha com Especialização em Ecologia e Conservação Marinha**

**Tese de mestrado realizada com a colaboração do Instituto Superior de Psicologia Aplicada de Lisboa, com orientação externa do Professor Doutor Rui Oliveira (ISPA) e orientação interna do Professor Doutor Adelino Canário (UALG).**

**Faro**

**Setembro 2007**

Esta tese de mestrado é da inteira responsabilidade da autora

---

(Ana Carolina Sinigali Alves Lima)

## AGRADECIMENTOS

A realização desta tese de mestrado envolveu directa ou indirectamente a ajuda de várias pessoas às quais eu estou profundamente grata.

Em primeiro lugar não poderia deixar de agradecer à Equipa da Unidade de Investigação em Eco-etologia do Instituto Superior de Psicologia Aplicada de Lisboa por me ter acolhido tão prontamente e por terem sido tão prestáveis, em particular ao Professor Doutor Rui Oliveira, o meu “super” orientador, que não hesitou em apostar de forma entusiasta num projecto a ser realizado num local remoto, com muito pouco ou nenhum apoio. Por toda ajuda dispensada na fase de elaboração desta dissertação, pelo encorajamento e pela grande paciência. À Tânia Oliveira, principalmente pela amizade, mas também pela paciência demonstrada ao longo do processo laboratorial, por ser uma pessoa única. À Teresa Fagundes, Albert Ros, Magda Teles, David Gonçalves, João Saraiva e João Alpedrinha.

Ao Sr. Geraldo por ter aceite que a recolha de dados desta pesquisa tenha sido feita dentro dos limites da sua propriedade. À equipa do Rio Sucuri por ter acolhido uma “estranha” de coração aberto, não hesitando em fornecer qualquer tipo de apoio logístico, em especial ao João Henrique e a todos os guias da natureza pelas incríveis tardes a partilhar histórias e aventuras passadas em ambientes tropicais. Ao Raoni Rodrigues pela ajuda em campo na captura das espécies em estudo. À Regina Bonomini, pela amizade, pela partilha de experiências e pela casa.

Ao Doutor José Sabino, meu co-orientador brasileiro, sem o qual a realização deste projecto nunca teria sido possível.

Ao Professor Doutor Adelino Canário, por ter aceite ser meu co-orientador e pelas ideias inovadoras.

A todos os meus amigos sem excepção. Aos que me conhecem desde a escola secundária por terem estado sempre presentes ao longo das diferentes fases da minha vida, pela galhofa constante e por tornarem Lisboa mais bonita e divertida. À Marta Godinho em especial, a quem só palavras não seriam suficientes para agradecer a

amizade incondicional, o apoio, o sorriso nos momentos certos, as palavras de incentivo. À Martha Guerreiro pela amizade, conversas nos cafés e sessões fotográficas. À Mariana Coxe, pela inigualável e contagiante alegria de viver, por tantos anos de irmandade.

À minha família BMP. À Laura Leite, à Bárbara Costa, à Maria Pereira, à Helena Guimarães, à Ana Jesus, ao Jorge Assis, ao Francisco Pires, ao Diogo Tavares, ao João Tiago Tavares, à Catarina Ferreira e à Joana Miodonski pelos anos incríveis que pudemos partilhar!!!! Pelas mil e umas ideias constantes, pela descoberta dum novo mundo, pelas conversas intermináveis, pelo gosto em viver, pelos projectos, experiências, viagens, tristezas e alegrias, festas e jantares, pela partilha de sonhos... por serem quem são, por fazerem a vida valer a pena. Obrigado!

Ao Jacques Russelout, à Mafalda Ferreira e à Marisa Antunes, pelo apoio “espiritual”, pela paciência, pelo carinho dispensado nos momentos de crise, por terem sempre a mão estendida e pronta a ajudar.

À minha família. Pelo apoio incondicional sempre presente, apesar da distância. À minha “boadrasta” Cláudia Krauss a quem eu devo tantas coisas boas, tanto apoio e amor. Aos meus dois queridos irmãos Arthur e Aline por serem a coisa mais preciosa que eu tenho nesta vida, pela inspiração e pelo brilho no olhar de quem tem uma vida inteira de sonhos pela frente.

Aos meus pais, a quem dedico este trabalho. Por serem duas pessoas extraordinárias, fontes de inspiração para a minha busca em ser uma pessoa melhor, ir mais além, concretizar os meus sonhos e não esmorecer perante as adversidades. Por me fazerem ver que “até a Lua é possível”, que é preciso ter perseverança e coragem em continuar sempre. Pelo apoio, amor e principalmente paciência incondicionais. Por acreditarem sempre em mim e por me terem proporcionado o caminho que me guiou até aqui. Muito Obrigado!

**“Cansamo-nos de tudo, menos de compreender.”**

**Virgílio**

## RESUMO

O Ecoturismo é na indústria de Turismo e Viagens o sector que apresenta maior crescimento, resultando no aumento da procura de destinos ecoturísticos em todo o mundo. A sua contribuição para a protecção da biodiversidade é controversa, podendo o seu aumento interferir no equilíbrio natural dos ecossistemas, afectando a diversidade e a eco-etologia das espécies. O objectivo deste estudo consistiu em avaliar o impacto do ecoturismo na ictiofauna do Rio Sucuri localizado em Bonito, Mato Grosso do Sul, Brasil, utilizando as espécies de peixes *Crenicichla lepidota* e *Moenkhausia bonita* como indicadores, tendo sido utilizados de forma integrada critérios ecológicos, comportamentais e fisiológicos. Para tal foram determinadas duas áreas distintas de amostragens no rio: (1) num local sem qualquer tipo de impacto humano; (2) num local onde ocorrem visitas turísticas diárias. Para ambas foi realizada uma caracterização ecológica, tendo sido utilizado o método de censos visuais em pontos fixos na determinação da composição e estrutura da comunidade íctia, seguido da recolha de dados comportamentais para as duas espécies em estudo através dos métodos “*ad libitum*” e “animal focal”. Foram ainda determinados os níveis da hormona cortisol utilizando métodos não-invasivos de modo a avaliar o impacto do ecoturismo na resposta ao stress da espécie *M. bonita*. Os resultados obtidos indicam que na área exposta ao turismo há um aumento significativo da riqueza específica, densidade e diversidade. No entanto, *C. lepidota* apresenta mudanças significativas a nível do seu comportamento alimentar, agonístico, de fuga, e guarda do ninho, e *M. bonita* apresenta mudanças significativas não só a nível do seu comportamento alimentar e de fuga, mas também a nível da sua fisiologia. Contrariamente aos dados ecológicos, os últimos resultados poderão ser interpretados, numa primeira análise, como um impacto negativo do ecoturismo nestas duas espécies.

**Palavras-chave:** Bonito, Ecoturismo, impacto ambiental, *Moenkhsuia bonita*, *Crenicichla lepidota*, censos visuais, comportamento, resposta ao stress, cortisol

## ABSTRACT

Bonito is an important ecotouristic destination in Brazil and the main challenge of sustainable ecotourism here has been to accommodate and adjust the increase of tourists without compromising the ecological integrity of the local ecosystems. In this study we proposed to assess the environmental impact of ecotourism on the ictiological fauna of Sucuri River, located in Bonito, MS, Brazil, using the fish species *Crenicichla lepidota* and *Moenkhausia bonita* as indicators, integrating ecological, behaviour and physiological criteria. Two distinct areas of the river were defined: (1) where no tourists were allowed, hence without any impact (*non-impact* area), and (2): where the daily visits occur (*impact* area). An ecological characterization for each area was performed as well the assessment of the local variation in diversity and abundance of the ictiological fauna by the underwater visual censuses method of “stationary point count”. The methods of “*ad libitum*” and “focal animal” were used to collect behaviour data for both study species and the cortisol response of *M. bonita* to a stress protocol consisting of capture, transport and confinement was measured from holding-water. Results showed a significantly increase in species richness, density and diversity in the *impact* area. The behaviour patterns of Feeding, Nest protection, Agonistic activity and Escape behaviour varied significantly between the two study areas for *C. lepidota* as well as Feeding and Escape behaviour for *M. bonita*, which showed a significantly higher cortisol concentration in the *impact* area. In opposition to the ecological results, the behaviour and physiology ones may be interpreted as a negative impact of the ecotourism in the two study species.

**Keywords:** Bonito, Ecotourism, environmental impact, *Moenkhsuia bonita*, *Crenicichla lepidota*, visual censuses, behaviour, stress response, cortisol

# ÍNDICE

<b>I. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1. O ECOTURISMO E A REGIÃO DE BONITO (MS, BRASIL) .....	1
2. MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DE IMPACTO AMBIENTAL – <i>STRESS FISIOLÓGICO E COMPORTAMENTAL</i> .....	3
3. ESPÉCIE EM ESTUDO .....	6
4. OBJECTIVO.....	7
<b>II. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>8</b>
1. DESCRIÇÃO DA ÁREA EM ESTUDO .....	8
2. CARACTERIZAÇÃO ECOLÓGICA .....	10
2.1. <i>Composição e Estrutura da Comunidade Íctia</i> .....	11
3. RECOLHA DE DADOS COMPORTAMENTAIS .....	13
3.1. <i>Etograma das espécies em estudo</i> .....	14
3.1.1. <i>C. lepidota</i> .....	14
3.1.2. <i>M. bonita</i> .....	16
3.1.3. <i>Padrões Comuns Às Duas Espécies</i> .....	17
4. RECOLHA DE DADOS HORMONAIIS .....	18
4.1. <i>Radioimunoensaio (RIA)</i> .....	20
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	22
5.1. <i>Caracterização Ecológica</i> .....	22
5.1.1. <i>Composição e Estrutura da Comunidade Íctia</i> .....	22
5.1.1.1. <i>Composição e Dinâmica da Comunidade</i> .....	22
5.1.1.2. <i>Dinâmica Estrutural da Comunidade</i> .....	22
5.2. <i>Dados Comportamentais</i> .....	24
5.3. <i>Dados Hormonais</i> .....	25
<b>III. RESULTADOS .....</b>	<b>26</b>
1. CARACTERIZAÇÃO ECOLÓGICA .....	26
1.1. <i>Perfis Subaquáticos</i> .....	26
1.2. <i>Tipo de Fundo, Vegetação Subaquática, Velocidade da Corrente, Visibilidade e Temperatura</i> .....	27
1.3. <i>Composição e Estrutura da Comunidade Íctia</i> .....	28
1.3.1. <i>Composição e Dinâmica da Comunidade</i> .....	28
1.3.2. <i>Dinâmica Estrutural da Comunidade</i> .....	29
1.3.1.1. <i>Contribuição das espécies para o grau de similaridade</i> .....	30
2. DADOS COMPORTAMENTAIS .....	31
2.1. <i>Observação “ad libitum”</i> .....	31
2.1.1. <i>Ponto sem Turismo</i> .....	31
2.1.2. <i>Ponto com Turismo</i> .....	32
2.2. <i>Observação “animal focal”</i> .....	32
2.2.1. <i>Resultados Globais do Impacto Antropogénico</i> .....	32
2.3. <i>Variação Diária</i> .....	34
2.3.1. <i>C. lepidota</i> .....	34
2.3.1. <i>M. bonita</i> .....	39

<b>2.4. Diferenças antes e depois da primeira perturbação no mesmo local</b>	<b>42</b>
<b>2.5. Número total de turistas por dia</b>	<b>46</b>
2.5.1.C. <i>lepidota</i>	46
2.5.2. <i>M. bonita</i>	48
<b>3. DADOS HORMONAIIS</b>	<b>49</b>
<b>IV. DISCUSSÃO</b>	<b>50</b>
<b>1. CARACTERIZAÇÃO ECOLÓGICA DOS PONTOS DE AMOSTRAGEM</b>	<b>50</b>
<b>1.1. Tipo de Fundo, Vegetação Subaquática, Velocidade da Corrente, Profundidade, Visibilidade e Temperatura</b>	<b>50</b>
<b>1.2. Composição e Estrutura da Comunidade Íctia</b>	<b>51</b>
1.2.1. <i>Composição e Dinâmica da Comunidade</i>	51
1.2.2. <i>Dinâmica Estrutural da Comunidade</i>	52
<b>2. DADOS COMPORTAMENTAIS</b>	<b>54</b>
<b>3. DADOS HORMONAIIS</b>	<b>61</b>
<b>V. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>63</b>
<b>VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>64</b>
<b>VII. ANEXOS</b>	<b>76</b>

## I. INTRODUÇÃO

### 1. O Ecoturismo e a Região de Bonito (MS, Brasil)

O Ecoturismo é o sector da actividade turística que pretende utilizar de forma sustentada o património natural e cultural, de modo a promover a sua conservação e a formação de uma consciência ambiental através da interpretação do ambiente (Willink *et al.*, 2000). Actualmente, representa na indústria de Turismo e Viagens o sector que apresenta maior crescimento, resultando no aumento da procura de destinos ecoturísticos em todo o mundo (Rome, 1999).

O impacto do ecoturismo em áreas protegidas tem sido negligenciado, salvo algumas excepções (Jacob & Lopez, 1994; Culik & Wilson, 1995; Evans, 1996). A sua contribuição para a protecção de habitats e espécies é controversa (Duffus & Dearden, 1990; King & Stewart, 1996) e estudos prévios sugerem que os animais raramente beneficiam de interacções directas com humanos (Buchholz, 1997). Um maior número de estudos sobre os factores de stress inerentes a esta actividade, assim como uma avaliação do seu impacto a nível da vida selvagem são imprescindíveis, de modo a garantir a salvaguarda do património natural (Almada *et al.*, 1999).

A prática correcta do ecoturismo requer o estabelecimento de protocolos de visita que visam minimizar o conflito entre a actividade lúdica e a conservação da natureza de modo a preparar o visitante para compreender e respeitar as características dos locais (Cole, 1993; Niefer & Silva, 1999; Mitraud, 2001; Sabino & Andrade, 2002). Esta atitude é justificada pelo facto de que, quando mal conduzida, a actividade turística pode afectar negativamente algumas componentes sensíveis do ecossistema (Bratton, 1985; Garber & Burger, 1995; Lacy & Martins, 2003; Muller *et al.*, 2004). Os sintomas iniciais de um impacto negativo são normalmente de difícil percepção, especialmente quando os dados disponíveis para uma comparação de base são poucos ou inexistentes (Rome, 1999). Nos países em vias de desenvolvimento os estudos de caracterização populacional raramente são realizados a tempo útil, os orçamentos e recursos são limitados, assim como as necessidades de conservação normalmente não são percebidas a tempo (Rome, 1999).

A região de Bonito, localizada no Planalto da Bodoquena, Mato Grosso do Sul, destaca-se no cenário brasileiro como exemplo de práticas de ecoturismo (Sabino, 2002). Os rios do município de Bonito apresentam águas de elevada transparência e uma rica biodiversidade, combinadas com cenários de beleza singular que atraem cerca de 80 mil turistas por ano para a região (Boggiani, 1999).

Estudos de Willink *et al.* (2000) mostraram que as actividades turísticas promovidas em Bonito, quando realizadas de modo a respeitarem certos períodos limites de visita, têm mantido os ecossistemas bem preservados. No entanto, o aumento destas actividades poderá interferir no equilíbrio natural dos ecossistemas, afectando a diversidade e a ecologia das suas espécies (Sabino & Andrade, 2003).

O desconhecimento biológico acentua o problema de gestão dos rios de Bonito, visto que são poucos os estudos publicados sobre caracterização e descrição de espécies aquáticas da região (e.g., Sabino & Trajano 1997; Scremin-Dias, 1999; Willink *et al.*, 2000). Este desconhecimento, aliado ao crescente fluxo turístico e suas pressões inerentes, torna o local prioritário para estudos ecológicos, considerando a premissa de que quaisquer actividades de manejo e conservação devem ser precedidas de pesquisas adequadamente adaptadas às condições ecológicas locais (Lindberg & Hawkins, 1993; Takahashi, 1997).

Dados oficiais do Conselho Municipal de Turismo de Bonito (COMTUR), de acordo com Sabino & Andrade (2003), apontam para o crescimento da actividade turística da região, com aproximadamente 60 mil visitantes em 2002. Acomodar e ajustar o crescente número de visitantes em áreas naturais, sem sacrificar sua integridade ecológica, tem-se tornado o desafio central do turismo sustentável em Bonito (Cifuentes, 1992; Takahashi, 1997; Mitraud, 2001; Sabino & Andrade, 2002). As pesquisas ecológicas realizadas nesta região, para além de ampliarem o conhecimento dos seus sistemas naturais, geram também informações para o estabelecimento de uma política de impacto mínimo, assim como subsidiam o licenciamento ambiental da área, feito pela Secretaria de Estado de Meio Ambiente, Cultura e Turismo do Mato Grosso do Sul (SEMACT) (Sabino & Andrade, 2002).

## **2. Métodos de Avaliação de Impacto Ambiental – *Stress Fisiológico e Comportamental***

O impacto ambiental é definido pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente do Brasil como "qualquer alteração das propriedades físicas, químicas e biológicas do meio ambiente causada por qualquer forma de matéria ou energia resultante das actividades humanas que directa ou indirectamente, afectam: I – a saúde, a segurança e o bem-estar da população; II – as actividades sociais e económicas; III – o ecossistema; IV – as condições estéticas e sanitárias do meio ambiente; e V – a qualidade dos recursos ambientais" (Rocha, 1997).

A Avaliação de Impacto Ambiental (AIA) é estabelecida a partir de Estudos de Impacto Ambiental. Estes, consistem num diagnóstico ambiental cujos objectivos são os de identificar, prevenir, medir e interpretar, quando possível, os impactos ambientais (Rocha, 1997). Os métodos utilizados na AIA baseiam-se numa análise de parâmetros que permitem a qualificação e quantificação do impacto, de modo a tornar possível a determinação da magnitude de importância deste (Rocha *et al.*, 2001). Os parâmetros mais frequentemente utilizados na avaliação do impacto infligido à fauna são os índices ecológicos (e.g.: riqueza específica, diversidade, densidades e abundâncias) (Mitraud, 2001; Garay & Dias, 2001; Sabino & Andrade, 2002). No entanto, estudos que aplicam outras metodologias como alterações comportamentais (Godfrey & Barreto, 1995; Shumway, 1999) e detecção de stress fisiológico (Mullner *et al.*, 2004; Wysocki *et al.*, 2006) têm demonstrado resultados significativamente importantes para a conservação de espécies expostas a acções de carácter antropogénico. A escolha da melhor metodologia a aplicar será do critério de cada investigador, de acordo com as exigências e características do local (Rocha *et al.*, 2001).

A detecção do stress e das suas causas nas populações de peixes é difícil, porém é cada vez mais importante para que muitos recursos naturais possam geridos de modo eficaz (Jaworska *et al.*, 1997). Como o stress pode surgir a partir de práticas de ecoturismo mal conduzidas, a sua detecção precoce será vital para assegurar a manutenção das espécies nos seus ambientes naturais.

Os factores de stress actuam nos organismos ameaçando ou alterando a sua homeostasia e iniciando um processo integrado de resposta. Este é composto por um conjunto de respostas adaptativas que reajustam os processos metabólicos, de forma a poder combater o efeito do factor de stress (Morrow *et al.*, 2004). A resposta ao stress é caracterizada pela activação do sistema neuroendócrino, resultando numa sequência de alterações fisiológicas e metabólicas que permitem a um organismo superar um ambiente potencialmente hostil (van der Boon *et al.*, 1991; Pickering, 1992; Wendelaar Bonga, 1997). Esta resposta divide-se em três fases: primária, secundária e terciária (Schreck, 1982; Barton & Iwama, 1991).

A resposta primária inclui a activação do eixo hipotálamo-pituitária-interrenal (HPI), com a produção de corticosteroides como factores endócrinos e do eixo hipotálamo-simpático-cromafina (HSC) que possui as catecolaminas como principais mensageiros (Bonga & Balm, 1999). A resposta primária do eixo HPI a um factor de stress é iniciada pelo desenvolvimento de uma sequência neuroendócrina desencadeada pela libertação da hormona libertadora de corticotrofina (CRH) a partir do hipotálamo. Este factor endócrino promove a síntese e libertação de hormona adrenocorticotrópica (ACTH) das células corticotrópicas da hipófise anterior. Esta irá actuar ao nível do tecido interrenal, com receptores com elevada afinidade para a ACTH, que irão desencadear a síntese de corticosteroides e a sua posterior libertação no sangue (Wendelaar Bonga, 1997; Barton *et al.*, 2002; Lankford *et al.*, 2003). Os corticosteroides, de entre os quais o principal nos peixes teleósteos é o cortisol (Idler & Truscott, 1972; Pickering, 1998), e as catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) encontram-se directa ou indirectamente envolvidos nas respostas secundária e terciária ao factor de stress (Binuramesh *et al.*, 2005). A resposta secundária inclui os efeitos destas hormonas na promoção de processos de mobilização de energia (Pickering, 1981), aumentando a actividade das enzimas envolvidos na gluconeogénese e as aminotransferases no fígado (Davis *et al.*, 1985; van der Boon *et al.*, 1991; Vijayan *et al.*, 1991, 1994, 1996; Mommsen *et al.*, 1999). A elevação dos níveis plasmáticos de cortisol é reconhecida como a principal resposta hormonal ao stress, estando associada à mobilização das reservas energéticas dos peixes. Esta mobilização pretende promover uma resposta dos organismos às condições adversas a que foram sujeitos (Pickering, 1998). Assim, o papel metabólico do cortisol nos peixes demonstra-se significativo. (Leach & Taylor, 1980; Moberg, 1985; Vijayan *et al.*, 1997; Diouf *et al.*, 2000).

As respostas primárias e secundárias são consequências a curto prazo dos efeitos causados por desafios agudos de pouca duração (Adams *et al.*, 2002). Quando uma resposta ao stress é prolongada ou repetida (Schreck, 2000), e o peixe não tem meios de evitar ou escapar ao desafio, uma série de efeitos terciários tornam-se aparentes, incluindo mudanças no sistema imunitário funcional, resistência a doenças, crescimento e reprodução. Tal como nos mamíferos, a ligação mais conhecida entre o stress e o estado do sistema imunitário nos peixes é através dos efeitos do cortisol (Wendelaar Bonga 1997). As células envolvidas na resposta imunitária contém receptores de cortisol e concentrações elevadas desta hormona podem suprimir muitos aspectos da função imunitária (Maule & Shreck, 1990). Uma das consequências das mudanças induzidas pelo stress consiste no facto de que uma exposição crónica a condições adversas poder fazer com que os peixes se tornem mais vulneráveis às doenças, existindo inúmeros registos de doenças bacteriológicas induzidas pelo stress (Plumb, 1994). Muitos autores sugerem que os efeitos do stress fisiológico, para além da resistência a doenças, podem ser responsáveis por consequências negativas severas em processos como o crescimento, reprodução (Pickering, 1992), ou mesmo ao nível da hierarquia social ou do comportamento migratório (Lewynsky & Bjornn, 1987; Mäkinen *et al.*, 2000).

Avaliar a resposta hormonal ao stress em qualquer animal é sempre difícil, uma vez que o próprio processo de amostragem pode induzir stress, especialmente quando o indivíduo é manipulado para que seja necessário avaliar parâmetros bioquímicos no sangue (Pickering, 1981). Deste modo, os métodos não invasivos, como a extracção de hormonas na água libertadas pelo peixe, têm vindo a ser sugeridos como métodos alternativos ao doseamento do cortisol no plasma, mais invasivo e que pode aumentar a actividade do eixo HPI durante a recolha de sangue (Scott & Sorensen, 1994; Oliveira *et al.*, 1999, 2003; Scott *et al.*, 2001; Hirschenhauser *et al.*, 2002, 2004; Turner *et al.*, 2003; Ellis *et al.*, 2004; McCallister *et al.*, 2004).

Um dos sinais mais imediatos de um estado de stress nos peixes é uma resposta comportamental (Iwama, 2004). Este tipo de resposta faz parte de uma primeira linha de defesa animal contra mudanças adversas no meio ambiente, muitas vezes sendo desencadeada pelos mesmos estímulos que dão início à resposta primária ao stress (Adams, 2002). A resposta comportamental específica depende do tipo de stress

subjacente. Por exemplo, após um ataque por outro peixe da mesma espécie, o indivíduo pode fugir, esconder-se ou adoptar uma postura submissa, normalmente acompanhada por uma mudança da coloração corporal (e.g. O'Connor *et al.*, 2000). Quando atacado por um predador, um peixe poderá ficar inerte (“freezing”) (e.g. Goodey & Liley, 1985), ou procurar por um abrigo (e.g. Brown & Warburton, 1999). A alimentação poderá também ser suprimida, ou estratégias de alimentação ineficiente poderão ser adoptadas (Hart, 1997), assim como o evitar áreas nas quais já tenha sido atacado (Lima, 1998).

O modo como um animal se comporta irá determinar a sua sobrevivência e o seu sucesso reprodutor. Como tal, o comportamento poderá afectar a estrutura de uma população (Shumway, 1999). Actividades como a aquisição de comida, fuga de predadores, captura de presas, migração e preferência de habitat são críticas para a sobrevivência do organismo, sendo usados como indicadores de stress ambiental (Little, 2002). Um conhecimento mais específico do comportamento de uma determinada espécie poderá ajudar na predição da vulnerabilidade desta a mudanças ambientais de carácter antropogénico, assim como na atenuação do stress resultante dessas mesmas mudanças (Jaworska *et al.*, 1997).

### 3. Espécie em estudo

As comunidades neotropicais de peixes de água doce são caracteristicamente ricas em espécies e apresentam complexas inter-relações entre seus componentes (Lowe-McConnel, 1987). As espécies de peixes teleósteos, *Crenicichla lepidota* (Heckel, 1840) (Cichlidae) e *Moenkhausia bonita* (Benine *et al.*, 2004) (Characidae), são facilmente encontradas nas águas dos rios de Bonito, apresentando, no entanto, características bastante distintas entre elas.

A espécie *C. lepidota* tem hábitos diurnos, permanecendo inactiva entre frestas de rochas e vegetação marginal durante a noite, apresenta cuidados biparentais e mudanças de coloração corporal (Paixão & Sabino, 1999); a sua dieta é composta principalmente por insectos aquáticos (Ephemeroptera, Trichoptera, Diptera, Odonata, Psocoptera, Heteropter), insectos terrestres (Coleoptera e Diptera), crustáceos (*Trichodactylus* e *Macrobrachium*) e algumas espécies de peixes (Cichlidae). Esta espécie é considerada

como um dos principais bioindicadores de qualidade dos rios da região de Bonito, por ser residente, ter requisitos específicos de uso de habitat (como ninhos no substrato) e ocupar uma posição privilegiada na cadeia alimentar (Sabino, 2003).

A espécie *M. bonita* foi recentemente descrita por Benine *et al.*, (2004), no Rio Baía Bonita, um efluente do Rio Miranda, bacia do Rio Paraguai, no Sudoeste do Brasil, existindo muito pouco conhecimento a seu respeito. De acordo com os mesmos autores, ocorre principalmente próximo à superfície em cardumes de 10 a 30 indivíduos, em zonas de baixa corrente, alimentando-se sobretudo, de insectos terrestres (Coleoptera e Diptera), constituindo um importante componente da cadeia alimentar, especialmente para as outras espécies de peixes, de aves e de outros carnívoros que vivem na planície de inundação.

O valor intrínseco destas espécies para o local e a possível ameaça do crescente impacto ambiental como consequência do aumento do ecoturismo nesta região, justifica a importância da sua escolha para este estudo.

#### **4. Objectivo**

O objectivo deste estudo consistiu em avaliar o impacto do ecoturismo na ictiofauna do Rio Sucuri localizado em Bonito, Mato Grosso do Sul, Brasil, utilizando as espécies de peixes *C. lepidota* e *M. bonita* como indicadores, e tendo sido utilizados de forma integrada critérios ecológicos, comportamentais e fisiológicos.

## II. MATERIAIS E MÉTODOS

### 1. Descrição da Área em Estudo

Este estudo foi realizado no Rio Sucuri (Figura 1), de 1800 metros de extensão desde a nascente até à sua foz. O Rio faz parte da Reserva Particular de Património Nacional (RPPN) Fazenda São Geraldo, localizada no município de Bonito, no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil (Figura 2), com sede nas coordenadas geográficas 21° 25' 49'' S e 56° 57' 01'' W (Sistema Geodésico de Referência SAD-69) (Costacurta, 2005).

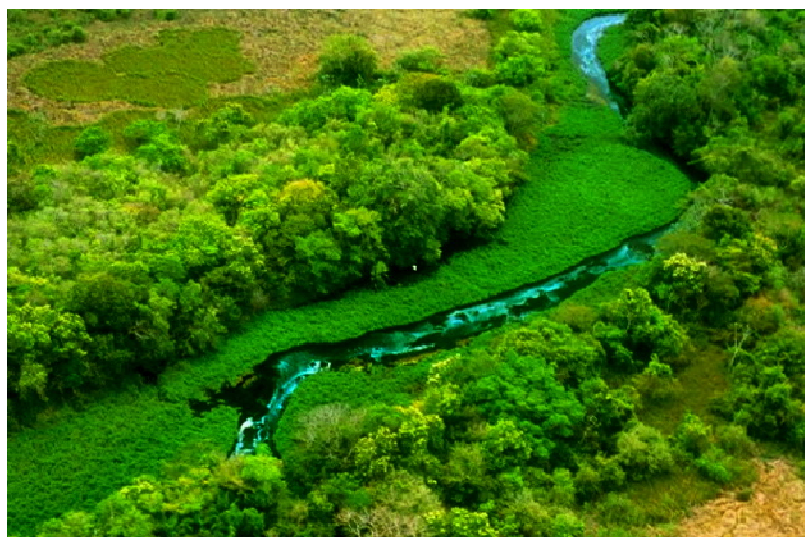


Figura 1 – Vista aérea do Rio Sucuri, Bonito, Mato Grosso do Sul, Brasil (Sabino, 2004).



No Rio Sucuri efectua-se a prática de Ecoturismo através de mergulho livre (snorkeling”) ao longo de 1800 metros do rio, com uma duração aproximada de 50 minutos e que se inicia a cerca de 200 metros da sua nascente. Esta flutuação é realizada normalmente por grupos de 8 turistas mais 1 guia entre as 9h00 e as 16h00 e exige o uso obrigatório de um equipamento por parte dos visitantes que consiste num fato de neoprene, máscara, tubo e um colete de flutuabilidade. Durante a época alta (entre finais de Dezembro e início de Março), assim designada por apresentar maior actividade turística, o número de visitantes que efectuam a flutuação por dia pode chegar a mais de 150, não se verificando um intervalo regular entre os grupos que descem o rio.

## 2. Caracterização Ecológica

Duas áreas de estudo foram escolhidas em locais distintos do Rio Sucuri de modo a que fosse possível avaliar o grau de influência antropogénica causado pela presença diária de turistas no rio. Para tal, foi determinado um ponto de amostragem num local sem qualquer tipo de impacto humano, onde a presença de turistas não é permitida, denominado *Ponto sem Turismo*; e um segundo ponto de amostragem onde decorrem visitas turísticas diárias, denominado *Ponto com Turismo*, por ser o local onde os turistas iniciam a actividade no rio.

Para ambos foi realizada uma caracterização ecológica de modo a avaliar-se a sua semelhança em termos qualitativos e quantitativos. As observações subaquáticas foram realizadas de acordo com a metodologia de estudos naturalísticos proposta por Sabino & Andrade (2002), para ambientes continentais, com águas transparentes no Brasil (ANEXO I). Para tal foram analisados os seguintes parâmetros entre Dezembro de 2005 e Março de 2006: *vegetação subaquática* através de observação local e fotografia subaquática (Olympus 8080); *tipo de fundo*, por observação e análise local; *visibilidade vertical*, através do Disco de Sechi; *visibilidade horizontal* através de uma fita métrica; *largura e profundidade*, medidos através de uma fita métrica; e em Março de 2007: *velocidade da corrente*, através de um fluxómetro mecânico - General Oceanics modelo 2030 R6 (medições de 30 segundos com 3 réplicas); *temperatura*, através de um termómetro subaquático e *composição e estrutura da comunidade íctia*, através do método de censos visuais em pontos fixos (Labrosse *et al.*, 2002).

## 2.1. Composição e Estrutura da Comunidade Íctia

Os métodos e censos visuais subaquáticos têm sido usados para a determinação da densidade de peixes desde a década de 50 (Brock, 1954; Harmelin-Vivien *et al.*, 1985). São normalmente rápidos, não acarretam custos elevados e não destroem o ambiente natural, sendo particularmente vantajosos quando se fazem amostragens de espécies em habitats sensíveis, ou em áreas com estatutos de protecção, por serem não destrutivos e por terem um impacto mínimo, tanto nas comunidades da amostragem, como no próprio ambiente (Sale & Sharp, 1983). As técnicas de censos visuais subaquáticos, assim como todos os métodos de censos de campo, são selectivos de acordo com factores como tamanho, aparência e comportamento dos organismos alvo (Graham *et al.*, 2004). O método óptimo irá variar de acordo com a situação apresentada, com os objectivos do estudo, com a logística disponível, com as características das espécies alvo, com a experiência do observador, com a visibilidade, profundidade, tipo de habitat e velocidade da corrente.

No caso do presente estudo, devido às características ecológicas verificadas, como uma elevada velocidade da corrente, que implica uma inerente dificuldade do observador para registar manualmente a abundância observada, pouca profundidade, que permite uma visualização de 100% dos habitats a partir da superfície onde se encontra o observador, e espécies alvo com comportamentos e habitats heterogéneos, que variam de pelágicas muito expostas a bênticas e crípticas, o método escolhido foi o de contagens em pontos fixos (“stationary point counts”) (Labrosse *et al.*, 2002), em detrimento de transectos. Os resultados obtidos por Bortone *et al.* (1989), sugerem que este método é o mais indicado para contagens de peixes em biótopos com uma grande diversidade de microhabitats. De entre as 34 espécies descritas para o Rio Sucuri, foram escolhidas 14 (*Ancistrus* sp., *Astyanax* sp., *Acestrorhynchus pantaneiro*, *Aequidens plagiozonatus*, *Brycon hilarii*, *Bryconops* sp., *Crenicichla lepidota*, *Crenicichla vitatta*, *Hyphessobrycon eques*, *Leporinus friderici*, *Moenkausia bonita*, *Prochilodus lineatus*, *Phenacogaster tegatus*, *Steindachnerina brevipinna*), por terem sido as únicas registadas durante as observações preliminares nos pontos determinados. A densidade, diversidade e riqueza específicas foram calculadas a partir do método referido e para tal foi adaptado o método de Labrosse *et al.* (2002), no qual foram definidos 3 pontos fixos de observação para cada área de estudo (Sem Turismo vs. Com Turismo), localizados a

meio do leito do rio, sem se sobreporem. Deste modo, foram seleccionados 6 pontos fixos de observação (3 Sem Turismo e 3 Com Turismo). Para cada um dos pontos foi definido um raio de 3 metros para o círculo de observação, medido inicialmente com uma fita métrica. Sem sair do mesmo ponto à superfície, o observador, em mergulho livre, girou lentamente ao longo do círculo ( $360^\circ$ ) enquanto observava as espécies, assumindo que todas as espécies que entram no diâmetro do círculo são observadas (Figura 3). Para cada ponto foram realizadas 3 observações por dia às: 9h, 13h e 16h, tendo sido realizados 3 replicados de 5 minutos para cada um dos pontos nos diferentes horários durante o mês de Março de 2007. No total foram realizados 18 dias de trabalho com observações em 3 pontos por dia, resultando num total de 54 contagens em 6 pontos com 3 replicados cada: 162 replicados. Cada um dos pontos teve um total de 27 replicados. Após observações preliminares constatou-se que não havia uma diferença evidente entre a mobilidade das espécies alvo, que se mantinham durante a maior parte do tempo dentro da mesma área de observação e, como tal, todas as espécies amostradas foram contadas durante os 5 minutos de cada um dos 3 replicados.

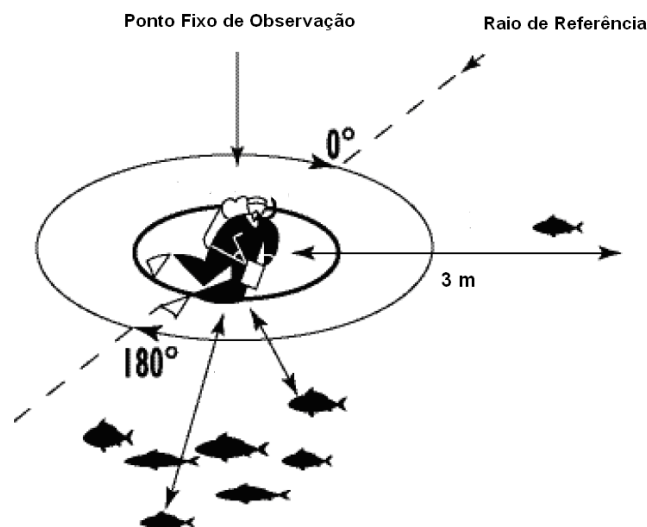


Figura 3 – Ilustração do método de censos visuais em ponto fixo, num círculo de observação de raio 3 metros (adaptado de Labrosse *et al.* 2002).

### 3. Recolha de Dados Comportamentais

Os dados relativos ao comportamento das duas espécies em estudo foram recolhidos a partir de observações subaquáticas realizadas através de mergulho livre (“snorkeling”), de acordo com a metodologia semelhante à adoptada por Sazima (1986) e Sabino & Castro (1990). As anotações subaquáticas foram registadas a lápis numa placa de pvc. As observações nos dois pontos fixos de observação do Rio Sucuri ocorreram entre os dias 30 de Outubro de 2005 a 20 de Fevereiro de 2006.

Após observações preliminares, determinou-se a duração das observações quantitativas de modo a respeitar as características comportamentais de cada espécie. Para *C. lepidota* foram realizadas observações de 3 minutos intercaladas de 5 minutos de descanso e para *M. bonita* de 1 minuto, intercaladas de 3 minutos de descanso, efectuadas do nascer ao pôr-do-sol (6h00-19h00).

Inicialmente foi utilizada uma estratégia de amostragem “*ad libitum*” (Martin & Bateson, 1993), adequada para descrever aspectos gerais do comportamento, incluindo a distribuição espacial e período de actividade das espécies em estudo, totalizando 5h de observações para cada espécie. Posteriormente, foram realizadas observações “animal-focal” para a quantificação dos padrões de comportamentos seleccionados (Martin & Bateson, 1993), em que um único indivíduo foi o foco das observações durante o tempo de amostragem pré-estabelecido. Este método é um dos mais usados em estudos comportamentais de peixes (e.g., Sazima, 1986; Buck & Sazima, 1995; Sabino & Zuanon, 1998). Para a espécie *C. lepidota* foram efectuadas 21h de observações em cada ponto totalizando 42 horas de observação. Para a espécie *M. bonita* foram efectuadas 14h de observação em cada ponto totalizando 28h de amostragem.

### **3.1. Etograma das espécies em estudo**

De acordo com Lehner (1979), a definição das unidades comportamentais depende do tipo de questão colocada, sendo em último caso, o reflexo das preocupações e objectivos do investigador. Deste modo, e tal como sugerido pelo mesmo autor, as unidades comportamentais devem ser discretas e definidas com precisão, de modo a que se possa distinguir o fim e o começo de cada uma, e homogéneas, ou seja, todos os actos incluídos na mesma categoria comportamental devem possuir as mesmas características. Tendo em consideração estes factores, elaborou-se um etograma para cada uma das espécies em estudo. Este inclui somente os padrões comportamentais escolhidos para serem quantificados neste estudo.

#### *3.1.1. C. lepidota*

(adaptado de Paixão & Sabino, 1999)

#### *Padrões Alimentares*

##### **Captura de Pequenas Presas** (“picking at relatively small prey”)

O indivíduo assume uma posição oblíqua em relação ao fundo, com a cabeça para baixo, deslocando-se bem próximo ao leito do rio e movimentando o globo ocular de modo a inspeccionar visualmente o leito. Quando detecta a presa, inclina o corpo de modo a abocanhá-la.

##### **Apanha de Itens Arrastados** (“drift feeding”)

O indivíduo, em posição de pairar a cerca de 2-3 cm do substrato, capta itens alimentares que são trazidos pela corrente. Pode mover o corpo em direcção da partícula, ou só movimentar a cabeça lateralmente no momento do abocanhar.

##### **Perseguição** (“chasing”)

Na coluna de água, o indivíduo dirige-se em natação rápida em direcção ao alimento e, estando já muito próximo, abocanha-o. Normalmente este comportamento é observado para indivíduos de maiores dimensões (superiores a 10 cm).

### **Mordiscar no Substrato** (“picking up substrate and sorting prey”)

O indivíduo assume uma posição oblíqua em relação ao fundo, com a cabeça para baixo, deslocando-se bem próximo ao leito do rio e movimentando o globo ocular de modo a inspeccionar visualmente o leito. Inclina o corpo empurrando a boca contra o substrato introduzindo uma certa quantidade deste na cavidade bucal. O peixe mastiga e após algum tempo expelle as partículas de substrato.

### *Padrões de Guarda do ninho*

#### **Vigilância**

O indivíduo de dentro do ninho ou de uma posição muito próxima a este coloca-se em posição de ataque, de frente para os indivíduos que se aproximem demasiado.

#### **Inspeção à entrada do Ninho**

O indivíduo realiza movimentos de natação lenta próximo à entrada do ninho, voltando a entrar neste de seguida.

### *Padrões Sexuais e Cuidados Parentais*

#### **Corte**

A fêmea, apresentando uma coloração nupcial de intenso avermelhado na região ventral, abaixo das nadadeiras pélvicas, e uma faixa vermelha e outra azul iridescente ao longo da nadadeira dorsal, aproxima-se do macho por iniciativa própria, posicionando-se lateralmente a este.

#### **Desova**

A fêmea deposita ovos no substrato do interior do ninho.

#### **Incubação Bucal**

A fêmea recolhe os juvenis até 3mm para dentro da cavidade bucal em presença de alguma ameaça. Após ao desaparecimento desta, impulsiona os juvenis para fora da cavidade bucal, próximos ao substrato.

### **Protecção dos Juvenis**

A fêmea acompanha os juvenis durante a alimentação junto ao substrato, posicionando-se à frente ou atrás destes, e eventualmente mudando de posição, protegendo-os contra possíveis ameaças.

#### *3.1.2 M. bonita*

(adaptado de Benine *et al.*, 2004)

### *Padrões Alimentares*

#### **Apanha de Insectos à Superfície** (“surface picking”)

O indivíduo, quando na coluna de água em natação ou a pairar, apanha insectos que estão à superfície.

#### **Apanha de Itens Arrastados** (“drift feeding”)

O indivíduo, quando na coluna de água em natação ou a pairar, capta partículas que são trazidas pela corrente.

### *Padrões Agonísticos*

#### **Exibição**

O indivíduo abre e fecha todas as barbatanas ao mesmo tempo, posicionando-se de modo a permanecer voltando a parte posterior do corpo para o outro indivíduo.

#### **Exibição Fixa**

O indivíduo abre e fixa as barbatanas abertas até que o outro indivíduo se afaste.

#### **Exibição da Caudal**

O indivíduo posiciona o corpo verticalmente com a cabeça voltada para o substrato, rodando o corpo de modo mostrar a barbatana caudal.

### *3.1.3. Padrões Comuns Às Duas Espécies*

#### *Padrões Agonísticos*

##### **Aproximação**

O indivíduo desloca-se até à vizinhança de outro indivíduo. Considera-se que um peixe se encontra na vizinhança de outro quando se aproxima a uma distância inferior ao comprimento do corpo deste.

##### **Investida**

O indivíduo efectua uma deslocação em natação rápida dirigida para outro indivíduo.

##### **Arranque**

Impulso único de um indivíduo na direcção de outro indivíduo, sem chegarem a verificar movimentos de natação.

##### **Perseguição**

O indivíduo nada no encalço de outro que foge após uma investida ou aproximação.

#### *Padrões de Fuga*

##### **Fuga**

O indivíduo afasta-se de outro ou de uma ameaça em natação rápida.

#### 4. Recolha de Dados Hormonais

Por questões de logística subsequentes ao local de estudo e ao plano de amostragem, os dados hormonais foram recolhidos apenas para a espécie *M. bonita*. O que se pretendeu medir a partir deste método não invasivo foi a concentração de cortisol libertado na água através das brânquias e da urina pelos indivíduos do Ponto sem Turismo e do Ponto com Turismo, numa situação padronizada de stress que consistiu em captura, transporte e confinamento (Bshary *et al.*, em publicação). Korte *et al.*, (2005) e Moberg (2000), sugerem que há uma ligação inerente entre a frequência e a magnitude da resposta dos indivíduos a uma situação de stress e a sua saúde. Partindo deste pressuposto, sugere-se que os indivíduos que respondem mais vezes a situações de stress prolongadas irão aumentar a sua carga alostática mais rapidamente do que os que respondem menos. O conceito de *alostasia* entende-se por “atingir a estabilidade através da mudança” (Sterling *et al.*, 1988) e é um processo essencial na manutenção da homeostasia em condições ambientais adversas, permitindo aos organismos equilibrar variáveis críticas internas de acordo com as exigências do meio (McEwen *et al.*, 2003). O custo acumulado da activação repetida da resposta alostática para o organismo entende-se por *carga alostática* e resulta de três tipos de respostas fisiológicas: a frequência e magnitude da resposta; a activação crónica e o fracasso em cessar a resposta; e o fracasso em responder ao desafio (Korte *et al.*, 2005). Deste modo, a medição da magnitude de uma resposta a uma situação de stress poderá ser potencialmente mais informativa do que a medição basal dos níveis de stress, quando se infere acerca da carga alostática de um indivíduo.

Os resultados obtidos por Scott & Sorensen (1994) e por Moriwaki *et al.*, (1991), sugerem que a variação das hormonas na água coincide com a variação das mesmas no plasma, eliminando a hipótese de que a concentração de esteróides na água não seria semelhante à concentração dos mesmos na água. As amostras de água são filtradas em colunas de extracção de fase sólida (Merck Lichrolut RP – 18), previamente activadas com álcool e que contêm uma matriz onde são retidos os esteróides. De seguida, eluem-se os esteróides com etanol para um tubo de ensaio, evaporando-se o álcool e adicionando-se tampão fosfato a 0.5 M e pH 7,6. Posteriormente é efectuado um processo de extracção de três fases: Livre, Sulfatada e Glucoronizada (Ver Protocolo -

ANEXO II). Por fim, a determinação da concentração do cortisol nas amostras é efectuada através da técnica de Radioimunoensaio.

Relativamente a *M. bonita*, foram capturados 10 indivíduos às 20h30 (após um dia inteiro de actividade turística), do dia 24 de Fevereiro de 2006 no Ponto com Turismo, e às 21h00 do mesmo dia, 10 indivíduos no Ponto sem Turismo, com uma rede de mão tradicional indígena (denominada de puçá). Os indivíduos capturados foram pesados numa balança electrónica, medidos quanto ao comprimento padrão através de um ictiómetro de plástico, e identificados quanto ao seu sexo por observação directa da papila genital. Seguidamente foram colocados individualmente em recipientes de 500 ml *standard* durante uma hora com água proveniente do rio de onde foram originalmente capturados. A água de cada um dos recipientes foi filtrada numa bomba de vácuo (Sistema Whatman), sendo a retenção das hormonas efectuada na matriz das colunas de extracção para fase sólida, previamente identificadas com a amostra. As amostras recolhidas foram congeladas a -20 °C, até à data de eluição.

Para *C. lepidota*, as dificuldades de captura dos indivíduos foram francamente superiores devido às suas características comportamentais. Como tal, após uma primeira tentativa infrutífera de captura a Fevereiro de 2007, foi realizada uma segunda tentativa entre os dias 15 e 16 de Março de 2007, com a rede puçá. No entanto, foram capturados indivíduos apenas para o Ponto sem Turismo. Possivelmente terá contribuído para dificultar a captura o facto deste local estar receber visita humana constante, fazendo com que os indivíduos mantivessem-se mais à distância ou escondidos. Deste modo, o método não pôde ser aplicado para esta espécie.

Para a validação do método, foram capturados 12 indivíduos (6 no Ponto Sem Turismo e 6 no Ponto com Turismo) de *M. bonita*, com a rede puçá no 16 de Março de 2007. Os indivíduos capturados foram pesados e medidos como indicado, e depositados num recipiente arejado, com água proveniente do rio de onde foram originalmente capturados.

O método efectuada foi validado para esta espécie através de injeções da Hormona Adrenocorticotrófica (ACTH) (Sigma, referência: A-6303) calibradas para o peso médio dos indivíduos: 0,0023 IU / g de ACTH. As injeções foram administradas directamente

na cavidade intraperitoneal dos indivíduos, tendo sido utilizadas para esse fim seringas com a capacidade de 1 ml e agulhas com 0,50 x 16 mm de diâmetro. Dos 12 indivíduos, 6 foram utilizados para as injeções de ACTH e 6 para as injeções de solução Ringer (controlo). No dia a seguir à captura, às 9h da manhã, os indivíduos foram depositados em recipientes individuais de 250 mL com água proveniente do mesmo rio, a partir dos quais foram efectuadas as extracções da água: às 11h00 (previamente à injeção de ACTH ou de solução Ringer nos indivíduos), às 13h, 17h e 24h (ANEXO V – Figura 20).

#### **4.1. Radioimunoensaio (RIA)**

A determinação da concentração de cortisol nas amostras recolhidas após extracção das três fases (Livre, Sulfatada, e Glucoronizada) foi efectuada no Laboratório de Biologia do Instituto Superior de Psicologia Aplicada (ISPA, Lisboa), através da técnica de Radioimunoensaio (RIA). Foi utilizado um anticorpo policlonal para o cortisol (Interchim, Fitzgerald Industries International, Inc; Referência 20-CR50) e o marcador radioactivo [1,2,6,7-3H] Cortisol, Referência TRK407-250UCI (GE, Healthcare Amersham Radiochemicals).

O RIA consiste na determinação da quantidade de hormona numa amostra, através da leitura de radioactividade presente na solução de ensaio. Este método necessita da incubação simultânea de uma solução de amostra ou de hormona padrão conhecida, com uma concentração constante de hormona tritiada e anticorpos específicos (Cook & Beastall, 1987). O método de doseamento hormonal por radioimunoensaio baseia-se no princípio da competição para uma determinada quantidade de anticorpo (com um número fixo e limitante de sítios de ligação nas moléculas de anticorpo) entre um antigénio (hormona) marcado radioactivamente e o mesmo antigénio não marcado presente na amostra. Este método combina a especificidade de uma reacção antigénio-anticorpo com a sensibilidade da utilização de isótopos radioactivos (Cook & Beastall, 1987).

Na ausência de hormona não radioactiva, todos os locais de ligação do anticorpo estão ocupados pela hormona radioactiva. Se houver hormona não marcada na amostra a dosear, haverá competição pelos sítios de ligação e, à medida que a concentração de

hormona não marcada aumenta, uma maior percentagem de hormona marcada irá sendo impedida de permanecer ligada. Sob condições padronizadas (quantidades fixas de hormona radioactiva e anticorpo), e usando soluções padrão com concentração de hormona não marcada conhecida, a percentagem de ligação de hormona marcada pode ser quantificada através de um contador de cintilações, o que permite traçar uma curva padrão. Quanto maior for a concentração da hormona na amostra menor será o número de complexos anticorpo-hormona marcada. A separação de hormona livre da hormona ligada em complexo faz-se utilizando carvão activado, sendo a hormona livre retida no carvão após centrifugação. O sobrenadante contendo os complexos, anticorpo+hormona marcada, são detectados por leitura da radioactividade da amostra. Assim, esta radioactividade é uma medida inversa da quantidade da hormona na amostra (Cook & Beastall, 1987).

Para dosear uma quantidade desconhecida de antigénio não marcado presente numa amostra são utilizadas as mesmas condições utilizadas para a construção da curva padrão. Sabendo, na amostra a dosear, a percentagem de antigénio marcado ligado ao anticorpo, à qual corresponde a uma determinada leitura no contador de cintilações, é possível, por extrapolação, determinar a quantidade de antigénio não marcado presente na referida amostra (Cook & Beastall, 1987).

## 5. Análise Estatística

### 5.1. Caracterização Ecológica

A diferença entre os valores registados de visibilidade horizontal, velocidade da corrente e temperatura foram analisados através do programa Statistica 7.0<sup>®</sup> (Copyright© StatSoft, Inc. 1984-2005), por meio de um teste t-Student em que a hipótese nula  $H_0$  era: *Não existem diferenças significativas nos valores registados entre o Ponto sem Turismo e o Ponto com Turismo.*

#### 5.1.1. Composição e Estrutura da Comunidade Íctia

##### 5.1.1.1. Composição e Dinâmica da Comunidade

Determinou-se a heterogenidade da comunidade íctia em estudo através dos cálculos do número total de indivíduos, de riqueza específica (Índice de Margalef), diversidade (Índice de Shannon-Wiener) e equitabilidade (Índice de Pielou) (Zar, 1986). Magurran (2004), refere que essas medidas permitem, de modo sistemático, comparar diferentes comunidades biológicas, de locais distintos, bem como avaliar a sua evolução ao longo do tempo. A variação dos parâmetros referidos entre o *Ponto com Turismo* e o *Ponto sem Turismo* e entre as diferentes horas de registo (9h, 13h e 16h), assim como a variação da densidade média (nº de indivíduos/m<sup>2</sup>) por espécie foi determinada através de uma Análise de Variâncias de Medições Repetidas (Statistica 7.0<sup>®</sup>) com um nível de confiança de 0,95.

##### 5.1.1.2. Dinâmica Estrutural da Comunidade

A caracterização das comunidades de ictiofauna foi efectuada através de análise multivariada (e.g. Duplisea & Blanchard, 2005; Tuya *et al.*, 2005) utilizando o *Software Primer V6.0 β R6* (Clarke & Warwick, 2001). A análise multivariada é constituída por um conjunto de técnicas estatísticas que reduzem a dimensão dos dados e separam variações sistemáticas do ruído dos dados (Gauch, 1982), permitindo detectar padrões de homogeneidade dentro e entre os locais de estudo (Duplisea & Blanchard, 2005). À

semelhança de outros estudos, para a análise utilizou-se uma matriz de similitude ecológica com o coeficiente de *Bray-Curtis* (e.g. Clarke & Warwick, 1999; Tuya *et al.*, 2005), com dados da densidade de espécies por amostra (ponto fixo) transformados segundo a raiz quarta, de modo a permitir uma maior contribuição na ordenação (menos desigual) por parte das espécies raras (e.g. Tuya *et al.*, 2005). Com base nos valores da matriz de similitude ecológica efectuou-se um diagrama de *nMDS* (ordenação não métrica multi-espacial), com 999 permutações, de modo a determinar as similaridades entre cada amostragem (ponto fixo) no que respeita à estrutura da comunidade íctia (composição e densidade de espécies por ponto fixo). Muitas vezes, no diagrama de ordenação, não é possível dispor os pontos de amostragem de modo a reflectir as distâncias mútuas provenientes do cálculo da matriz de similitude. Nesta perspectiva, o valor de *Stress* é uma medida que expressa o quão bem representado está o diagrama em relação à matriz original (Jongman, 1995). Valores de *Stress* inferiores a 0,1 correspondem a uma boa ordenação, a duas dimensões, sem interpretações erróneas. Valores entre 0,1 e 0,2 proporcionam, ainda, uma representação bidimensional útil, dos dados originais; no entanto, quanto mais aproximados de 0,2, mais se aconselha a utilização de outras técnicas alternativas de ordenação (Clarke & Warwick, 2001). A análise estatística para averiguar se existiam diferenças significativas entre as densidades das espécies dos conjuntos de amostras formados (Clarke & Warwick, 2001) pelo diagrama *nMDS* foi realizada através do teste estatístico multivariado não paramétrico *ANOSIM* (análise de similaridades) com:  $\alpha=0,01$ ; 999 permutações, sendo *H0*: Não há diferenças significativas entre as densidades de espécies de ictiofauna dos conjuntos de amostras formados pelo diagrama *nMDS*. O valor de R resultante do teste *ANOSIM* é sempre pertencente ao intervalo da gama de valores [-1;1]. Usualmente situa-se entre os valores de 0 e 1, indicando uma crescente discriminação entre os grupos em teste. A forma mais objectiva de descrever as características biológicas similares, entre os conjuntos de amostras formados, é através da análise de percentagem de similaridade (*SIMPER* – *Similarity PERcentage analysis*) (Clarke & Warwick, 2001). Esta análise tem o intuito de averiguar quais as espécies mais responsáveis (assumindo valores superiores a 80%) pela similitude entre os conjuntos formados pela análise do diagrama *nMDS*. (e.g. Platell *et al.*, 1998; Tuya *et al.*, 2005).

## 5.2. *Dados Comportamentais*

Com base nos dados recolhidos, pretendeu-se testar a existência de diferenças nas frequências dos padrões comportamentais entre o *Ponto sem Turismo* e o *Ponto com Turismo* para as duas espécies em estudo, de uma forma global e relativamente a cada hora de observação ao longo do dia (entre as 6h00 e as 19h00). Para esse efeito e, por não terem apresentado uma distribuição normal, foram realizados testes não paramétricos entre dois grupos utilizando o teste de Mann-Whitney, com a *H0*: *Não há diferenças significativas nas frequências dos padrões de comportamentos observados entre o Ponto sem Turismo e o Ponto com Turismo*. Este teste é utilizado na comparação de dois grupos independentes, constituindo uma alternativa útil ao teste paramétrico *t-Student*, quando os pressupostos inerentes a este teste não podem ser cumpridos (Zar, 1986). Para efeitos de comparação destas variáveis antes e depois da primeira perturbação infligida às duas espécies no mesmo ponto, realizaram-se as mesmas análises para as diferenças entre a frequência de ocorrência dos padrões de comportamentos entre as 8h00 (antes da primeira entrada de turistas no rio) e as 9h00 (depois da primeira entrada de turistas no rio), considerando a mesma *H0*. Utilizou-se a correlação de Spearman de modo a verificar a existência de uma correlação entre o nº total de turistas por dia e a frequência de ocorrência de cada um dos padrões de comportamento observados para as duas espécies em estudo no *Ponto com Turismo*, durante os horários em que os turistas estiveram presentes no rio (entre as 9h00 e as 16h00).

### **5.3. Dados Hormonais**

Os dados hormonais foram tratados de forma não paramétrica por não terem apresentado uma distribuição normal e o tamanho da amostra ser demasiado pequeno. Como tal, a diferença entre a concentração de cortisol (ng/L/h) para os indivíduos da espécie *M. bonita* entre o *Ponto sem Turismo* e o *Ponto com Turismo* foi analisada através programa Statistica 7.0<sup>®</sup> por comparações não paramétricas entre dois grupos independentes utilizado o teste de Mann-Withney, com a *H0*: *Não há diferenças significativas nas concentrações de cortisol medidas na água entre o Ponto sem Turismo e o Ponto com Turismo.*

O nível de significância considerado para todos os testes estatísticos utilizados foi de 5%, sendo este o valor utilizado, de uma forma geral, para todos os testes de hipóteses (Sokal & Rohlf, 1995).

### III. RESULTADOS

#### 1. Caracterização Ecológica

##### 1.1. Perfis Subaquáticos

Foi efectuado um perfil subaquático relativo ao *Ponto sem Turismo* (Figura 4), e outro relativo ao *Ponto com Turismo* (Figura 5), onde estão representados os diferentes limites de profundidade dos mesmos de, respectivamente 0,9m e 1,40m. A amplitude do leito do rio (de uma margem à outra) foi, para cada um dos trechos determinados, respectivamente de 8,60m e de 7,20m.

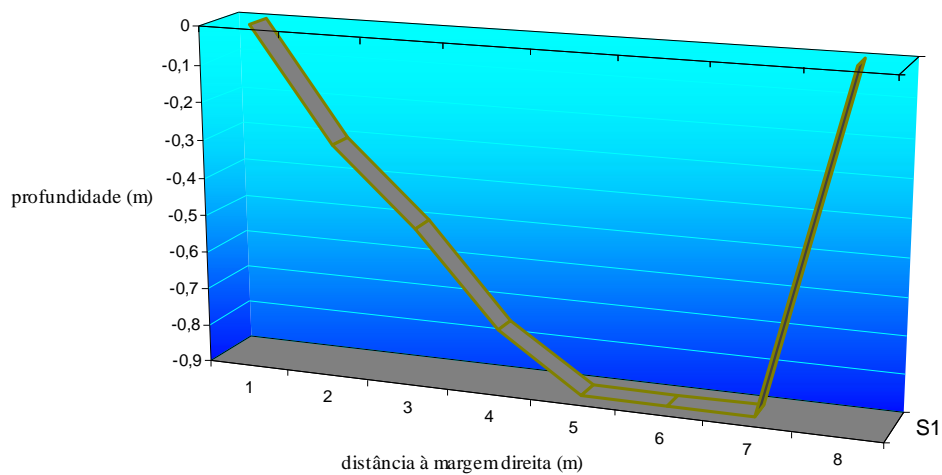


Figura 4 – Perfil subaquático referente ao *Ponto sem Turismo*.

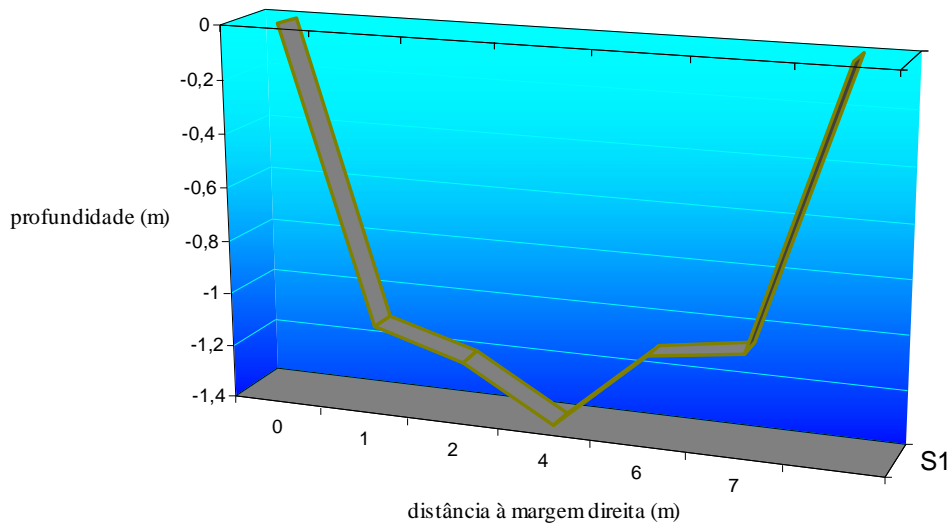


Figura 5 – Perfil subaquático referente ao *Ponto com Turismo*.

### **1.2. Tipo de Fundo, Vegetação Subaquática, Velocidade da Corrente, Visibilidade e Temperatura**

O tipo de fundo observado verificou-se argilo-arenoso para os dois pontos de observação, com a presença de galhos, troncos e folhas de árvores terrestres acumulados junto às margens. Foram observadas as mesmas espécies de plantas subaquáticas para ambos, num total de 4 espécies: *Ceratophyllum demersum*, *Echinodorus ashersonianus*, *Gonphrena elegans* e *Hydrocotyle Leucocephala*. Não foi verificada qualquer diferença significativa entre temperatura média da água ( $22,03^{\circ}\text{C}$ ,  $\pm 0,30^{\circ}\text{C}$ , Ponto sem Turismo e  $22,02^{\circ}\text{C}$ ,  $\pm 0,32^{\circ}\text{C}$  Ponto com Turismo) (teste-T=0,00; F=1; p=1,0). Verificou-se uma diferença significativa entre os dois pontos para a velocidade média da corrente ( $0,26 \pm 0,007$  m/s no Ponto sem Turismo e  $0,35 \pm 0,008$  m/s no Ponto com Turismo) (teste-T=-60,81; F=2,96; p <0,05), e para a visibilidade média horizontal ( $55,50 \pm 5,10\text{m}$ , Ponto sem Turismo e  $36,75 \pm 4,06\text{m}$ , Ponto com Turismo) (teste-T=12,85; F=1,58; p <0,05). A visibilidade média vertical foi invariavelmente de 100% para ambos.

### 1.3. Composição e Estrutura da Comunidade Íctia

#### 1.3.1. Composição e Dinâmica da Comunidade

A análise estatística efectuada mostrou diferenças significativas entre o Ponto sem Turismo e o Ponto com Turismo relativamente à Riqueza Específica, ao Índice de Shannon-Wiener, e à Densidade, todos superiores no Ponto com Turismo (Tabela 1). Não foram verificadas diferenças significativas relativas ao Local para Equitabilidade, assim como para todos os parâmetros analisados em relação às diferentes horas do dia (9h, 13h, 16h). Os valores dos vários índices calculados encontram-se no ANEXO III.

**Tabela 1** – Diferenças verificadas entre as Horas do dia: 9h, 13h, 16h (**H**) e entre o Local: Ponto sem Turismo e Ponto com Turismo (**L**), através da ANOVA *Repeated Measures*, para os diferentes parâmetros ecológicos analisados: Riqueza Específica (Índice de Margalef), Diversidade (Índice Shannon – Wiener), Equitabilidade (Índice de Pielou) e Densidade. **E** – Erro.

	<i>Riqueza Específica</i>			<i>Índice Shannon - Wiener</i>			<i>Equitabilidade</i>			<i>Densidade</i>		
	<i>Ms</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>Ms</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>Ms</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>Ms</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
<b>H</b>	0,15	2,99	0,06	0,014	1,68	0,20	0,001	1,38	0,27	1,31	1,84	0,175
<b>L</b>	1,01	42,04	<0,001	0,45	26,63	<0,001	0,007	3,60	0,08	26,68	23,47	<0,001
<b>E</b>	0,02			0,02			0,002			1,34		

### 1.3.2. Dinâmica Estrutural da Comunidade

No diagrama *nMDS*, que representa a distância de similitude entre os pontos fixos de observação, com base nas densidades das espécies íctias (Figura 6), é possível distinguir dois conjuntos de pontos similares: (1) o conjunto **A**, dos pontos localizados na área sem turismo e (2) o conjunto **B**, dos pontos localizados na área com turismo. O valor de *Stress* da ordenação *nMDS* descrita é de 0,1.

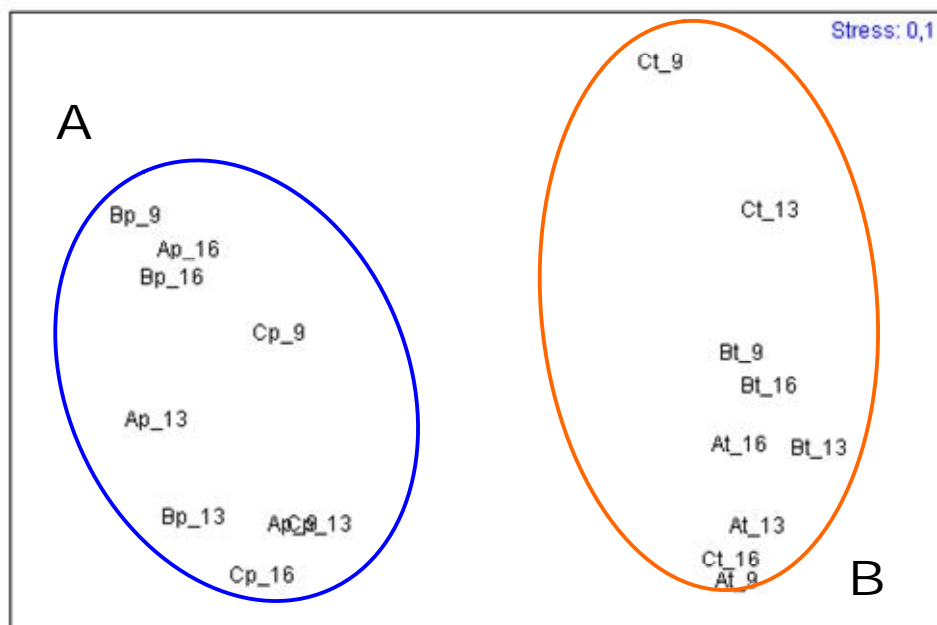


Figura 6 – Densidade de espécies íctias. Ordenação *nMDS* baseado na matriz de similitude de *Bray-Curtis*, com dados de densidade de espécies de ictiofauna, transformados por raiz quarta. A letra *p* representa os pontos sem turismo e a letra *t* representa os pontos com turismo.

Os valores de  $R = 0,968$  e  $p < 0,001$  do teste global efectuado com base nas densidades das espécies dos conjuntos de amostras, obtidos da análise dos diagramas *nMDS*, indicam que há diferenças significativas entre as densidades de espécies de ictiofauna dos conjuntos de amostras formados.

### 1.3.1.1. Contribuição das espécies para o grau de similaridade

As espécies que mais contribuem para a similaridade das amostragens, e que permitiram formar os grupos A e B, estão presentes na Tabela 2. O grupo A apresentou um valor de similaridade ligeiramente superior ao grupo B, e para ambos as espécies que mais significativamente contribuíram para esta similaridade foram *Phenacogaster tegatus*, *Astyanax sp.* e *Moenkausia bonita*. As espécies que mais contribuíram para a dissimilaridade entre os dois grupos formados estão representadas na Tabela 3.

**Tabela 2** – SIMPER; Contribuição, em percentagem, das espécies íctias para a similaridade entre os pontos de amostragem, dos grupos formados e percentagem de similaridade entre os pontos fixos que formaram os grupos.

<b>Espécie</b>	<b>A</b>	<b>B</b>
<i>Astyanax sp.</i> (Characidae)	16,27	13,83
<i>Brycon hilarii</i> (Characidae)	5,80	9,30
<i>Bryconops sp.</i> (Characidae)	10,18	9,28
<i>Crenicichla lepidota</i> (Cichlidae)	9,87	7,86
<i>Leporinus friderii</i> (Anostomidae)	–	5,67
<i>Moenkausia bonita</i> (Characidae)	14,89	13,58
<i>Phenacogaster tegatus</i> (Characidae)	16,59	14,31
<i>Steindachnerina brevipinna</i> (Curimatidae)	8,40	7,62
<b>Similaridade</b>	<b>93,44</b>	<b>93,36</b>

**Tabela 3** – SIMPER; Contribuição, em percentagem, das espécies íctias para a dissimilaridade entre os pontos de amostragem, dos grupos formados e percentagem de dissimilaridade entre os pontos fixos que formaram os grupos.

<b>Espécie</b>	<b>A – B</b>
<i>Acestrorhynchus pantaneiro</i> (Acestrorhynchidae)	9,47
<i>Aequidens plagiozonatus</i> (Cichlidae)	9,67
<i>Brycon hilarii</i> (Characidae)	18,99
<i>Leporinus friderici</i> (Anostomidae)	26,67
<b>Dissimilaridade</b>	<b>12,57</b>

## 2. Dados Comportamentais

### 2.1. Observação “*ad libitum*”

#### 2.1.1. Ponto sem Turismo

Após a análise dos dados relativos ao comportamento das duas espécies em estudo foi efectuada uma descrição resultante da observação “*ad libitum*”. Para *C. lepidota*, no Ponto sem Turismo, os indivíduos apresentaram pouca locomoção, encontrando-se sozinhos ou em casais, não apresentando uma organização em cardume; os indivíduos adultos encontravam-se posicionados principalmente sobre o leito arenoso, alinhados longitudinalmente contra a corrente, encontrando-se parte do tempo estacionários atrás de galhos e troncos (locais de esconderijo) nos períodos da manhã e tarde, enquanto os juvenis posicionavam-se em locais mais expostos. Alimentaram-se principalmente no sedimento de pequenas presas como crustáceos ou insectos aquáticos imaturos. Para tal efectuavam um deslocamento próximo ao leito do rio, movimentando o globo ocular através do substrato de modo a inspeccionar visualmente o leito. Quando pareciam detectar uma possível presa, inclinavam o corpo e nesta posição, com a boca bem próxima ao substrato, abocanhavam-na. Durante o período de observação no Ponto sem Turismo, foram pontualmente registadas fêmeas que apresentaram coloração nupcial (cor escura, raio vermelho na parte superior da barbatana dorsal e barriga azulada) e algumas que apresentaram cuidados parentais.

Relativamente a *M. bonita*, como resultado de observações pelo mesmo método, verificou-se que os indivíduos desta espécie podem formar cardumes de 10 a 30 indivíduos. Estes localizam-se a meio da coluna de água, próximos à margem, alimentando-se de pequenas partículas (restos de insectos ou algas) trazidas pela corrente ou de insectos que se encontram à superfície. Apresentam uma maior período de actividade pela manhã e ao fim do dia. Normalmente movimentam-se pouco, permanecendo quase sempre no mesmo local durante as observações. Quando ameaçados, os indivíduos desta espécie misturam-se rapidamente aos indivíduos de outras espécies semelhantes que formam cardumes maiores como a espécie de lambari *Phenacogaster tegatus*. Não foram observados quaisquer tipos de comportamentos sexuais ou de cuidados parentais.

### 2.1.2. Ponto com Turismo

Os resultados obtidos de acordo com o mesmo método relativos ao Ponto com Turismo mostraram que os indivíduos de *C. lepidota* não se posicionam tanto no leito do rio como no Ponto sem Turismo, localizando-se mais junto à vegetação, próxima à margem. Quando ameaçados, escondem-se sistematicamente em troncos ou a meio da vegetação, permanecendo assim até a ameaça ter desaparecido por completo, neste caso maioritariamente provocada pela presença de turistas. Alimentam-se da mesma forma observada no local sem impacto e apresentam o mesmo período de actividade.

*M. bonita* apresentou comportamentos praticamente idênticos nos pontos de observação. No Ponto com Turismo, foi possível observar que os indivíduos desta espécie apresentam um comportamento de fuga face à presença humana apenas quando esta lhe é muito próxima e que este dura apenas alguns segundos, ao fim dos quais os indivíduos retornam à posição inicial, mesmo que se encontrem turistas na água.

## 2.2. Observação “animal focal”

### 2.2.1. Resultados Globais do Impacto Antropogénico

Foi testado o efeito global do impacto da visita turística diária na frequência de ocorrência dos padrões de comportamento observados para as duas espécies em estudo.

Para *C. lepidota* a diferença na frequência de comportamentos alimentares entre o Ponto sem Turismo (S) e o Ponto com Turismo (C) foi significativa ( $p < 0,0001$ ), verificando-se que este comportamento tem uma maior frequência no Ponto sem Turismo (Tabela 4). Verificou-se uma redução significativa da frequência de comportamentos agonísticos no Ponto com Turismo ( $p < 0,0001$ ), e um aumento significativo da frequência de comportamentos de fuga no mesmo ( $p < 0,0001$ ). As diferenças na frequência de comportamentos de guarda do ninho, sexuais e de cuidados parentais não se mostraram significativas.

**Tabela 4** – Diferenças verificadas entre as frequências dos vários padrões de comportamento observados na espécie *C. lepidota* (teste de Mann – Whitney) para Ponto sem Turismo Vs. Ponto com Turismo. *NS* simboliza diferenças não significativas; *S* simboliza Ponto sem turismo; *C* simboliza Ponto com Turismo.

<i>Comportamento</i>	<i>N</i>	<i>Z</i>	<i>p-level</i>	<i>S vs. C</i>
Alimentação	420	8,81	< 0,0001	S > C
Guarda do ninho	420	1,06	0,25	NS
Agonístico	420	7,16	< 0,0001	S > C
Sexual e Cuidados Parentais	420	0,12	0,12	NS
Fuga	420	-7,30	< 0,0001	C > S

Para *M. bonita* (Tabela 5), a diferença na frequência de comportamentos alimentares entre o Ponto sem Turismo (S) e o Ponto com Turismo (C) foi significativa ( $p < 0,05$ ), verificando-se que este comportamento tem uma maior frequência no Ponto sem Turismo. A diferença na frequência de comportamentos de fuga foi de igual modo significativa ( $p < 0,0001$ ) e a sua frequência de ocorrência maior no Ponto com Turismo.

**Tabela 5** – Diferenças verificadas entre a frequência dos vários padrões de comportamento observados na espécie *M. bonita* (teste Mann – Whitney) para o Ponto sem Turismo vs. Ponto com Turismo. *NS* simboliza diferenças não significativas; *S* simboliza Ponto sem turismo; *C* simboliza Ponto com Turismo.

<i>Comportamento</i>	<i>N</i>	<i>Z</i>	<i>p-level</i>	<i>S vs. C</i>
Alimentação	840	3,02	< 0,05	S > C
Agonístico	840	0,39	0,63	NS
Fuga	840	- 3,87	< 0,0001	C > S

### **2.3. Variação Diária**

A partir dos dados resultantes das observações realizadas hora a hora entre as 6h00 e as 19h00 nos dois pontos, foram elaborados gráficos para cada um dos padrões de comportamentos observados para as duas espécies em estudo.

#### *2.3.1. C. lepidota*

Verificou-se que *C. lepidota* apresenta um padrão de frequência alimentar ao longo do dia caracterizado por dois picos, um pela manhã, às 7h00 tanto no Ponto sem Turismo, quanto no Ponto com Turismo (Figura 7), não sendo significativa a diferença observada entre os dois pontos ( $p = 0,63$ ); e outro às 18h00 no Ponto sem Turismo e às 19h00 para o Ponto com Turismo. Às 8h00 verificou-se uma diferença já significativa entre a frequência de comportamentos alimentares em ambos ( $p < 0,05$ ) e às 9h00 verificou-se o valor mínimo de frequências alimentares no Ponto com Turismo, coincidente com a primeira entrada diária de turistas no rio. Entre as 9h00 e as 16h00 a diferença entre os dois pontos de amostragem verificou-se sempre significativa ( $p < 0,0001$ ), horário correspondente ao horário de visita turística diária. Entre as 17h00 e as 19h00 a diferença entre os dois pontos continuou a ser significativa ( $p < 0,05$ ), porém às 19h00, a frequência alimentar foi superior no Ponto com Turismo, sugerindo um efeito de compensação do comportamento alimentar neste local, após a saída dos turistas.

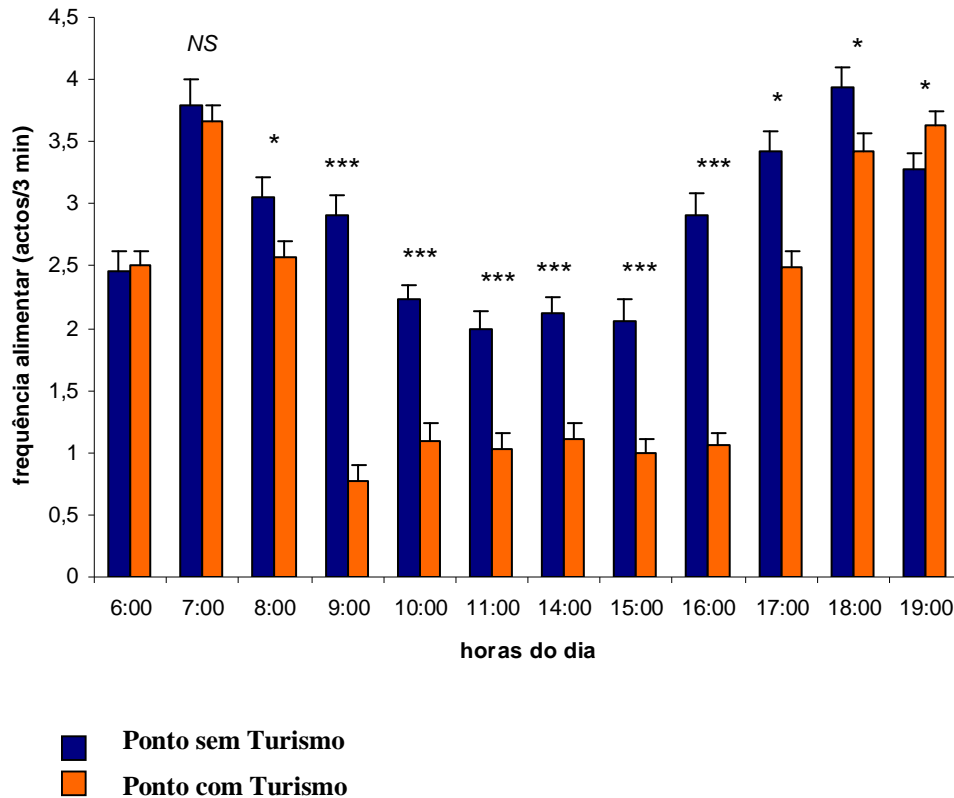


Figura 7 – Frequência diária do comportamento alimentar por cada hora de observação para a espécie *C. lepidota* relativa ao Ponto sem Turismo vs. Ponto com Turismo. Valores médios + desvio padrão da média; n = 35. NS simboliza diferenças não significativas; \* p < 0,05; \*\*\* p < 0,0001.

Relativamente à frequência de comportamentos de guarda do ninho, não se verifica um padrão tão definido como para a frequência de comportamentos alimentares (Figura 8). No Ponto sem Turismo o valor mínimo é atingido às 7h00 e o pico às 16h00. No Ponto com Turismo o valor mínimo ocorreu às 8h00, enquanto o pico foi registado às 9h00, horário este que corresponde à primeira entrada de turistas no rio. Neste horário a diferença na frequência deste comportamento entre os dois pontos foi significativa (p < 0,05).

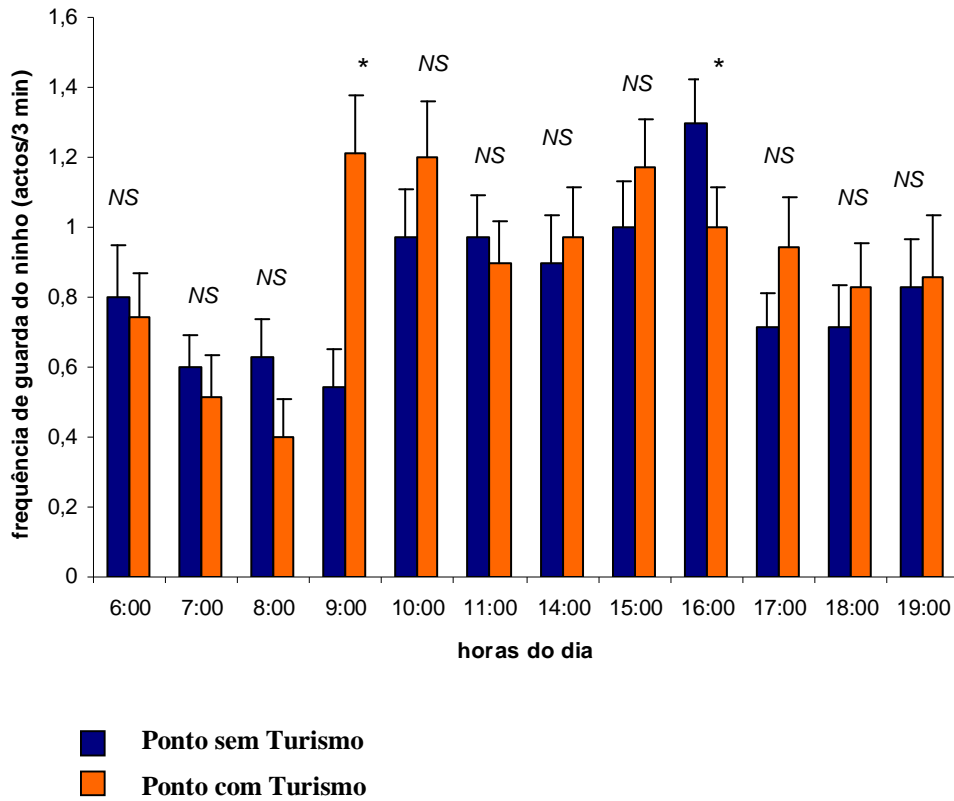


Figura 8 – Frequência diária do comportamento de guarda do ninho por cada hora de observação para a espécie *C. lepidota* relativa ao Ponto sem Turismo vs. Ponto com Turismo. Valores médios + desvio padrão da média; n = 35. NS simboliza diferenças não significativas; \* p < 0,05; \*\*\* p < 0,0001.

A frequência de comportamentos agonísticos no Ponto sem Turismo mostrou um padrão crescente até às 14h00, onde atingiu o pico (Figura 9). A partir das 16h00 começou a decrescer até atingir o valor mínimo às 19h00. Relativamente ao Ponto com Turismo, os valores mínimos e máximos foram observados às 16h00, e às 11h00 respectivamente.

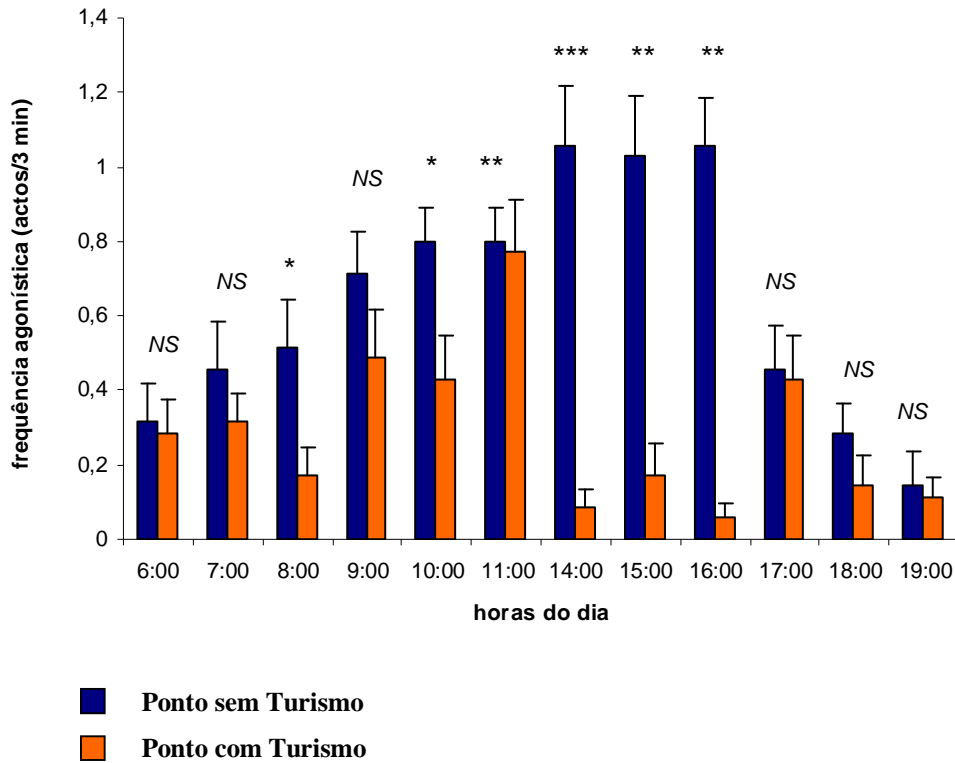


Figura 9 – Frequência diária do comportamento agonístico por cada hora de observação para a espécie *C. lepidota* relativa ao Ponto sem Turismo vs. Ponto com Turismo. Valores médios + desvio padrão da média; n = 35. NS simboliza diferenças não significativas; \* p < 0,05; \*\* p < 0,001; \*\*\* p < 0,0001.

A frequência máxima de comportamentos de fuga registada para os Pontos sem e com Turismo foi observada às 14h00 e às 9h00 respectivamente (Figura 10). No Ponto sem Turismo não se verificaram comportamentos de fuga entre as 6h00 e as 8h00. Durante o horário correspondente à visita turística diária (9h00 – 16h00), foram sempre verificadas diferenças significativas entre os dois locais (p < 0,0001 para as 9h00, 10h00, 11h00 e 16h00 e p < 0,05 para as 14h00).

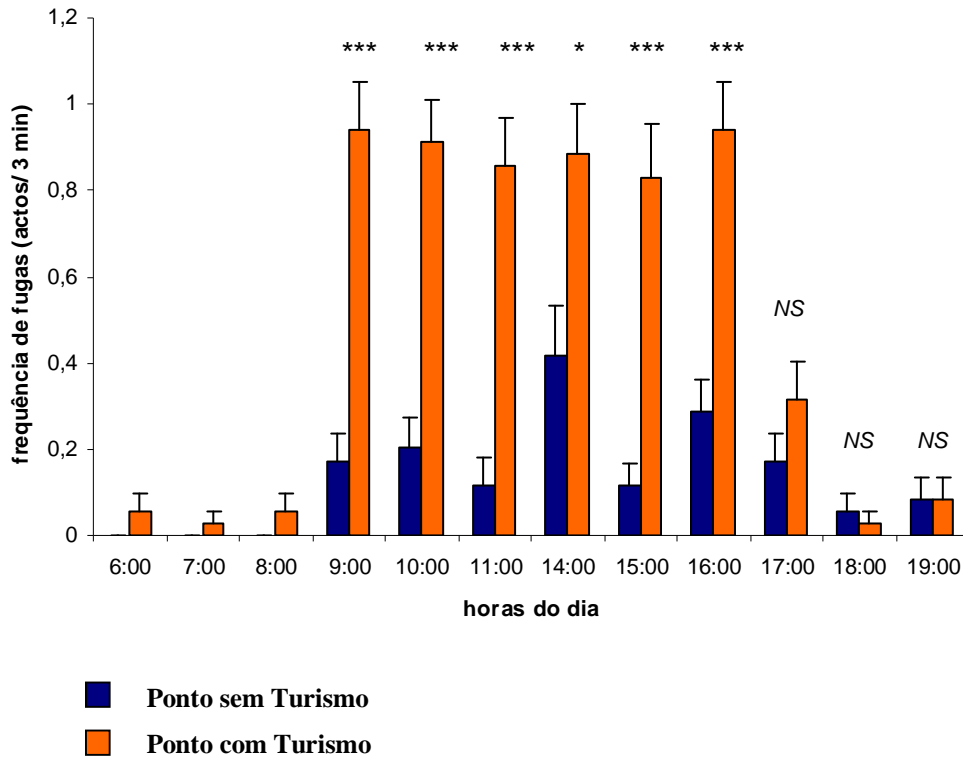


Figura 10 – Frequência diária do comportamento e fuga por cada hora de observação para a espécie *C. lepidota* relativa ao Ponto sem Turismo vs. Ponto com Turismo. Valores médios + desvio padrão da média; n = 35. NS simboliza diferenças não significativas; \* p < 0,05; \*\*\* p < 0,0001.

A frequência de comportamentos sexuais e de cuidados parentais atingiu o pico às 11h00 no Ponto sem Turismo, não tendo sido observados estes comportamentos, ou sendo muito raros no período do início da manhã (7h00 - 8h00), ou na segunda metade da tarde (14h00 - 19h00). (Figura 11). O pico verificado para o Ponto com Turismo ocorreu também às 11h00, não tendo sido observados estes comportamentos ou sendo muito raros entre as 7h00 e 10h00 e entre as 14h00 e as 19h00.

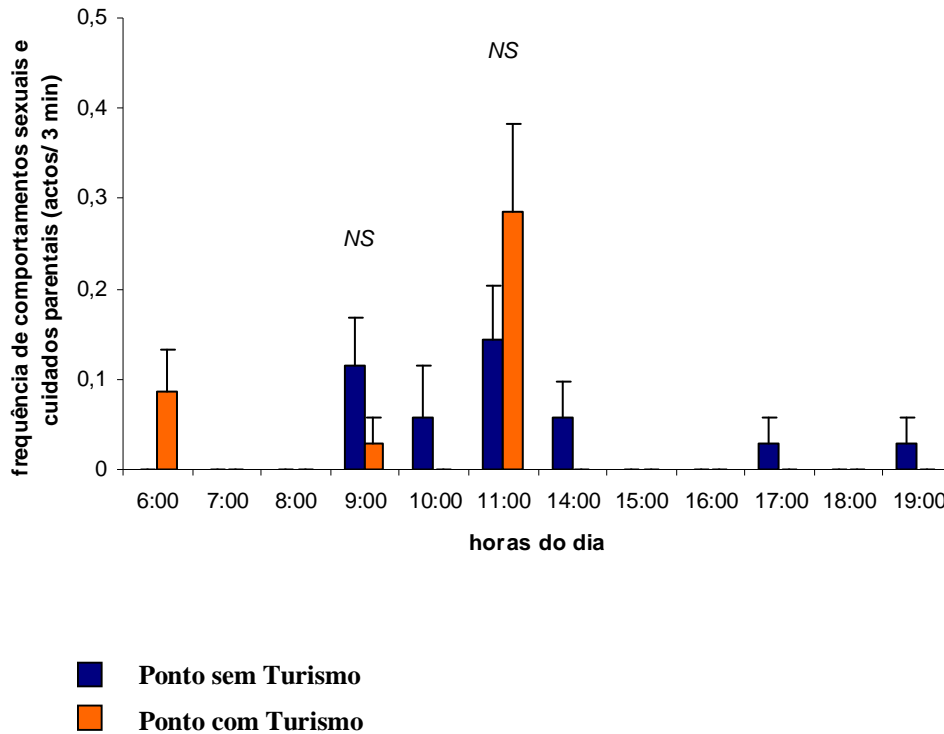


Figura 11 – Frequência diária dos comportamentos sexuais e de cuidados parentais por cada hora de observação para a espécie *C. lepidota* relativa ao Ponto sem Turismo vs. Ponto com Turismo. Valores médios + desvio padrão da média; n = 35. NS simboliza diferenças não significativas.

### 2.3.1. *M. bonita*

Relativamente a *M. bonita*, a frequência de comportamentos alimentares teve uma distribuição bimodal com um pico às 7h00 tanto no Ponto sem Turismo, quanto no Ponto com Turismo e outro às 18h00 para o Ponto sem Turismo e às 19h00 para o Ponto com Turismo (Figura 12). O valor mínimo registado para o Ponto sem Turismo ocorreu às 15h00 e para o Ponto com Turismo às 9h00, horário que corresponde à primeira entrada dos turistas na água. Verificaram-se diferenças significativas entre os dois pontos às 9h00 e às 15h00 ( $p < 0,001$ ) e às 10h00 e às 16h00 ( $p < 0,05$ ).

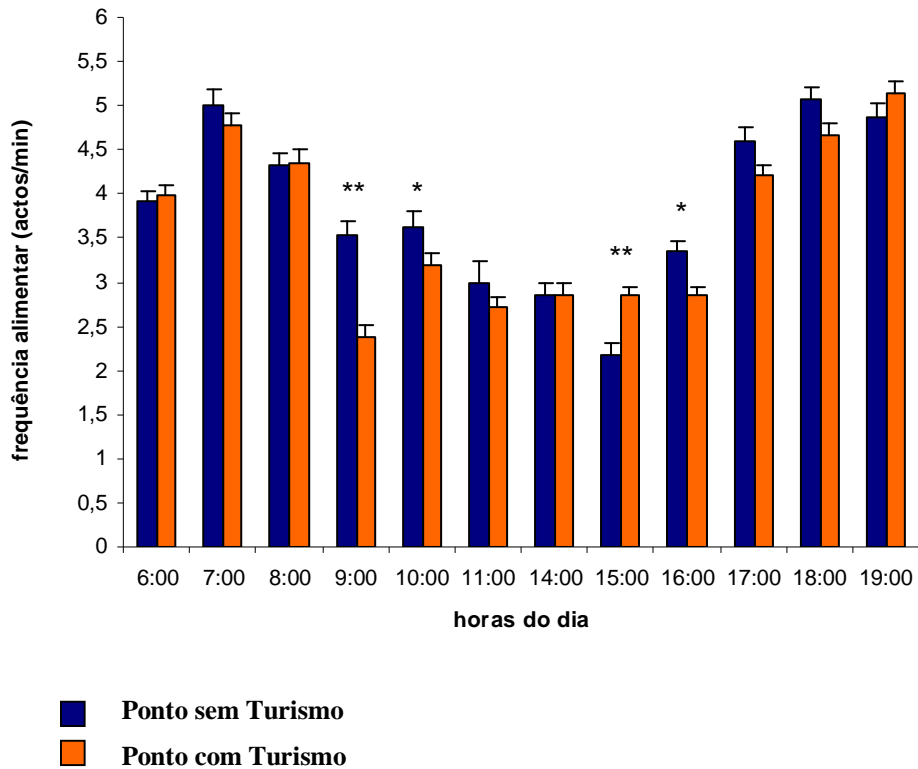


Figura 12 – Frequência do comportamento alimentar por cada hora de observação para a espécie *M. bonita* relativa ao Ponto sem Turismo vs. Ponto com Turismo. Valores médios + desvio padrão da média; n = 70; \* p < 0,05; \*\* p < 0,001.

A frequência de comportamentos agonísticos não apresentou um padrão definido ao longo do dia (Figura 13). Os máximos verificados para os Pontos sem e com Turismo ocorreram às 17h00 e às 18h00, respectivamente. Os mínimos registaram-se às 19h00 e às 15h00, respectivamente. A única diferença significativa verificada entre os dois pontos de amostragem ocorreu às 19h00 (p < 0,01).

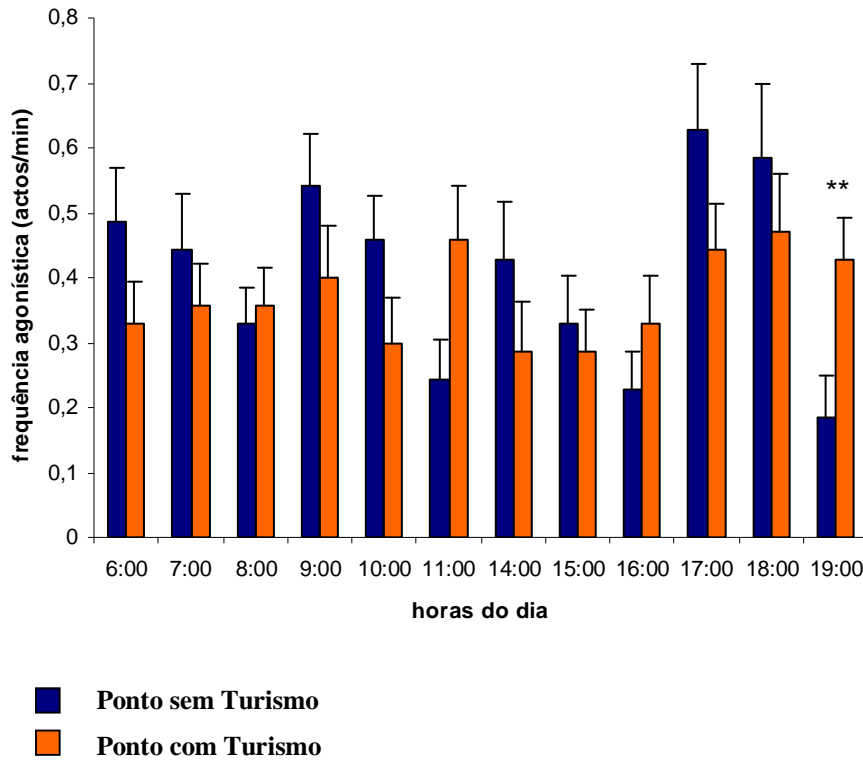


Figura 13 – Frequência diária do comportamento agonístico por cada hora de observação para a espécie *M. bonita* relativa ao Ponto sem Turismo vs. Ponto com Turismo. Valores médios + desvio padrão da média; n = 70; \*\* p <0,001.

A frequência dos comportamentos de fuga atingiu o pico às 16h00 no Ponto sem Turismo, não tendo sido registada às 17h00 e às 18h00 (Figura 14). No Ponto com Turismo o pico foi verificado às 9h00, horário coincidente com a primeira entrada de turistas no rio, enquanto o valor mínimo foi verificado às 8h00. Foram identificadas diferenças significativas entre os dois pontos às 9h00 e às 16h00 (p <0,01) e às 14h00 e às 15h00 (p <0,05).

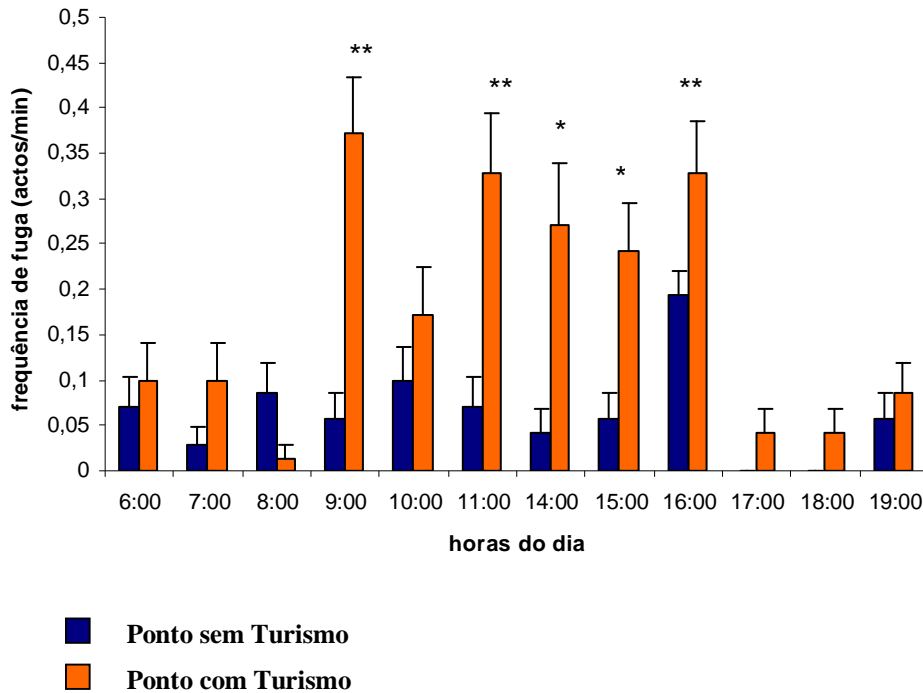


Figura 14 – Frequência diária do comportamento de fuga por cada hora de observação para a espécie *M. bonita* relativa ao Ponto sem Turismo vs. Ponto com Turismo. Valores médios + desvio padrão da média; n = 70; \* p < 0,05; \*\* p < 0,001.

#### ***2.4. Diferenças antes e depois da primeira perturbação no mesmo local***

Uma vez que o horário da primeira visita turística decorreu diariamente às 9h00 no Ponto com Turismo, foi realizada uma comparação entre as diferenças nas frequências dos padrões comportamentais antes e depois da perturbação (8h00 Vs. 9h00), para as duas espécies em estudo, nos dois pontos de observação (Sem Turismo Vs. Com Turismo).

Relativamente a *C. lepidota*, não se observou uma variação significativa entre as 8h00 e as 9h00 no Ponto sem Turismo na frequência de comportamentos alimentares, (Tabela 6 e Figura 7), a qual sofreu uma redução significativa no Ponto com Turismo (Tabela 7 e Figura 7). Relativamente à frequência de comportamentos de guarda do ninho, a diferença entre as 8h00 e as 9h00 verificou-se não significativa no Ponto sem Turismo (Tabela 6 e Figura 8), tendo-se registado um aumento significativo, no Ponto com

Turismo (Tabela 7 e Figura 8). Não foram verificadas diferenças significativas relativas às frequências de comportamentos agonísticos e de comportamentos sexuais e cuidados parentais entre as 8h00 e as 9h00, nos dois pontos de observação (Tabelas 6 e 7; Figuras 9 e 10). Verificou-se uma redução significativa relativa à frequência de comportamentos de fuga entre as 8h00 e as 9h00 tanto no Ponto sem Turismo (Tabela 6 e Figura 10), quanto no Ponto com Turismo (Tabela 7 e figura 10).

**Tabela 6** – Diferenças verificadas entre as 8h00 e as 9h00 para a frequência dos vários padrões de comportamento observados na espécie *C. lepidota* (teste de Mann – Whitney), no Ponto sem Turismo. *NS* simboliza diferenças não significativas.

<i>Comportamento</i>	<i>N</i>	<i>Z</i>	<i>p-level</i>	<i>8h00 vs. 9h00</i>
Alimentação	35	0,83	0,41	NS
Guarda do ninho	35	0,56	0,52	NS
Agonístico	35	-1,39	0,13	NS
Sexual e Cuidados Parentais	35	- 0,82	0,05	NS
Fuga	35	- 1,23	0,01	9h00 > 8h00

**Tabela 7** – Diferenças verificadas entre as 8h00 e as 9h00 para a frequência dos vários padrões de comportamento observados na espécie *C. lepidota* (teste de Mann – Whitney) no Ponto com Turismo. *NS* simboliza diferenças não significativas.

<i>Comportamento</i>	<i>N</i>	<i>Z</i>	<i>p-level</i>	<i>8h00 vs. 9h00</i>
Alimentação	35	6,26	< 0,0001	8h00 > 9h00
Guarda do Ninho	35	-3,45	< 0,001	9h00 > 8h00
Agonístico	35	-1,34	0,07	NS
Sexual e Cuidados Parentais	35	- 0,20	0,32	NS
Fuga	35	- 5,20	< 0,0001	9h00 > 8h00

*M. bonita* apresentou uma redução significativa da frequência de comportamentos alimentares entre as 8h00 e as 9h00 tanto no Ponto sem Turismo (Tabela 8 e Figura 12), quanto no Ponto com Turismo (Tabela 9 e Figura 12). Não se verificaram diferenças significativas relativas às frequências de comportamentos agonísticos e de fuga entre as 8h00 e as 9h00 no Ponto sem Turismo (Tabela 8; Figuras 13 e 14). No Ponto com Turismo não se verificou uma diferença significativa entre as 8h00 e as 9h00 relativa à frequência de comportamentos agonísticos, enquanto a frequência de comportamentos de fuga apresentou um aumento significativo (Tabela 9; Figuras 13 e 14).

**Tabela 8** – Diferenças verificadas entre as 8h00 e as 9h00 para a frequência dos vários padrões de comportamento observados na espécie *M. bonita* (teste Mann – Whitney) no Ponto sem Turismo. *NS* simboliza diferenças não significativas.

<i>Comportamento</i>	<i>N</i>	<i>Z</i>	<i>p-level</i>	<i>8h00 vs. 9h00</i>
Alimentação	140	3,50	< 0,05	8h00 > 9h00
Agonístico	140	-1,60	0,06	NS
Fuga	140	0,29	0,65	NS

**Tabela 9** – Diferenças verificadas entre as 8h00 e as 9h00 para a frequência dos vários padrões de comportamento observados na espécie *M. bonita* (teste Mann – Whitney) no Ponto com Turismo. *NS* simboliza diferenças não significativas.

<i>Comportamento</i>	<i>N</i>	<i>Z</i>	<i>p-level</i>	<i>8h00 vs. 9h00</i>
Alimentação	140	8,04	< 0,0001	8h00 > 9h00
Agonístico	140	0,22	0,79	NS
Fuga	140	-3,50	< 0,0001	9h00 > 8h00

## 2.5. Número total de turistas por dia

### 2.5.1.C. *lepidota*

No Ponto com Turismo, verificou-se uma correlação negativa ( $r = -0,93$ ;  $N = 35$ ;  $p < 0,05$ ) entre o nº total de turistas por dia, entre as 9h00 e as 16h00, e a frequência média de comportamentos alimentares de *C. lepidota* (Figura 15); uma correlação positiva ( $r = 0,84$ ;  $N = 35$ ;  $p < 0,05$ ) entre o nº total de turistas por dia e a frequência média de comportamentos de guarda do ninho (Figura 16), assim como uma correlação positiva ( $r = 0,78$ ;  $N = 35$ ;  $p < 0,05$ ) entre o nº total de turistas por dia e a frequência média de comportamentos de fuga (Figura 17). Não foram verificadas correlações entre o nº total de turistas por dia e as frequências médias de comportamentos agonísticos e sexuais e cuidados parentais entre o horário referido.

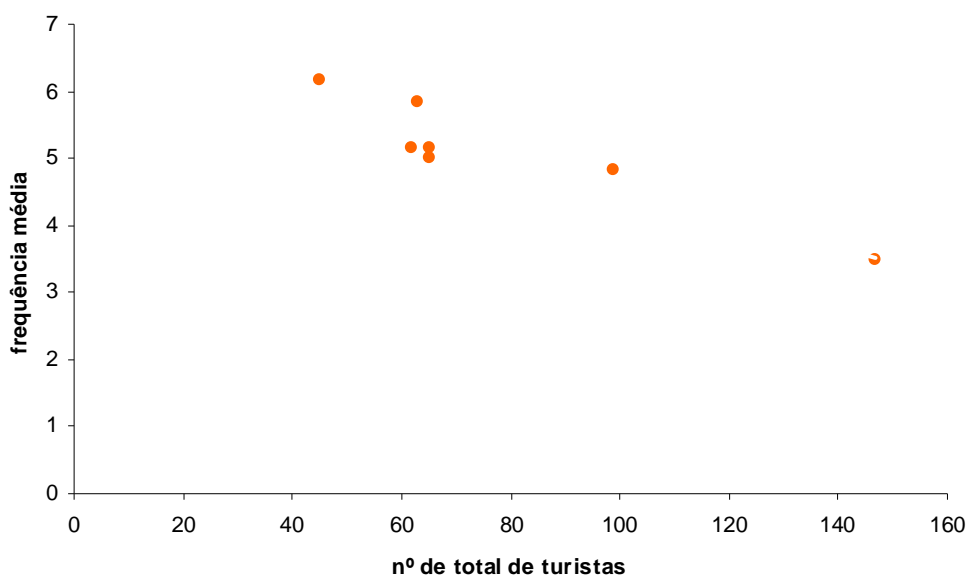


Figura 15 – Relação entre o nº total de turistas por dia e a frequência média de comportamentos alimentares para a espécie *C. lepidota* entre as 9h00 e as 16h00.

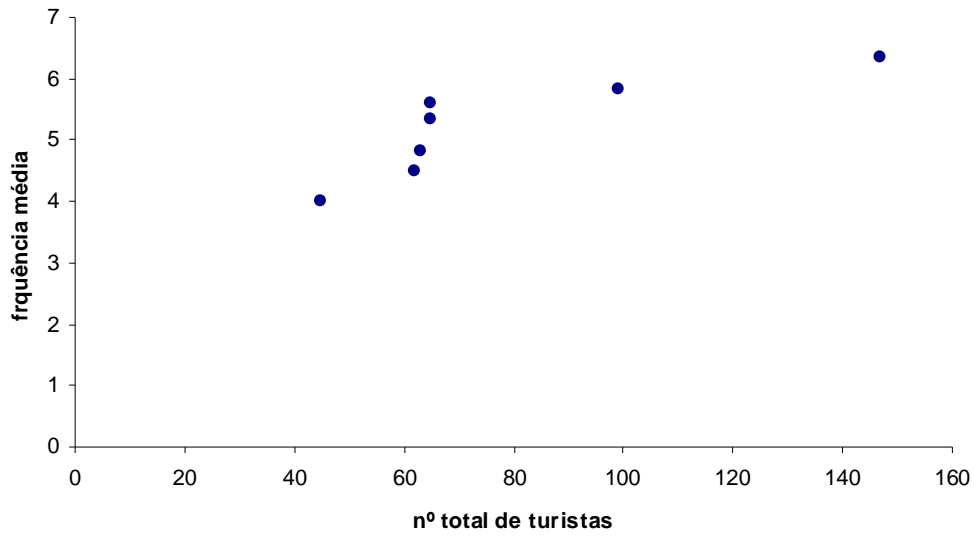


Figura 16 – Relação entre o nº total de turistas por dia e a frequência média de comportamentos de guarda do ninho para a espécie *C. lepidota* entre as 9h00 e as 16h00.

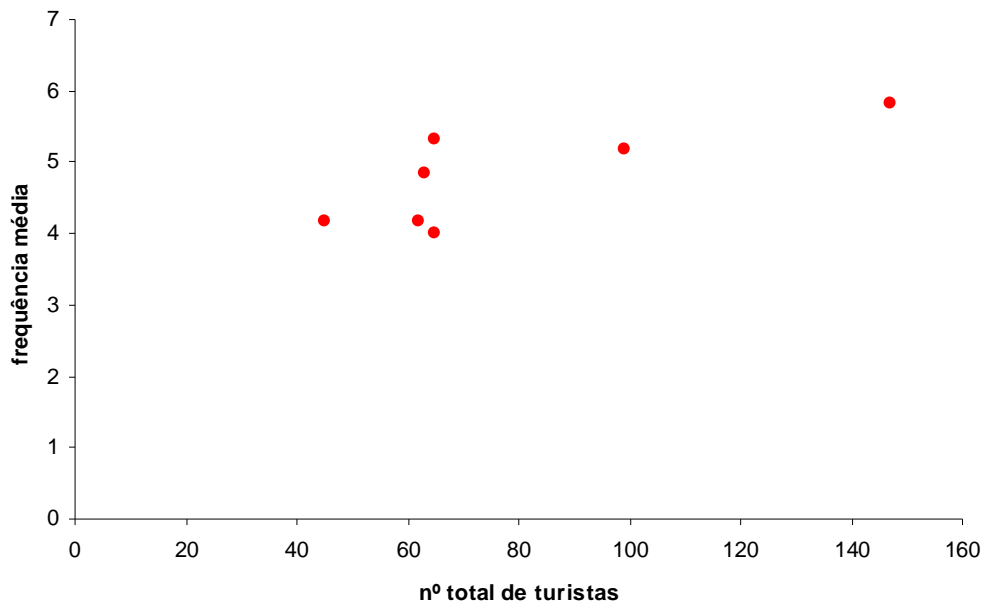


Figura 17 – Relação entre o nº total de turistas por dia e a frequência média de comportamentos de fuga para a espécie *C. lepidota* entre as 9h00 e as 16h00.

### 2.5.2. *M. bonita*

Verificou-se uma correlação negativa ( $r = -0,89$ ;  $N = 70$ ;  $p < 0,05$ ) entre o nº total de turistas por dia e a frequência média de comportamentos alimentares para *M. bonita* (Figura 18). Não foram verificadas correlações entre o nº total de turistas por dia e a frequência média de comportamentos agonísticos e de fuga entre as 9h00 e as 16h00.

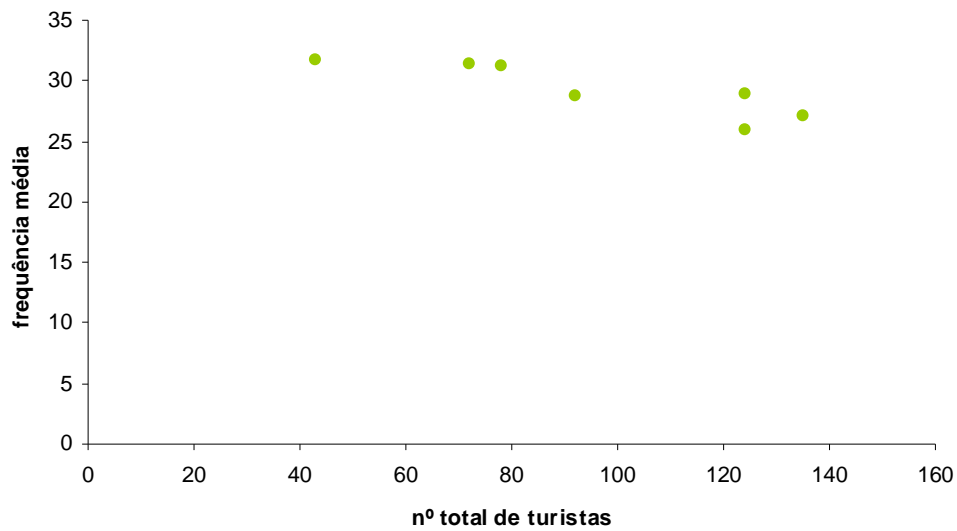


Figura 18 – Relação entre o nº total de turistas por dia e a frequência média de comportamentos alimentares para a espécie *M. bonita* entre as 9h00 e as 16h00.

### 3. Dados Hormonais

A análise dos dados obtidos relativamente à concentração média de cortisol na água entre o Ponto sem Turismo e o Ponto com Turismo para *M. bonita* indica uma diferença significativa entre os dois pontos ( $p < 0,005$ ), verificando-se uma maior concentração média de cortisol na água para os indivíduos do Ponto com Turismo (Figura 19).

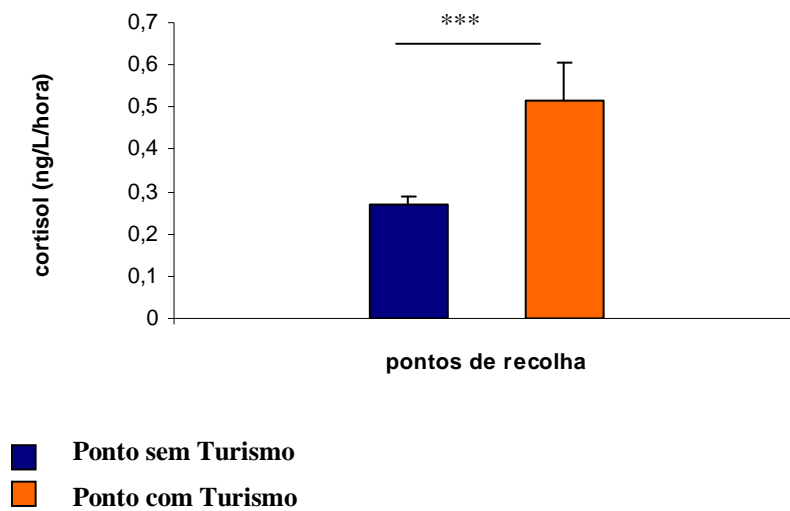


Figura 19 – Variação de cortisol na água nos indivíduos da espécie *M. bonita* no Ponto sem Turismo e no Ponto com Turismo (Teste de Mann-Whitney). Valores médios + desvio padrão da média;  $n = 6$ ;  $Z = -2,95$ ; \*\*\*  $p < 0,005$ .

## IV. DISCUSSÃO

### 1. Caracterização Ecológica dos Pontos de Amostragem

#### *1.1. Tipo de Fundo, Vegetação Subaquática, Velocidade da Corrente, Profundidade, Visibilidade e Temperatura*

O objectivo principal da caracterização dos parâmetros ecológicos dos dois pontos de amostragem (Ponto sem Turismo e Ponto com Turismo) foi o de avaliar a sua semelhança de modo a que uma comparação entre ambos reflectisse o impacto da presença de turistas e não o efeito de outras variáveis ecológicas. Os resultados obtidos mostraram que, dos 7 parâmetros analisados (tipo de fundo, vegetação subaquática, velocidade da corrente, visibilidade horizontal e vertical, profundidade e temperatura), 3 foram significativamente diferentes: velocidade da corrente, profundidade e visibilidade horizontal. A velocidade da corrente está directamente relacionada com a profundidade, pois quanto mais profundo é a secção do rio, maior é a sua capacidade de caudal e consequentemente, maior será a velocidade da corrente, tal como foi verificado para o Ponto com Turismo. Este facto permite que espécies de maior porte ocorram de uma forma mais significativa neste ponto, relativamente ao Ponto sem Turismo. No entanto, verificou-se que estas correspondem a espécies não carnívoras, que consomem, sobretudo, alimentos de origem terrestre (ANEXO IV- Tabela I), o que significa que a sua presença não constitui um perigo de predação para as espécies em estudo, não influenciando, deste modo, a sua ocorrência ou comportamento. A diferença de visibilidade horizontal também não consistirá num factor de importância fulcral pois dada a grande visibilidade para os 2 pontos ( $55,50\text{m} \pm 5,10\text{m}$ , Ponto sem Turismo e  $36,75\text{m} \pm 4,06\text{m}$ , Ponto com Turismo), é provável que a distância de resposta visual das espécies em estudo esteja abaixo dos valores verificados para ambos. Por estas razões, e apesar destas diferenças verificadas entre os dois pontos, estes foram considerados passíveis de comparação para o fim mencionado.

## **1.2. Composição e Estrutura da Comunidade Íctia**

As técnicas de censos visuais são selectivas no que diz respeito ao tamanho, aparência e comportamento dos organismos alvo. As pesquisas que envolvem observação directa pelo mergulhador adicionam erros aos dados, associados ao seu comportamento, à sua experiência e ao seu modo de decisão (Kulbicki & Sarramégna, 1999). Esses podem ser sistemáticos e aleatórios. Os sistemáticos, que se mantêm consistentes no que respeita à estimação da densidade e tamanho, em diferentes pontos de imersão, afectam minimamente a interpretação dos resultados em estudos comparativos. Por outro lado, os erros aleatórios, que adicionam ruído aos dados e afectam a precisão das estimativas, também não deverão influenciar a precisão do estudo, mas sim reduzir o seu poder de análise. Porém, o erro que é inconsistente no tempo ou espaço pode gerar interpretações erróneas (Edgar *et al.*, 2004). O observador que efectuou os censos visuais de ictiofauna, obteve uma experiência prévia de observação entre Novembro de 2005 e Março de 2006, para só em Março de 2007 efectuar a recolha dos dados apresentados, considerando-se que adquiriu uma experiência prévia razoável, aliado ao facto de ter sido sempre o mesmo a efectuar todos os pontos fixos de observação. Kulbicki & Sarramégna (1999), indicam que as estimativas não são afectadas pela variação do tipo de habitat.

### **1.2.1. Composição e Dinâmica da Comunidade**

Os resultados obtidos indicam uma diferença significativa relativa à Riqueza Específica, ao Índice de Shannon-Wiener, à Densidade e uma tendência quase significativa da Equitabilidade, todas superiores no Ponto com Turismo, quando comparados os dois pontos (Tabela 1). O facto de se observarem valores significativamente superiores para estes índices no Ponto com Turismo, sugere que a presença de turistas trará, numa primeira instância, benefícios para algumas das espécies de peixes presentes no rio que, pelas suas características ecológicas e pelas características físicas disponíveis no meio, aproveitar-se-ão da maior disponibilidade de alimentos proporcionada pelo facto dos turistas revolverem o fundo e mobilizarem a vegetação circundante fazendo com que, eventualmente, um maior número de sementes e frutos caiam na água, aumentando a disponibilidade de alimentos. Este facto poderá ser suportado pelos resultados obtido

por Sabino & Sazima (1999), que descreveram uma associação alimentar entre peixes caracídeos, visualmente orientados, consumidores alimento de origem exterior ao rio (especialmente frutas e sementes) e primatas que, ao se alimentam de frutos da vegetação marginal de rios, aumentam a disponibilidade de alimento para os peixes

Inúmeros estudos indicam que a hora do dia poderá ter efeitos significativos nos resultados de censos visuais de peixes (e.g., Thompson & Schmidt, 1997; Colton & Alevizon, 1981). Os resultados obtidos indicam não haver diferenças significativas nos índices medidos pelo método referido entre as diferentes horas do dia (9h, 13h e 16h), para os dois pontos em estudo. Este resultado, no entanto, não deverá implicar o facto de não haver mudanças diárias na abundância ou composição das espécies das populações de peixes observados pois as observações foram efectuadas em horários que não incluíram o pico de actividade crepuscular dos peixes, quando as mudanças na abundância populacional e na estrutura da comunidade normalmente ocorrem (Colton & Alevizon, 1981).

### ***1.2.2. Dinâmica Estrutural da Comunidade***

O modo como as comunidades biológicas se distribuem no espaço e a sua conexão com os processos capazes de controlar os seus padrões de distribuição são objecto de estudo da ecologia das comunidades (Gauch, 1982). Um pré-requisito para se interpretarem as diferenças entre comunidades de diferentes locais de amostragem deverá ser a demonstração de que existem diferenças estatisticamente significativas (Andersen, 2001). No entanto, devido à complexidade da distribuição das espécies, as matrizes de valores de densidade resultantes são dispersas e constituídas por uma elevada proporção de zeros e com um número de variáveis (espécies) geralmente superior aos locais de amostragem, características que impossibilitam a aplicação de análises estatísticas multivariantes clássicas, cuja fiabilidade dos dados depende da distribuição normal dos dados (Clarke & Warwick, 2001). Pelas razões referidas, os métodos de estatística não paramétrica demonstraram-se extremamente flexíveis para o tipo de dados na presente análise.

Na literatura não existe qualquer estudo semelhante efectuado para as espécies de peixes de água doce encontradas nos rios de Bonito. As razões para este facto são inúmeras,

mas derivam principalmente da limitação de recursos e da falta de conhecimento relativo às necessidades de conservação (Rome, 1999).

Mediante a utilização de diagramas de *nMDS*, com base em matrizes de similitude de *Bray-Curtis*, sustentados na significância do teste *ANOSIM*, foi possível distinguir 2 comunidades de ictiofauna (Figura 6), nos 6 pontos fixos de observação. O valor de *Stress* do diagrama *nMDS* (0,1) permite, segundo Clarke & Warwick, (2001) uma visualização adequada da variação dos dados.

As duas comunidades formadas correspondem directamente aos dois tipos de locais de amostragem: Ponto sem Turismo (A) e Ponto com Turismo (B). Apesar das diferenças físicas entre os dois locais, já mencionadas anteriormente, poderem até um certo grau, influenciar a formação destas duas comunidades, as condições ecológicas apresentadas pelo Ponto sem Turismo oferece, de igual forma e sem a restrição de habitats, a possibilidade de ocorrência das 14 espécies observadas no Ponto com Turismo. Este facto poderá indicar então que a razão que leva a estas duas formações estará relacionada com a presença de turistas.

De acordo com os resultados obtidos pelo *SIMPER*, as espécies que mais contribuíram para a similaridade das comunidades foram as espécies *Astyanax* sp., *Moenkausia bonita*, *Phenacogaster tegatus* (Tabela 2), todas de reduzido tamanho corporal, formação em cardume e que se alimentam sobretudo, de insectos aquáticos (Tabela I – ANEXO IV); enquanto que as duas espécies que mais contribuíram para a dissimilaridade entre as comunidades foram *Leporinus friderici* e *Brycon hilarii* (Tabela 3), que apresentam um tamanho corporal superior ao das outras espécies observadas (respectivamente 40cm e 56cm), uma maior mobilidade, e que se alimentam essencialmente de frutos e sementes de origem terrestre. Esta composição vem de encontro ao referido anteriormente, de que a presença de turistas poderá potenciar uma maior disponibilidade de alimentos de origem externa ao rio, o que representará uma vantagem imediata para estas espécies. A sua pouca “timidez” (1 e 2; Tabela I – ANEXO IV) face à presença de pessoas na água poderá ressaltar ainda mais este facto.

## 2. Dados Comportamentais

Os efeitos globais do impacto do Ecoturismo foram significativos em alguns dos padrões comportamentais observados relativamente às duas espécies em estudo. Para *C. lepidota* verificou-se uma redução da frequência de comportamentos alimentares e agonísticos e um aumento dos comportamentos de fuga no Ponto com Turismo. Estas diferenças indicam um impacto negativo da presença de turistas no rio entre as 9h00 e as 16h00 no comportamento desta espécie. O mesmo foi verificado para *M. bonita*, relativamente às frequências de comportamentos alimentares e de fuga, embora esta diferença tenha sido menos significativa para o comportamento alimentar (Tabela 5). Diversos autores sugerem que a presença antropogénica poderá induzir inúmeras consequências às espécies expostas, principalmente no que diz respeito à sua estrutura social e sobrevivência em longo prazo (Lacy & Martins, 2003; Muller *et al.* 2004; Sabino, 2003).

Estudos de Brodeur & Percy (1987), em juvenis de *Oncorhynchus kisutch*, sugerem que o ritmo alimentar diário é usualmente caracterizado por dois picos, um pela manhã, logo ao alvorecer do dia, e outro pela tarde, ao pôr-do-sol. Situações idênticas foram descritas em duas espécies de pescadas, *Plagioscion squamasissimus* e *P. montei*, na Amazônia Central (Rabelo & Araújo-Lima, 2002) o que está de acordo com o padrão alimentar diário observados para duas espécies em estudo (Figura 7 e Figura 12). As diferenças mais significativas entre a frequência alimentar no Ponto com Turismo e no Ponto sem Turismo tanto para *C. lepidota* quanto para *M. bonita* verificaram-se entre as 9h00 e as 16h00, horário coincidente com a presença diária de turistas no rio. A redução da frequência de comportamentos alimentares no Ponto com Turismo evidencia o facto de que durante a presença de turistas na água, o comportamento alimentar de ambas é inibido, provavelmente porque esta perturbação será percebida como uma ameaça.

Relativamente a *C. lepidota*, às 8h00 verificou-se uma diferença significativa entre a frequência alimentar nos dois pontos, apesar desta preceder a primeira entrada de turistas no rio. Esta diferença poderá ser justificada como uma antecipação dos indivíduos à primeira perturbação, que ocorre diariamente a partir das 9h00, como forma de evitar a exposição à ameaça. Alguns estudos demonstram que certas espécies

de peixe apresentam a capacidade de aprendizagem através de estímulos do meio (Hollis, 2004; Mathis *et al.* 1986 1996 Verheijen 1956, Smith & Smith 1989), corroborando esta hipótese.

Terminado o horário de visita (16h00), a redução da frequência alimentar no Ponto com Turismo manteve-se significativa, nas horas seguintes de observação (17h00, 18h00 e 19h00) para *C. lepidota*, apesar da ausência de turistas. Este facto poderá indicar que os peixes demoram algum tempo até se adaptarem novamente às condições iniciais da manhã (sem a presença de turistas na água), mas que eventualmente tentam recuperar esta diferença, pois a frequência alimentar a partir das 17h00 é sempre crescente, verificando-se que às 19h00 esta é superior no Ponto com Turismo. Alguns autores verificaram comportamentos de compensação em animais após um período de inibição destes comportamentos devido a factores externos, sugerindo um “rebound effect” (e.g. Dellmeier *et al.*, 1985; Mal *et al.*, 1991; Jensen, 1999). Este aumento da frequência alimentar ao final da tarde poderá então ser visto como um efeito compensatório (“rebound effect”) da supressão alimentar ocorrida durante o dia como consequência da presença de turistas. Apesar desta aparente tentativa de compensação do comportamento alimentar dos indivíduos ao fim da tarde, a redução global da frequência deste comportamento no Ponto com Turismo é notória (Tabela 5).

Verificou-se uma maior frequência de comportamentos de guarda do ninho para *C. lepidota* durante os períodos de maior incidência luminosa (entre as 10h00 e as 16h00) (Figura 8), tanto no Ponto sem Turismo como no Ponto com Turismo. Este aumento poderá ser justificado pelo facto de que nos períodos de maior incidência luminosa os indivíduos e a sua prole procurem estar menos expostos a um potencial risco de predação maior. Após as horas de visita turística (entre as 17h00 e as 19h00) não há diferenças significativas entre os dois pontos, tal como nas horas sem visita turística na parte da manhã (entre as 6h00 e as 8h00). Apesar de apenas ter ocorrido um aumento significativo da frequência destes comportamentos às 9h00 e da diferença global entre os dois pontos não ter sido significativa (Tabela 4), pressupõe-se que durante a presença de turistas no rio, os indivíduos desta espécie despendam mais energia a guardar o ninho. Sabino (2003) sugere que a estratégia reprodutora de *C. lepidota*, com nidificação em micro-habitats abrigados e cuidados parentais, deva ampliar as possibilidades de sobrevivência da prole, em condições naturais. No entanto, a

passagem persistente de visitantes perto dos ninhos, especialmente durante a alta temporada, provoca uma perturbação que leva a que os indivíduos permaneçam em guarda do ninho e da prole em vez de saírem em busca de alimento (Figura 20).



Figura 20 – Casal de *C. lepidota* (macho à esquerda, fêmea à direita), a proteger a prole no seu ninho após serem perturbados. Os juvenis encontram-se à volta da fêmea (seta) (Foto de J. Sabino, Baía Bonita).

Apesar da diferença entre a frequência de comportamentos sexuais e de cuidados parentais não ter sido significativa entre os dois pontos relativamente a nenhuma hora de observação, é de notar que o maior número de turistas ocorre durante a alta temporada, período que coincide com o pico de reprodução das espécies residentes no rio, como é o caso de *C. lepidota*. Sabino (2003), verificou uma grande discrepância entre o número de ovócitos registrados em fêmeas dissecadas desta espécie e o número de larvas e juvenis observados em estudo. De acordo com o mesmo autor, deve haver uma perda das formas juvenis por predação ou morte natural, mas também é possível que parte da mortalidade seja consequência de pressões ambientais decorrentes do stress causado pelo excesso de visita turística.

Relativamente à frequência de comportamentos agonísticos, verificou-se uma redução significativa desta no Ponto com Turismo durante o horário de visita turística (entre as 9h00 e as 16h00) para *C. lepidota*, com excepção das 9h00, na qual esta diferença não se revelou significativa. Esta redução poderá ser justificada pelo facto do comportamento agonístico nesta espécie estar eventualmente mais relacionado com a

defesa de território e da prole, e não tanto com a disputa por alimento, como sugerido por Reynolds (1979) para *Pomacanthus zonipectus*. Deste modo, esta redução verificada no Ponto com Turismo, poderá ser justificada por uma redução dos comportamentos agonísticos inter-específicos. No Ponto sem Turismo os indivíduos apresentam comportamentos agressivos em relação a indivíduos de outras espécies de predadores naturais por questões territoriais e de guarda da prole, cujas dimensões se aproximem das suas próprias dimensões corporais, ao contrário do Ponto com Turismo onde a ameaça apresentada pela presença humana na água toma dimensões muito maiores a nível da percepção visual do peixe. Assim, supõe-se que a reacção natural dos indivíduos neste ponto de observação será a de se esconderem perante a ameaça, e não a de apresentarem comportamentos agonísticos perante a mesma. Relativamente a *M. bonita*, não se verificaram diferenças significativas em relação aos comportamentos agonísticos nos dois pontos com excepção das 19h00, na qual ocorreu um aumento no Ponto com Turismo. Uma vez que esta espécie não apresenta qualquer tipo de requisitos específicos de habitats, como ninhos, é possível que este aumento se justifique pela agressividade na disputa por alimento ao fim do dia, período em que haverá uma tentativa de recuperação da frequência alimentar inibida entre as 9h00 e as 16h00 pela presença de turistas.

O aumento da frequência dos comportamentos de fuga no Ponto com Turismo foi significativo apenas durante o horário de visita turística (entre as 9h00 e as 16h00) para as duas espécies em estudo (Figura 11 e 14), com excepção das 10h00 para *M. bonita*. Este facto sugere que os indivíduos destas espécies reagem à presença humana na água com a fuga, de modo a evitar a causa da perturbação. É de notar que o intervalo de passagem dos turistas pelo rio poderá ter bastante influência no comportamento dos indivíduos, principalmente do que diz respeito a *C. lepidota*, pois tal como foi descrito anteriormente, esta espécie responde à presença de turistas na água escondendo-se até que a ameaça desapareça, enquanto *M. bonita* foge, mas não se esconde, voltando poucos segundos depois à posição inicial. Deste modo, quanto menor é o intervalo entre a passagem dos grupos de turistas, maior será o tempo em que os indivíduos da primeira espécie irão passar escondidos, eventualmente deixando de realizar outras actividades essenciais à sua sobrevivência e reprodução como comportamentos alimentares ou de corte. Os comportamentos de fuga registados no Ponto sem Turismo provavelmente

correspondem a fugas relativas a outros predadores naturais desta espécie ou à influência exercida pelo próprio observador.

Tendo em consideração que os dados foram obtidos entre finais de Outubro de 2005 e Fevereiro de 2006, é importante referir o facto de que as observações ocorreram durante um período de transição entre a época seca (Junho a Novembro) e a época de chuvas (Dezembro a Maio), o que implica que o rio aumentou o seu nível de água devido à maior pluviosidade, o que poderá ter tido influência nas características ecológicas do ecossistema em estudo. No entanto, os resultados obtidos por Gurgel *et al.* (1998) para indivíduos da espécie *C. lepidota* mostraram não haver diferenças qualitativas ou quantitativas na composição da dieta desta espécie em períodos de seca *Vs.* períodos de chuvas, o que sugere que as mudanças físicas verificadas entre um período e outro no rio não devem influenciar directamente o seu comportamento alimentar.

A análise da realizada para o mesmo ponto de observação antes e depois da primeira perturbação infligida ao ecossistema (correspondente à entrada do primeiro grupo de turistas no rio às 9h00), apresenta diferenças significativas na frequência de comportamentos das duas espécies em estudo. Este facto demonstra que há um comportamento normal dos indivíduos antes da perturbação e uma alteração deste como consequência da perturbação infligida. *C. lepidota* apresentou uma redução significativa de frequências de comportamentos alimentares entre as 8h00 e as 9h00 e um aumento significativo da frequência de comportamentos de guarda do ninho e de fuga no Ponto com Turismo. *M. bonita* apresentou também uma redução significativa da frequência alimentar entre as 8h00 e as 9h00, assim como um aumento da frequência de comportamentos de fuga (Tabela 9). Estas diferenças corroboram o proposto por Iwama (2004), de que poderá ser de carácter adaptativo para um indivíduo que as respostas comportamentais à percepção de uma causa de stress irá diminuir a magnitude potencial da mesma, aumentando, deste modo, as possibilidades de sobrevivência desse indivíduo. Para além disso, Schreck (1981), cita que uma resposta apropriada a uma causa de stress poderá ser o evitar a causa. No entanto, se o evitar a causa não é possível, ocorrem mudanças de comportamento e estas, por sua vez, poderão ter consequências depreciativas no modo como os animais sentem e respondem ao ambiente. É de notar que esta perturbação infligida às 9h00 é aquela que possivelmente exercerá um maior impacto nas espécies residentes, nomeadamente as duas em estudo pois para além de corresponder à primeira entrada diária de turistas no rio, o

primeiro grupo de turistas não recebe formação prévia do uso de equipamento (fato de neoprene, máscara, tubo e colete) e adaptação da flutuabilidade dentro da água. Este facto é agravado pelo facto de que para muitas das pessoas que efectuam esta flutuação, será a primeira vez que utilizam este tipo de equipamento, não dominando o seu posicionamento na água.

O aumento da frequência dos comportamentos de fuga verificados para *C. lepidota* no Ponto sem Turismo entre as 8h00 e as 9h00 poderá ser explicado pelo facto de haver no local de observação sem a presença humana, outras espécies de peixes predadores naturais desta espécie ou devido à influência do próprio observado. A redução significativa da frequência de comportamentos alimentares verificada para *M. bonita* entre as 8h00 e as 9h00 no Ponto sem Turismo ocorre possivelmente pela variação natural do padrão alimentar observado para esta espécie de redução dos comportamentos alimentares durante o período de maior incidência luminosa.

Os resultados deste estudo indicam diferenças significativas na frequência de padrões comportamentais das espécies analisadas, entre o Ponto sem Turismo e o Ponto com Turismo. Porém, estes resultados não indicam se a corrente prática do Ecoturismo no Rio Sucuri, com a actual capacidade de carga de turistas por dia, é ou não feita de uma forma sustentada relativamente às espécies estudadas. No entanto, a correlação entre o nº total de turistas por dia e a frequência média dos comportamentos padrão estudados entre as 9h00 e as 16h00 (horário de visita) indicam um decréscimo da frequência média de comportamentos alimentares tanto para *C. lepidota* (Figura 15), quanto *M. bonita* (Figura 18) com o aumento do nº total de turistas por dia, assim como se verifica o aumento da frequência média de comportamentos de guarda do ninho (Figura 15) e de fuga (Figura 16) para a primeira espécie, o que supõe que a capacidade de carga do rio será um factor importante para a manutenção das espécies estudadas em seus habitats naturais.

Tendo em conta o facto de que as práticas de ecoturismo são efectuadas há mais de dez anos neste rio e que o número de turistas tem vindo a aumentar consecutivamente a cada ano que passa, põe-se a questão se estas diferenças poderão originar mudanças no sistema de organização social das espécies estudadas. Pode-se questionar se as diferenças observadas serão fruto de uma tentativa de adaptação ao stress causado pela

influência antropogénica e se esta será o suficiente a longo prazo para garantir sobrevivência da espécie, face à tendência cada vez maior do aumento do Ecoturismo. Estas diferenças podem indicar assim o início do desencadear de consequências mais graves para as espécies a longo prazo devido ao desvio de energia de crescimento, reprodução, alimentação para actividades relacionadas com a tentativa de evitar e/ou adaptarem-se à perturbação.

Hipoteticamente, se a presença de turistas no rio for considerada pelos indivíduos em estudo como a presença de um potencial predador, vários estudos para outras espécies de peixes teleósteos demonstram que estes efeitos não letais a curto prazo, podem influenciar a sobrevivência dos indivíduos expostos ao stress a longo prazo devido à presença de predadores por longos períodos de tempo, afectando assim a dinâmica populacional e a estrutura da comunidade (Woodley & Peterson 2003; He & Kitchell 1990; Houston *et al.* 1993; Von Buskirk & Arioli 2002). De qualquer forma, os resultados obtidos poderão ser considerados como um primeiro indício de que existe uma influência antropogénica no comportamento destas espécies, corroborando o proposto por Shumway (1999), de que os métodos e técnicas comportamentais contribuem para o aumento das práticas de conservação e monitorização da natureza.

A análise geral dos resultados mostrou que a magnitude das diferenças entre os pontos sem turismo e com turismo é menor para *M. bonita* e que, deste modo, o impacto do ecoturismo poderá ser menos intenso nesta espécie, relativamente *C. lepidota*. Verificou-se que a primeira se alimenta em média menos 28,8% no total (entre as 6h00 e as 19h00) no Ponto com Turismo e que durante o horário de visita turística (entre as 9h00 e as 16h00) esta diferença chega a 57,4%, enquanto a última alimentou-se em média menos 5% no total no Ponto com Turismo e durante o horário de visita turística esta diferença foi de 9%. Este facto dever-se-á às diferenças na biologia e nos sistemas sociais entre as duas espécies. A estratégia social da última possivelmente exige que os indivíduos despendam uma maior quantidade de energia a defender a prole e o ninho como consequência da pressão antropogénica, do que em outras actividades essenciais à sua sobrevivência como a alimentação. A maior sensibilidade desta espécie à presença humana corrobora o proposto por Sabino (2003), de que *C. lepidota* é uma espécie bioindicadora da qualidade dos rios da região de Bonito, nomeadamente em relação ao impacto do ecoturismo. A diferença encontrada em relação às duas espécies evidencia o

facto de que será imperativa a realização de mais estudos de impacto do ecoturismo a vários níveis e diferentes espécies, uma vez que cada espécie é susceptível de apresentar uma resposta diferente e de estar melhor ou pior adaptada às mudanças no ecossistema.

### 3. Dados Hormonais

Os estudos relacionados com os níveis de stress em populações selvagens de peixes teleósteos têm sido realizados maioritariamente em espécies de salmonídeos (e.g. Pickering & Pottinger, 1987). Mais recentemente, os níveis de stress hormonal em populações selvagens de outras espécies em seus habitats naturais, principalmente em habitats de água doce, têm sido utilizados como um indicador inicial de degradação ambiental (Almada *et al.*, 1999). Inúmeros estudos demonstram que a medição dos níveis de cortisol na água é útil para a estimativa da resposta ao stress em peixes, em detrimento de técnicas mais invasivas (Scott & Sorensen, 1994; Moriwaki *et al.*, 1991; Hirschenhauser *et al.*, 2004; Scott *et al.*, 2001; Ruane & Komen, 2003; Ellis *et al.*, 2004). Deste modo, o método de medição da concentração de cortisol na água é adequado para as espécies em estudo.

Os resultados obtidos para *M. bonita* mostram níveis de cortisol na água significativamente superiores no Ponto com Turismo (Figura 19), o que sugere que os indivíduos desta espécie, quando sujeitos a uma situação de stress padronizada de captura, transporte e confinamento, apresentam níveis de cortisol superiores quando já expostos anteriormente a uma situação de stress prolongada. Ou seja, possivelmente apresentarão um aumento mais rápido da carga alostática relativamente aos indivíduos que não estiveram expostos ao stress causado pela presença de turistas. Muitos autores sugerem que os indivíduos sujeitos mais facilmente a situações de stress pagam um preço a nível da sua sobrevivência óptima a longo prazo, uma vez que o stress terá um efeito pejorativo em inúmeros processos como o crescimento, reprodução e funcionamento do sistema imunitário (Blas *et al.*, 2007; Korte *et al.*, 2005; Moberg, 2000). Este resultado inicial poderá indicar o uso dos níveis de cortisol na água como indicadores biológicos de stress em peixes de água doce expostos ao ecoturismo.

As respostas comportamentais e fisiológicas a uma causa de stress estão intimamente relacionadas (Iwama, 2004). A resposta comportamental adaptativa pode diminuir a exigência energética nos sistemas fisiológicos que necessitam de responder ao stress, enquanto a resposta fisiológica mantém, direcciona e possivelmente limita a resposta comportamental. Com base neste pressuposto, e de acordo com a análise dos resultados obtidos tanto a nível comportamental, como a nível hormonal para *M. bonita*, sugere-se uma ligação entre as diferenças significativas verificadas na frequência dos padrões comportamentais das espécies em estudo nos pontos sem e com turismo, e a sua resposta fisiológica. Estes resultados apontam para um impacto possivelmente negativo do Ecoturismo no rio Sucuri para estas espécies. No entanto, os dados ecológicos indicam precisamente o contrário, uma vez que foram verificados valores significativamente superiores de riqueza específica, diversidade e densidade na zona exposta ao turismo. Estes parâmetros quando positivos, normalmente indicam um local exposto a um impacto possivelmente sustentável (Mitraud, 2001; Garay & Dias, 2001; Sabino & Andrade, 2002). Este facto sugere que um estudo geral e menos minucioso, baseado apenas em dados ecológicos de abundância de espécies não será o suficiente na determinação da verdadeira magnitude do impacto do ecoturismo pois exclui outros aspectos como o comportamental e fisiológico, que possivelmente poderão ter uma influência a longo prazo na sobrevivência das espécies mais sensíveis.

No seguimento deste raciocínio, propõem-se uma série de estudos futuros que possam contribuir, de algum modo, para a realização de um Ecoturismo sustentado no Rio Sucuri, assim como uma série de recomendações práticas a nível do modo como é feito o processo da flutuação no rio (ANEXO VI). Apesar de não se verificarem aparentemente efeitos a curto prazo do impacto antropogénico, uma atitude preventiva é recomendada pois tal como evidenciado por Buckley, (1999), a partir do momento em que o impacto negativo é consideravelmente perceptível, as opções de uma gestão sustentada são rapidamente reduzidas pois podem já não compensar as perdas de biodiversidade. Deste modo, sugere-se a continuação de estudos fisiológicos e comportamentais para espécies de peixes em particular, nomeadamente entre as espécies ditas “oportunistas” e as mais sensíveis assim como estudos acerca do seu sucesso reprodutor e que permitam a comparação da sua eco-etologia entre a alta e a baixa temporada.

## V. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente estudo indicam que, quando expostos à presença diária de turistas durante a alta temporada, os indivíduos de *C. lepidota* apresentam mudanças significativas a nível do seu comportamento alimentar, agonístico, de fuga, e guarda do ninho, e que os indivíduos de *M. bonita* apresentam mudanças significativas não só a nível do seu comportamento alimentar e de fuga, mas também a nível da sua fisiologia. Partindo da premissa de que o stress assume um papel importante no sucesso reprodutor e na sobrevivência óptima dos indivíduos, consequentemente contribuindo para a sua persistência em habitats naturais, estes resultados poderão ser interpretados, numa primeira análise, como um impacto negativo do ecoturismo nestas duas espécies.

Contrariamente, no entanto, os dados ecológicos obtidos a partir da técnica de censos visuais indicam que a presença de turistas poderá ser favorável, numa primeira instância, a espécies com diferentes ecologias visto a maior densidade, diversidade e riqueza específicas terem sido verificadas no Ponto com Turismo. A análise geral dos resultados obtidos poderá assim indicar que um estudo geral, baseado apenas em dados ecológicos relacionados com a abundância de espécies não será suficiente para determinar a sustentabilidade do local, uma vez que uma análise mais fina através de métodos que normalmente não seriam aplicáveis a este tipo de situação demonstram um impacto a outros níveis, nomeadamente fisiológico e comportamental, cuja magnitude ainda não se mostra suficientemente grande para ser notada a nível de perdas de biodiversidade. Deste modo, indicadores comportamentais e fisiológicos poderão vir a ser utilizados no futuro como indicadores precoces de impactos negativos.

## VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, C., Braithwaite, V., Huntingford, F., Kadri, S., Pottinger, T., Turnbull, J. 2002. *Fish Welfare*. Briefing Paper 2. Fisheries Society of the British Isles. Pp 8-13.
- Anderson, M. J. 2001. *A new method for non-parametric multivariate analysis of variance*. Australian Ecology. 26:32-46.
- Almada, V.C., Oliveira, R.F., Gonçalves, E.J. 1999. *Hormones, behaviour and conservation of littoral fishes: current status and prospects for future research*. International Symposium on "Behaviour and Conservation of Littoral Fishes", Instituto Superior de Psicologia Aplicada. Pp 149-179.
- Barton, B. A. 1997. *Stress in finfish: past, present, and future - a historical perspective*. Pp 1-33 in Iwama, G.K., Pickering, A.D., Sumpter, J.P., Schreck, C.B. (Eds). *Fish Stress and Health in Aquaculture*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Barton, B.A. & Iwama, G.K. 1991. *Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids*. Annual Revision of Fish Diseases. 1: 3–26.
- Barton, B.A., Morgan, J.D., Vijayan, M.M. 2002. *Physiological and condition-related indicators of environmental stress in fish*. Pp 111-148 in Adams, S. M. (Ed.). *Biological Indicators of Aquatic Ecosystem Stress*. American Fisheries Society. Bethesda.
- Benine, R.C., Castro, R.M.C., Sabino, J. 2004. *M. bonita: A New Small Characin Fish from the Rio Paraguay Basin, Southwestern Brazil (Characiformes: Characidae)*. Copeia. 1: 68–73.
- Berman, D.G., Johnson, D.E., Philips, R.W., Barry, B.P. 1980. *Physiological and urinary metabolite responses to cold shock and confinement of sheep*. Journal of Animal Science. 50: 713-722.
- Binuramesh, C., Prabakaran, M., Steinhagen, D., Michael, R.D. 2005. *Effect of chronic confinement stress on the immune responses in different sex ratio groups of Oreochromis mossambicus (Peters)*. Aquaculture. 250: 47-59.
- Blas, J, Bortolotti, G.R., Tella J.L., Baos, R., Marchant T.A. 2007. *Stress response during development predicts fitness in a wild, long lived vertebrate*. Biological Sciences/Ecology. PNAS. 104 (21): 8880-8884.
- Bshary, R., Oliveira, R.F., Oliveira, T., Canário, A.V.M. 2007. *Cleaning organisms reduce the stress response of client reef fish* (em publicação).

- Boggiani, P.C. 1999. *Geologia da Bodoquena*. Pp 90-102 in Scremin-Dias, E., Pott, V.J., Hora, R.C. & Souza, P.R. (Eds.). *Nos jardins submersos da Bodoquena: guia para identificação de plantas aquáticas de Bonito e região*. Editora da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.
- Bonga, S.E.W., Balm, P.H.M. 1999. *Histological and histopathological effects of stress*. Pp 179-204 in Balm, P.H.M. (Ed). 1999. *Stress Physiology in Animals*. Sheffield Academic Press, England.
- Bortone, S.A., Kimmel, J.J., Bundrick, C.M. 1989. *A comparison of three methods for visually assessing reef fish communities: time and area compensated*. Northeast. Gulf Science. 10: 85–96.
- Bratton, S.P. 1985. *Effects of disturbance by visitors on two woodland orchid species in Grea Smoky Mountains National Park, USA*. Biological Conservation. 31: 211-227.
- Brodeur, R.D., Percy, W.G. 1987. *Diel feeding chronology, gastric evacuation and estimated daily ration of juvenile coho salmon, Oncorhynchus kisutch (Walbaum) in the costal marine environment*. Journal of Fish Biology. 31: 465-478.
- Brock, V.E. 1954. *A preliminary report on a method of estimating reef fish populations*. Journal of Wild Life Management. 18: 297–308.
- Brown, C. & Warburton, K. 1999. *Social mechanisms enhance escape responses in shoals of rainbowfish (Melanotaenia duboulayi)*. Environmental Biology of Fishes. 56: 455-459
- Buchholz, R. 1997. *Behavioral approaches to conservation in the wild*. Cambridge University Press. 382 pp.
- Buck, S.M. & Sazima, I. 1995. *An assemblage of mailed catfishes (Loricariidae) in southeastern Brazil: distribution, activity, and feeding*. Ichthyological Explorations of Freshwaters. 6: 325-332.
- Buckley, R. 1999. *Tools and Indicators for Managing Tourism in Parks*. Annals of Tourism Research. 26(1): 207-210.
- Carlstead, K., Brown, J.L., Monfort, S.L., Killens, R., Wildt, D. 1992. *Urinary monitoring of drenal responses to psychological stressors in domestic and nondomestic felids*. Zoo Biology . 11: 165-176.
- Cifuentes, M. 1992. *Determinación de capacidad de carga turística en áreas protegidas*. Turrialba: Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza – CATIE.
- Clarke, K.R., & Warwick, R.M. 2001. *Change in marine communities – an approach to statistical analysis and interpretation*. Plymouth Marine Laboratory. 144 pp.

- Cole, D.N. 1993. *Minimizing conflict between recreation and nature conservation*. Pp 105-122 in Smith D.S. & Hellmund P.C. (Eds.). *Ecology of greenways: Design and function of linear conservation areas*. University of Minnesota Press, Minneapolis.
- Colton, D.E. & Alevizon, W.S. 1981. *Diurnal variability in a fish assemblage of a Bahamian coral reef*. *Environmental Biology of Fishes*. 6: 341–345.
- Cooke, B. & Beastall, G.H. 1987 *In Green, B. e Leake, R.E (eds). Steroid hormones – a practical approach*. Oxford: IRL Press.
- Costacurta, M.B. 2005. *Subsídios para a elaboração do plano de manejo da Reserva Particular do Património Natural (RPPN) Fazenda São Geraldo, Município de Bonito, Mato Grosso do Sul*. 156 pp.
- Culik, B.M. & Wilson, R.P. 1995. *Penguins disturbed by tourists*. *Nature*. 376:301-302.
- Davis, K.B., Torrance, P., Parker, N.C., Suttle, M.A. 1985. *Growth, body composition and hepatic tyrosine aminotransferase activity in cortisolfed channel catfish, Ictalurus punctatus Rafinesque*. *Journal of Fish Biology*. 27: 177– 184.
- Dellmeier, G.R., Friend, T.H., Gbur, E.E., 1985. *Comparison of four methods of calf confinement. II. Behaviour*. *Journal of Animal Science*. 60: 1102– 1109.
- Diouf, B., Rioux, P., Blier, P.U., Rajotte, D. 2000. *Use of brook char (Salvelinus fontinalis) physiological responses to stress as a teaching exercise*. *Advances in Physiology Education*. 23: 18–23.
- Duffus, D.A. & Dearden, P. 1990. *Non-consumptive wildlife-oriented recreation: a conceptual framework*. *Biological Conservation*. 53: 213-232.
- Duplisea, D.E., Blanchard, F. 2005. *Relating Species and Community Dynamics in an Heavily Exploited Marine Fish Community*. *Ecosystems*. 8: 899– 910.
- Edgar, G.J., Barret, N.S., Morton, A.J. 2004. *Biases associated with the use of underwater visual census techniques to quantify the density and size-structure of fish populations*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 308: 269– 290.
- Ellis, T., James, J.D., Stewart, C., Scott, A.P. 2004. *A non-invasive stress assay based upon measurement of free cortisol released into the water by rainbow trout*. *Journal of Fish Biology*. 65: 1233–1252.
- Evans, P.G.H. 1996. *Human disturbance of cetaceans*. Pp 376-394 in Taylor, V.J. & Dunstone N. (Eds.). *The Exploitation of Mammal Populations*. Chapman & Hall. London.

- Garay, I. & Dias B.F.S. 2001. *Conservação da Biodiversidade em Ecossistemas Tropicais: avanços conceituais e revisão de novas metodologias de avaliação e monitoramento*. Editora Vozes. Petrópolis. 430 pp.
- Gauch, H.G. 1982. *Multivariate analysis in community ecology*. Cambridge University Express. Cambridge. 298 pp.
- Garber, S.D. & Burger J.1995. A 20-YR study documenting the relationship between turtle decline and human recreation. *Ecological Applications*. 5(4): 1151-1162.
- Godfrey, M.H. & Barreto. R. 1995. *Beach vegetation and seafinding orientation of turtle hatchlings*. *Biological Conservation*. 74: 29– 32.
- Goodey, W. & Liley, N.R. 1985. *Grouping fails to influence the escape behaviour of the guppy (Poecilia reticulata)*. *Animal Behaviour*. 33: 1032-1033.
- Gurgel, H.C.B., Almeida, R.C., Barbieri, G. & Vieira, L.J.S. 1998. *Diet of C. lepidota Heckel, 1840 (Perciformes, Cichlidae) da lagoa Redonda, NisiaFloresta, RN*. *Acta-Scientiarum*. 20(2): 191-194.
- Harmelin-Vivien, M.L., Harmelin, J.G., Chauvet, C., Duval, C., Galzin, R., Lejeune, P., Barnabe', G., Blanc, F., Ghevalier, R., Duclerc, J., Lasserre, G., 1985. *Evaluation visuelle des peuplements et populations de poissons: methodes et problemes*. *Review of Ecology (Terre Vie)*. 40: 468–539.
- He, X. & Kitchell, J.F., 1990. *Direct and indirect effects of predation on a fish community: a whole-lake experiment*. *Transactions of the American Fisheries Society*. 119: 825–835.
- Hirschenhauser, K., Ros, A.F.H., Carneiro, L.A., Oliveira, T., Silva, A., Canário, A.V.M., Oliveira, R.F., 2002. *Non-invasive hormone assessment from fish-holding water*. *Advances in Ethology*. 37:139.
- Hirschenhauser, K., Taborsky, M., Oliveira, T., Canário, A.V.M., Oliveira, R.F., 2004. *A test of the “challenge hypothesis” in cichlid fish: simulated partner and territory intruder experiments*. *Animal Behaviour*. 68: 741–750.
- Hart, P.J.B. 1997. *Foraging Tactics*. Chapter 5 in Godin, J-G. J. (Eds.). *Behavioural Ecology of Teleost Fishes*. Oxford University Press.
- Hollis, K. L. 2004. *The Role of Learning in the Aggressive and Reproductive Behavior of Blue Gouramis, Trichogaster trichopterus*. *Environmental Biology of Fishes*. 54 (4): 355-369.

- Houston, A.I., McNamara, J. M., Hutchinson, J.M.C., 1993. *General results concerning the trade-off between gaining energy and avoiding predation*. Philosophical Transactions. R .Soc. Lond B. 341:3 75–397.
- Idler, D.R. & Truscott, B. 1972. *Corticosteroids in fish*. Pp 126 – 252 in Idler, D. R. (Ed.). *Steroids in Nonmammalian Vertebrates*. Academic Press, New York.
- Iwama, G.K. 2004. *Stress in Fish*. AquaNet Workshop on Fish Welfare. Campbell River, B.C. Canada. 9 pp.
- Jacobson, S.K. & Lopez, A.F. 1994. *Biological impacts of ecotourism: tourists and nesting turtles in Tortuguero National Park, Costa Rica*. Wildlife Society Bulletin. 22: 414-419.
- Jensen, M.B. 1999. *Effects of confinement on rebounds of locomotor behaviour of calves and heifers, and the spatial preferences of calves*. Applied Animal Behaviour Science. 62: 43–56.
- Jaworska, J.S., Rose, K.A., Barnthouse, L.W. 1997. *General response patterns of fish populations to stress: an evaluation using an individual-based simulation mode*. Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery. 6: 15–31.
- Jongman, R.H.G., Ter Braak, C.K.F., Van Tongeren, O.F.R. 1995. *Data analysis in community and landscape ecology*. Cambridge University Press. UK. 299 pp.
- King, D.A. & Stewart, W.P. 1996. *Ecotourism and comodification: protecting people and places*. Biodiversity Conservation. 5:293-305.
- Korte, S.M., Koolhaas, J.M., Wingfield, J.C., McEwen, B. S. 2005. *The Darwinian concept of stress: benefits of allostasis and costs of allostatic load and the trade-offs in health and disease*. Neuroscience and Biobehavioral Reviews. 29: 3–38.
- Kulbicki, M. & Saramégna, S. 1999. *Comparison of density estimates derived from strip transect and distance sampling for underwater visual censuses: a case study of Chaetodontidae and Pomacanthidae*. Aquatic Living Resources. 12(5): 315–325.
- Labrosse, P., Kulbicki, M., Ferraris, J. 2002. *Underwater Visual Fish Census: Proper use and implementation*. Reef Resources Assessment Tools. SPC Noumea. 4:25-39.
- Lacy, K.E. & Martins, E.P. 2003. *The effect of anthropogenic habitat usage on the social behaviour of a vulnerable species, Cyclura nubila*. Animal Conservation. 6: 3-9.

- Lankford, S.E., Adams, T.E., Cech, J.J. 2003. *Time of day and water temperature modify the physiological stress response in green sturgeon, Acipenser medirostris*. Comparative Biochemistry and Physiology. 135C: 291-302.
- Leach, G.J. & Taylor, M.H. 1980. *The role of cortisol in stress-induced metabolic changes in Fundulus heteroclitus*. General and Comparative Endocrinology. 42: 219–227.
- Lehner, P.N. 1979. *Handbook of ethological methods*. Graland Press, New York. 403 pp.
- Lewynsky, V.A. & Bjornn, T.J. 1987. *Response of cutthroat and rainbow trout to experimental catch-and-release fishing*, American Fisheries Society Symposium. 30: 16–32.
- Lima, S.L. 1998. *Predator induced stress and behaviour*. Advances in the Study of Behaviour. 27: 215-290.
- Lindberg, K. & Hawkins, D.E. 1993. *Ecotourism: a guide for planners & managers*. The Ecotourism Society. North Bennington, Vermont. 175 pp.
- Little, E.E. 2002. *Behavioral measures of environmental stressors in fish*. Pp 47-54 in Adams, S. M (Ed) *Biological Indicators of Stress in Fish*. American Fisheries Society, Bethesda.
- Lowe-McConnel, R.H. 1987. *Ecological studies in tropical fish communities*. Cambridge University Press, XIII + 382 pp.
- Magurran, A.E. 2004. *Measuring biological diversity*. Blackwell Publishing. UK. 256 pp.
- Mäkinen, T.S., Niemeliä, E., Moen, K., Lindström, R. 2000. *Behavior of gill-net and rod-captured Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) during upstream migration and following radio tagging*. Fisheries Research. 45: 117–127.
- Mal, M.E., Friend, T.H., Lay, D.C., Vogelsang, S.G., Jenkins, O.C. 1991. *Behavioral responses of mares to short-term confinement and social isolation*. Applied Animal Behaviour Science. 31: 13–24.
- Martin, P. & Bateson, P. 1993. *Measuring Behaviour – An introductory guide*. Cambridge University Press. 222 pp.
- Mathis, A., Chivers, D.P., Smith, R. J. F. 1996. *Cultural transmission of predator recognition in fishes: intraspecific and interspecific learning*. Animal Behavior. 51: 185–201.

- McCallister, J.M., Smith, T.E., Elwood, R.W. 2004. *Validation of urinary cortisol as an indicator of hypothalamic-pituitary-adrenal function in the bearded emperor tamarin (Saguinus imperator sudgrisescens)*. American Journal of Primatology. 63: 17-23.
- McDonald, G. & Milligan, L. 1997. *Ionic, Osmotic and Acid – Base Regulation in Stress*. Pp. 119–144 in Iwama, G.K., Pickering, A.D., Sumpter, J.P., Schreck, C.B. (Eds.). *Fish Stress and Health in Aquaculture*. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
- McEwen, B.S. & Wingfield, J.C. 2003. *The concept of allostasis in biology and biomedicine*. Hormonal Behaviour. 43: 2–15.
- Miranda, E.E. & Coutinho, A.C. 2004. *Brasil Visto do Espaço*. Campinas: Embrapa, Monitoramento por Satélite. Disponível em <http://www.cdbrasil.cnpq.br>.
- Mitraud, S.F. 2001. *Uso Recreativo do Parque Nacional Marinho de Fernando de Noronha: um exemplo de planejamento e implementação*. WWF Brasil, Brasília. 100 pp.
- Moberg, G.P. 1985. *Biological responses to stress: key to assessment of animal well-being?* Pp: 27–49 in: Moberg, G.P. (Ed.). *Animal stress*. Am. Physiol. Soc., Bethesda, Maryland.
- Moberg, G.P. 2000. *Biological response to stress: implications for animal welfare*. Pp 123-146 in: Moberg G.P. & Mench, J.A. *The Biology of Animal Stress*. CABI Publishing.
- Mommsen, T.P., Vijayan, M.M., Moon, T.W. 1999. *Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation*. Reviews in Fish Biology and Fisheries. 9: 211–268.
- Moriwaki, T., Kobayashi, M., Aida, K., Hanyu, I. 1991. *Changes in plasma gonadotropin and steroids hormone levels during ovulation induced by HCG treatment in female goldfish*. Nippon Suisan Gakkaishi. 57: 41-43.
- Morrow, M. D.; Higgs, D.; Kennedy, C. J. 2004. *The effects of diet composition and ration on biotransformation enzymes and stress parameters in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss*. Comparative Biochemistry and Physiology. 137C: 143-154.
- Mullner, A., Linsenmair, K.E., Wikelski, M. 2004. *Exposure to ecotourism reduces survival and affects stress response in hoatzin chicks (Opisthocomus hoazin)*. Biological Conservation. 118: 549-558.
- Niefer, I. & Silva J.C.L.G. 1999. *Crítérios para um ecoturismo ambientalmente saudável*. Cadernos da Biodiversidade. 2(1): 53-61.

- O'Connor, K.I., Taylor, A.C., Metcalfe, N.B. 2000. *The stability of standard metabolic rate during a period of food deprivation in juvenile Atlantic salmon*. Journal of Fish Biology. 57: 41-51.
- Oliveira, R.F., Canario, A.V.M., Bshary, R. 1999. *Hormones, behaviour and conservation of littoral fishes: current status and prospects for future research*. In *Behaviour and Conservation of Littoral Fishes*. Pp 149–178 in Almada, V.C., Oliveira, R.F., Gonçalves, E.J.(Eds). Instituto Superior de Psicologia Aplicada. Lisbon.
- Paixão, A.C. & Sabino, J. 1999. *História natural de Crenicichla sp. (Pisces, Perciformes, Cichlidae) em dois riachos da Bacia do rio Ribeira de Iguape*. XIII Encontro Brasileiro de Ictiologia, 1999. São Carlos. 1:131-131.
- Platell, M.E., Potter, I.C., Clarke, K.R. 1998. *Do the habitats, mouth morphology and diets of the mullids *Upeneichthys stotti* and *U. lineatus* in coastal waters of south-western Australia differ?* Journal of Fish Biology. 52:398–418.
- Pickering, A.D. 1981. *Stress and Fish*. Academic Press, New York, 367 pp.
- Pickering, A.D. 1992. *Rainbow trout husbandry: management of the stress response*. Aquaculture. 100: 125–139.
- Pickering, A.D. 1993. *Growth and stress in fish production*. Aquaculture. 111: 51 – 63.
- Pickering, A.D. 1998. *Stress responses of farmed fish*, In: *Biology of Farmed Fish*. Pp: 222–255 in: Black, K.D., Pickering, A. D. (Eds.). Academic Press, Sheffield.
- Pickering, A.D. & Pottinger, T.G. 1987. *Poor water quality suppresses the cortisol response of salmonid fish to handling and confinement*. Journal of Fish Biology. 30: 363-374.
- Rabelo, H., Araújo-Lima, C.A.R.M. 2002. *A dieta e o consumo diário de alimento de *Cichla monoculus* na Amazônia Central*. Acta Amazónica. 32(4): 707-724.
- Redbo, I. 1993. *Stereotypies and cortisol secretion in heifers subjected to tethering*. Applied Animal Behaviour Science. 38: 213-225.
- Reynolds, W.W. 1979. *Habitat selection and territorial defense behaviors in juvenile cortex angelfish, *Pomacanthus zonipectus* (gill)*. Hydrobiologia. 66 (2): 145-148.
- Rocha, J.S.M. 1997. *Manual de projetos ambientais*. Santa Maria: Imprensa Universitária. 423 pp.

- Rocha, J.S.M; Garcia, S.M; Ataides, P.R.V. 2001. *Avaliações de impactos ambientais em unidades pontuais e lineares*. Santa Maria: Imprensa Universitária. 200 pp.
- Rome, A. 1999. *Ecotourism impact Monitoring: A Review of Methodologies and Recommendations for Developing Monitoring Programs in Latin America*. Ecotourism Technical Report. Series Number 1. 50 pp.
- Ruane, N.M., Komen, H. 2003. *Measuring cortisol in the water as an indicator of stress caused by increasing loading density in common carp (*Cyprinus carpio*)*. *Aquaculture*. 218:685–693.
- Sabino, J. 2002. *Planalto da Bodoquena: Natureza em estado de graça*. Os Caminhos da Terra. 125: 58-65.
- Sabino, J. 2003. *Programa de monitoramento do Rio Baía Bonita e seu entorno, visando minimizar os impactos de visita*. Relatório Referente ao período de Setembro de 2001 a Dezembro de 2002. 24 pp.
- Sabino, J. & Andrade, L.P. 2002. *Monitoramento e conservação no rio Baía Bonita, região de Bonito, Mato Grosso do Sul, Brasil In: Anais do III Congresso Brasileiro de Unidades de Conservação*. Rede Pró-Unidades de Conservação, Fundação Boticário de Proteção à Natureza e Associação Catinga. Fortaleza, Ceará. 876 pp.
- Sabino, J. & Andrade, L.P. 2003. *Uso e Conservação da Ictiofauna no Ecoturismo da Região de Bonito, Mato Grosso do Sul: O Mito da Sustentabilidade Ecológica no Rio Baía Bonita (Aquário Natural de Bonito)*. Disponível em <http://www.biotaneotropica.org.br/v3n2/pt/abstract?point-of-view+BN00403022003>.
- Sabino, J. & Castro, R.M.C. 1990. *Alimentação, período de atividade e distribuição espacial dos peixes de um riacho da Floresta Atlântica (sudeste do Brasil)*. *Revista Brasileira de Biologia*. 50: 23-36.
- Sabino, J. & Sazima, I. 1999. *Association between fruit-eating fish and foraging monkeys in western Brazil*. *Ichthyol. Explorations of Freshwaters*. 10 (4): 309-312.
- Sabino, J. & Trajano, E. 1997. *A new species of blind armoured catfish, genus *Ancistrus*, from caves of Bodoquena region, Mato Grosso do Sul, southwestern Brazil*. *Revue française de Aquariologie*. 24: 73-78.
- Sabino, J. & Zuanon, J.A. 1998. *A stream fish assemblage in Central Amazonia: distribution, activity patterns and feeding behavior*. *Ichthyological Explorations of Freshwater*. 8 (3): 201-210.

- Sale, P.F. & Sharp, B.J. 1983. *Correction for bias in visual transect censuses of coral reef fishes*. Coral Reefs. 2:37–42.
- Sazima, I. 1986. *Similarities in feeding behaviour between some marine and freshwater fishes in two tropical communities*. Journal of Fish Biology. 29: 53-65.
- Silva, A.S. 2003. *Androgénios e Efeitos de Experiência Prévia em Interações Agonísticas no ciclídeo Oreochromis mossambicus*. Trabalho de fim de Curso pela Universidade de Évora. 92 pp.
- Scott, A.P. & Sorensen, P.W. 1994. *Time course of release of pheromonally active gonadal steroids and their conjugates by ovulatory goldfish*. General and Comparative Endocrinology. 96: 309–323.
- Scott, A. P., Pinillos, M., Ellis, T. 2001. *Why measure fish steroids in plasma when you can measure them in water*. Pp. 1291–1295 in: Goos, H.J.T., Rastogi, R.K., Vaudry, H., Pierantoni, R. (Eds). *Perspectives in Comparative Endocrinology: Unity and Diversity*. Bologna: Monduzzi Editore.
- Schreck, C.B. 1981. *Stress and compensation in teleostean fishes: response to social and physical factors*, Pp: 295– 321 in: Pickering, A.D. (Ed.). *Stress and Fish*. Academic Press, New York.
- Schreck, C.B. 1982. *Stress and rearing of salmonids*. Aquaculture. 28: 241–249.
- Scremim-Dias, E., Pott, V.J., Catarino da Hora, R., Souza, P.R. 1999. *Nos Jardins Submersos da Bodoquena – Guia para a identificação de plantas aquáticas de Bonito e Região*. ECOA – Ecologia e Acção. Campo Grande –MS, Brasil. 160 pp.
- Smith, R. J. F. & Smith, M. J. 1989. *Predator-recognition behaviour in two species of gobiid fishes, Asterropteryx semipunctatus and Gnatholepsis anjerensis*. Ethology. 83: 19–30.
- Shumway, C.A. 1999. *A neglected science: applying behavior to aquatic conservation*. Environmental Biology of Fishes. 55: 183–201.
- Sterling, P. & Eyer, J. 1988. *Allostasis: a new paradigm to explain arousal pathology*. Pp 629-649 in: Fisher ,S., Reason, J. *Handbook of Life Stress, Cognition and Health*. John Wiley and Sons. New York.
- Takahashi, L.Y. 1997. *Limite aceitável de câmbio (LAC): Manejando e monitorando visitantes*. In: *Anais do I Congresso Brasileiro de Unidades de Conservação*, vol. I. Curitiba. Pp. 445-464.
- Thompson, M.J. & Schmidt, T.W. 1977. *Validation of the species/time random count technique sampling fish assemblages*. Third Internal Coral Reef Symposium. Miami, Florida. 1: 283-288.

- Turner, J.W., Nemeth, R., Rogers, C. 2003. Measurement of fecal glucocorticoids in parrotfishes to assess stress. *General and Comparative Endocrinology*. 133: 341–352.
- Tuya, F., Barberà F., Boyra, A., Sanchez-Jerez, P., Blanch, I., Haruon, R.J. 2005. Spatial variation in the structural parameters of *Cymodocea nodosa* seagrass meadows in the Canary Islands: a multiscaled approach. *Botanica Marina*. 48:122–126.
- van der Boon, J.; Van Den Thillart, G.E.E.J.M.; Addink, A.D.F. 1991. The effects of cortisol on intermediary metabolism in teleost fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 100A: 47–53.
- Verheijen, F.J. 1956. Transmission of a fright reaction amongst a school of fish and the underlying sensory mechanisms. *Experientia* 12: 202–204.
- Vijayan, M.M., Ballantyne, J. S., Leatherland, J.F. 1991. Cortisol-induced changes in some aspects of the intermediary metabolism of *Salvelinus fontinalis*. *General and Comparative Endocrinology*. 82: 476– 486.
- Vijayan, M.M., Reddy, P. K., Leatherland, J.F., Moon, T.W. 1994. The effects of cortisol on hepatocyte metabolism in rainbow trout: a study using the steroid analogue RU486. *General and Comparative Endocrinology*. 96: 75– 84.
- Vijayan, M.M., Mommsen, T.P., Glémet, H.C., Moon, T.W. 1996. Metabolic effects of cortisol treatment in a marine teleost, the sea raven. *Journal of Experimental Biology*. 199: 1509–1514.
- Vijayan, M.M., Pereira, C., Grau, E.G., Iwama, G.K. 1997. Metabolic responses associated with confinement stress in tilapia: the role of cortisol. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 116C: 89– 95.
- Von Buskirk J. & Ariole, M. 2002. Dosage responses of an induced defense: how sensitive are tadpoles to predation risk? *Ecology*. 83: 1580–1585.
- Wendelaar Bonga, S.E. 1997. The stress response in fish. *Physiology Review*. 77: 591– 625.
- Wiedmann, S.M.P. 1997. As Reservas Particulares do Patrimônio Natural. In: Congresso Brasileiro de unidades de Conservação, 1. Curitiba: IAP: UNILIVRE: Rede Pró-Unidades de Conservação. 2: 3-14.
- Willink, P.W., Chernoff, B., Alonso, L.E., Montanbault, J.R., Lourival, R. 2000. A Biological Assessment of the Aquatic Ecosystems of the Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Bulletin of Biological Assessment*. 18:122-127.
- Woodley, C.M. & Peterson, M.S. 2003. Measuring responses to simulated predation threat using behavioural and physiological metrics: the role of aquatic vegetation. *Oecologia*. 136: 155–160.

Wysocki, L.E., Dittami, J.P., Ladich, F. 2006. *Ship noise and cortisol secretion in European freshwater fishes*. *Biological Conservation*. 28: 501-508.





Zar, J.H., 1986. *Biostatistical analysis*, 3rd edn. Prentice Hall: New Jersey. 663 pp.

Zaret, T.M. 1980. *Life history and growth relationships of Cichla ocellaris, a predatory South American cichlid*. *Biotropica*. 12: 144-157.

## **VII. ANEXOS**

## ANEXO I: Protocolo de Recolha de Características Ecológicas do Rio Sucuri

### RELATÓRIO DE CAMPO

data:	Nome:	temperatura do ar: ___°C	clima:    
-------	-------	--------------------------	--

#### 1. TEMPERATURA DA ÁGUA

LOCAL	T°C da água
	Ponto Sem Turismo
Ponto Com Turismo	

#### 2. VELOCIDADE DA CORRENTE

LOCAL	Marcação do fluxómetro mecânico - General Oceanics		
	início/final	início/final	início/final
Ponto Sem Turismo			
Ponto Com Turismo			

#### 3. CONDIÇÕES DE TRANSPARÊNCIA DA ÁGUA

PONTO DE AMOSTRAGEM	VISIBILIDADE HORIZONTAL Fita métrica (m)	VISIBILIDADE VERTICAL Disco de Secchi (m)	ASPECTO DA ÁGUA			
			TRANSPARENTE	AMARELADO	LEITOSO	TURVO
Ponto Sem Turismo						
Ponto Com Turismo						

**5. PRESENÇA DE PEIXES**

ESPÉCIE	LOCAL	ESTIMATIVA				OBSERVAÇÕES
		5'	5'	5'	Média	
<i>Astyanax</i> sp.						
<i>Brycon hilarii</i>						
<i>Hyphessobrycon eques</i>						
<i>M. bonita</i>						
<i>Phenacogaster tegatus</i>						
<i>Acestrorhynchus</i>						
<i>Prochilodus lineatus</i>						
<i>Steindachnerina brevipinna</i>						
<i>Leporinus friderici</i>						
<i>Ancistrus</i> sp.						
<i>C. lepidota</i>						
<i>Crenicichla vittata</i>						
<i>Aequidens plagiozonatus</i>						
<i>Bryconops</i> sp.						

## **ANEXO II: “Protocols for extracting steroids from water”<sup>1-4</sup>”**

1. These protocols apply to extraction and analysis of steroids in biological fluids and water (difference only on Sep-pak capacity).

### ***1) Extraction of steroids from water using solid phase extraction (SPE) columns.***

SPE come in cartridges or syringe barrel types and can be obtained from many manufacturers. We currently use **Sep-pak** C18 Vac 20cc cartridges from Waters (5 g sorbent for large volumes of water 1.5L but this depends on the sample load, not just steroid content but all components). Cartridges are eluted by low-pressure vacuum (water pump or syringe) and syringe barrels are centrifuged. It is important not to let SPE column completely dry (storage), but they also should not have much of respectively solvent or water left, so that elutions are sharper (see instructions that come with SPE, more info about SPE E. M. Thurman, M. S. Mills. 1998 “Solid-Phase Extraction: Principles and Practice” Volume 147 in Chemical Analysis. A Series of Monograph on Analytical Chemistry and its Applications. JD Winefordner, series editor. Wiley).

i) Start by activating the C18 SPE column by running through methanol 6-10 cartridge holdup vols (about 50 ml for the)

ii) Run same volume of distilled water

iii) Run your sample through SPE column (For water is advisable to use paper filter or a preliminary step through a Millipore to remove any fine material in 1 Refs 2-4 are about

iv) Run at least 2x2ml ethanol (methanol can be used but evaporates more slowly) and collect in glass extraction tube (we use 12 ml glass stoppered tubes that fit on a low speed centrifuge – **never use plastics because they adsorb steroids**). v) Evaporate ethanol (under nitrogen at 40°C or in a speed vac) methods for conjugates and 1 is about measurement of steroids in water.

v) Evaporate ethanol (under nitrogen at 40°C or in a speed vac) (A)

---

1. **Greenwood LN, Scott AP, Vermeirssen ELM, Mylonas CC, Pavlidis M (2001)** Plasma steroids in mature common dentex (*Dentex dentex*) stimulated with a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Gen Comp Endocrinol* 123:1-12
  2. **Scott AP, Vermeirssen ELM (1994)** Production of conjugated steroids by teleost gonads and their role as pheromones. In: Davey KG, Peter RE, Tobe SS (eds) *Perspectives in comparative endocrinology*. National Research Council of Canada, Ottawa, pp 645-654
  3. **Scott AP, Canario AVM (1992)** 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -Dihydroxy-4-pregnen-3-one 20-sulphate; a major new metabolite of the teleost oocyte maturation-inducing steroid. *Gen Comp Endocrinol* 85:91-100
  4. **Canario AVM, Scott AP (1989)** Conjugates of ovarian steroids, including 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one (maturation-inducing steroid), accumulate in the urine of a marine teleost, accumulate in the urine of a marine teleost (plaice; *Pleuronectes platessa*). *J Endocrinol* 127:R1-R4
- 

## 2) *Extraction of free steroids*

vi) Add 100  $\mu$ l distilled water and 2 ml diethyl ether to (A) and vortex well for 5 min (water is just enough to be able to separate organic from aqueous fraction)

vii) Centrifuge at no more than 1000g (remember that caps can smash tube if centrifuged at too high speed).

viii) Freeze water phase and pour the organic phase (diethyl ether) into glass assay tubes (we use 7 ml nominally borosilicate assay tubes). These are your free steroids. Diethyl ether extraction can be repeated for higher extraction efficiency.

ix) Evaporate the organic phase (under nitrogen at 40°C or in a speed vac) and add assay buffer (amount depends on how much sample you have, steroid concentration and how many steroids you want to assay – remember to vortex very well to resuspend steroids in buffer, also later when you pipette into the assay tubes)

x) Evaporate the water phase (under nitrogen at 40°C or in a speed vac) (**B**)

## **2) *Extraction of sulphated steroids***

xi) Add 1 ml trifluoroacetic acid (TFA): ethylacetate (1:100) and place in a water bath at 35-40°C overnight (should not go to a higher temperature because some steroids may degrade)

xii) Evaporate under nitrogen at 40°C or in a speed vac

xiii) Add 0.5 ml sodium acetate buffer, pH 4.5. Add 10 ml of stock A + 2.8 ml stock B (stock A = 8.2 g sodium acetate in 100 ml H<sub>2</sub>O; stock B = 8.5 g HCl in 100 ml H<sub>2</sub>O)

xiv) Add 3 ml diethyl ether and follow steps vi – ix. The organic phase contains in this case the steroid moieties of sulphates.

xv) Remove diethyl ether remains from with nitrogen (speed vac or just leaving it on the bench and mix once a while) (**C**)

## **2) *Extraction of steroid glucuronides***

xvi) Add 10µl of glucuronidase (1000 units/tube; G-7017 from Sigma)

xvii) Incubate overnight at 37°C

xviii) Add 3 ml diethyl ether and follow steps vi – ix. The organic phase contains in this case the steroid moieties of glucuronides.

**ANEXO III**

Tabela I – Número total de espécies (S), Abundância total (N), Riqueza Específica (d), índice de Equitabilidade de Pielou (J'), índice de Diversidade (H', Shannon-Winner) e Densidade (nº indivíduos/m<sup>2</sup>), nos seis pontos de observação (A, B, e C em p – sem turismo e t – com turismo) e nas diferentes horas do dia (9h, 13h, 16h).

LOCAL	S	N	d	J'	H'	D	
Ap_9		12	317	1,910086	0,710305	1,765041	11,24695
Ap_9		9	323	1,384645	0,684463	1,503919	11,42379
Ap_9		9	318	1,388394	0,706505	1,55235	11,24695
Ap_13		10	312	1,567124	0,626773	1,443198	11,03474
Ap_13		8	298	1,228697	0,741054	1,540978	10,53959
Ap_13		10	377	1,517132	0,661982	1,524269	13,33365
Ap_16		7	327	1,036277	0,764323	1,487305	11,56526
Ap_16		8	308	1,221619	0,762302	1,585162	10,89327
Ap_16		9	360	1,359133	0,706917	1,553254	12,7324
Bp_9		9	318	1,388394	0,662502	1,455666	11,24695
Bp_9		8	280	1,242282	0,689937	1,434683	9,902974
Bp_9		8	303	1,225119	0,705234	1,466492	10,71643
Bp_13		10	316	1,563656	0,670433	1,543729	11,17621
Bp_13		10	314	1,565383	0,630457	1,451682	11,10548
Bp_13		8	323	1,211565	0,70226	1,460308	11,42379
Bp_16		10	317	1,562798	0,633913	1,45964	11,21158
Bp_16		10	311	1,568001	0,718253	1,653839	10,99937
Bp_16		9	294	1,407564	0,710657	1,561473	10,39812
Cp_9		8	310	1,220241	0,743116	1,545266	10,96401
Cp_9		9	308	1,396136	0,681779	1,498021	10,89327
Cp_9		9	324	1,383905	0,720258	1,582569	11,45916
Cp_13		11	363	1,696525	0,726506	1,742086	12,8385
Cp_13		10	294	1,583509	0,674861	1,553925	10,39812
Cp_13		10	376	1,517812	0,710841	1,636773	13,29828
Cp_16		11	304	1,749161	0,747076	1,791409	10,7518
Cp_16		10	309	1,569765	0,668755	1,539866	10,92864
Cp_16		10	345	1,540161	0,727516	1,675168	12,20188
At_9		12	442	1,805851	0,817094	2,030401	11,29411
At_9		9	316	1,389916	0,758325	1,666209	15,63255
At_9		11	374	1,687976	0,723723	1,735412	11,17621
At_13		12	415	1,824733	0,736948	1,831248	13,22754
At_13		13	386	2,01483	0,684898	1,756728	14,67762
At_13		11	378	1,68495	0,712171	1,707711	13,65196
At_16		12	375	1,855937	0,717939	1,784011	13,36902
At_16		12	375	1,855937	0,69904	1,737049	13,26291
At_16		12	417	1,823279	0,70572	1,753647	13,26291
Bt_9		12	385	1,847732	0,713997	1,774215	14,74836
Bt_9		10	362	1,527587	0,723515	1,665954	13,61659
Bt_9		12	359	1,869692	0,662429	1,646075	12,80313
Bt_13		11	440	1,642906	0,792216	1,899651	12,69703
Bt_13		12	417	1,823279	0,740817	1,84086	15,56182
Bt_13		10	402	1,500888	0,718032	1,653329	14,74836
Bt_16		12	418	1,822556	0,742971	1,846213	14,21784

Bt_16	9	388	1,342055	0,769569	1,690915	14,78373
Bt_16	11	361	1,698116	0,65394	1,56808	13,72269
Ct_9	9	329	1,380248	0,735953	1,617055	12,76776
Ct_9	8	357	1,190935	0,725788	1,509233	11,63599
Ct_9	10	355	1,532667	0,708592	1,631593	12,62629
Ct_13	13	302	2,101419	0,721716	1,851166	12,55556
Ct_13	13	297	2,107581	0,704171	1,806164	10,68107
Ct_13	12	309	1,918602	0,673425	1,673399	10,50423
Ct_16	12	421	1,820399	0,748094	1,858944	10,92864
Ct_16	12	413	1,826197	0,740244	1,839437	14,88983
Ct_16	10	389	1,509161	0,701119	1,614385	14,60689

**ANEXO IV**

Tabela I – Características ecológicas das 14 espécies observadas a partir do método de censos visuais em pontos fixos nos pontos sem e com turismo. A categoria **Timidez** apresenta uma escala de 1 a 5 em que 1 = pouco tímido e 5 = extremamente tímido. A categoria **Mobilidade** apresenta uma escala de 1 a 3 em que 1 = praticamente fixo e 3 = muito móvel. Dados obtidos a partir do fishbase, com exceção das duas categorias anteriormente referidas para as quais os indivíduos das diferentes espécies foram classificados por 2 observadores diferentes.

<b>Espécie</b>	<b>Timidez</b>	<b>Dieta</b>	<b>Mobilidade</b>	<b>Posição na coluna d'água</b>	<b>Organização Social</b>	<b>Tamanho Máximo (cm)</b>
<i>Ancistrus</i> sp.	5	Algas	1	Bentónicos	Não disponível	-
<i>Astyanax</i> sp.	3	Insectos aquáticos (Ephemeroptera, Trichoptera, Diptera, Odonata, Psocoptera, Heteropter), insectos terrestres (Coleoptera)	2	Meio	Cardume	10
<i>Acestrorhynchus pantaneiro</i>	2	Peixes	2	Meio	Cardume	24
<i>Aequidens plagiozonatus</i>	5	Algas, Insectos aquáticos (Ephemeroptera, Trichoptera, Diptera, Odonata, Psocoptera, Heteropter), insectos terrestres (Coleoptera), peixes	1	Bentónicos	Solitários	10.3
<i>Brycon hilarii</i>	1	Frutos e sementes de plantas terrestres, insectos terrestres (Coleoptera)	3	Meio	Cardume	56

<b>Espécie</b>	<b>Timidez</b>	<b>Dieta</b>	<b>Mobilidade</b>	<b>Posição na coluna d'água</b>	<b>Organização Social</b>	<b>Tamanho Máximo (cm)</b>
<i>Bryconops sp.</i>	3	Insectos aquáticos (Ephemeroptera, Trichoptera, Diptera, Odonata, Psocoptera, insectos terrestres (Coleoptera))	2	Próximos à Superfície	Cardumes	12
<i>Crenicichla lepidota</i>	5	Insectos aquáticos (Ephemeroptera, Trichoptera, Diptera, Odonata, Psocoptera, Heteropter), insectos terrestres (Coleoptera), crustáceos (Trichodactylus e Macrobrachium), peixes	1	Bentónicos	Solitários ou Casais	18
<i>Crenicichla vitatta</i>	5	Insectos aquáticos (Ephemeroptera, Trichoptera, Diptera, Odonata, Psocoptera, Heteropter), insectos terrestres (Coleoptera), crustáceos (Trichodactylus e Macrobrachium), peixes	1	Bentónicos	Solitários ou Casais	26
<i>Hyphessobrycon eques</i>	1	Insectos aquáticos (Ephemeroptera, Trichoptera, Diptera, Odonata, Psocoptera, Heteropter), insectos terrestres (Coleoptera), crustáceos (Ostracoda), detritos de plantas	2	Próximos à Superfície	Cardume	3.1

<b>Espécie</b>	<b>Timidez</b>	<b>Dieta</b>	<b>Mobilidade</b>	<b>Posição na coluna d'água</b>	<b>Organização Social</b>	<b>Tamanho Máximo (cm)</b>
<i>Leporinus friderici</i>	2	Frutos e sementes de plantas terrestres, insectos terrestres (Isoptera)	3	Meio	Solitários ou em Cardume	40
<i>Moenkausia bonita</i>	3	Insectos aquáticos (Ephemeroptera, Trichoptera, Diptera, Odonata, Psocoptera, Heteropter), insectos terrestres (Coleóptera e Díptera)	2	Próximos à superfície	Cardume	4.4
<i>Prochilodus lineatus</i>	1	Fitoplâncton (diatomáceas e algas verdes), insectos aquáticos (Ephemeroptera, Trichoptera, Diptera, Odonata, Psocoptera, Heteropter), invertebrados aquáticos (Nematoda)	3	Meio	Solitário	61.5
<i>Phenacogaster tegatus</i>	3	Insectos aquáticos (Ephemeroptera, Trichoptera, Diptera, Odonata, Psocoptera, Heteropter), insectos terrestres (Coleóptera e Díptera)	2	Meio	Cardume	3.2
<i>Steindachnerina brevipinna</i>	2	Insectos aquáticos (Ephemeroptera, Trichoptera, Diptera, Odonata, Psocoptera, Heteropter)	2	Meio	Cardume	10.9

## ANEXO V

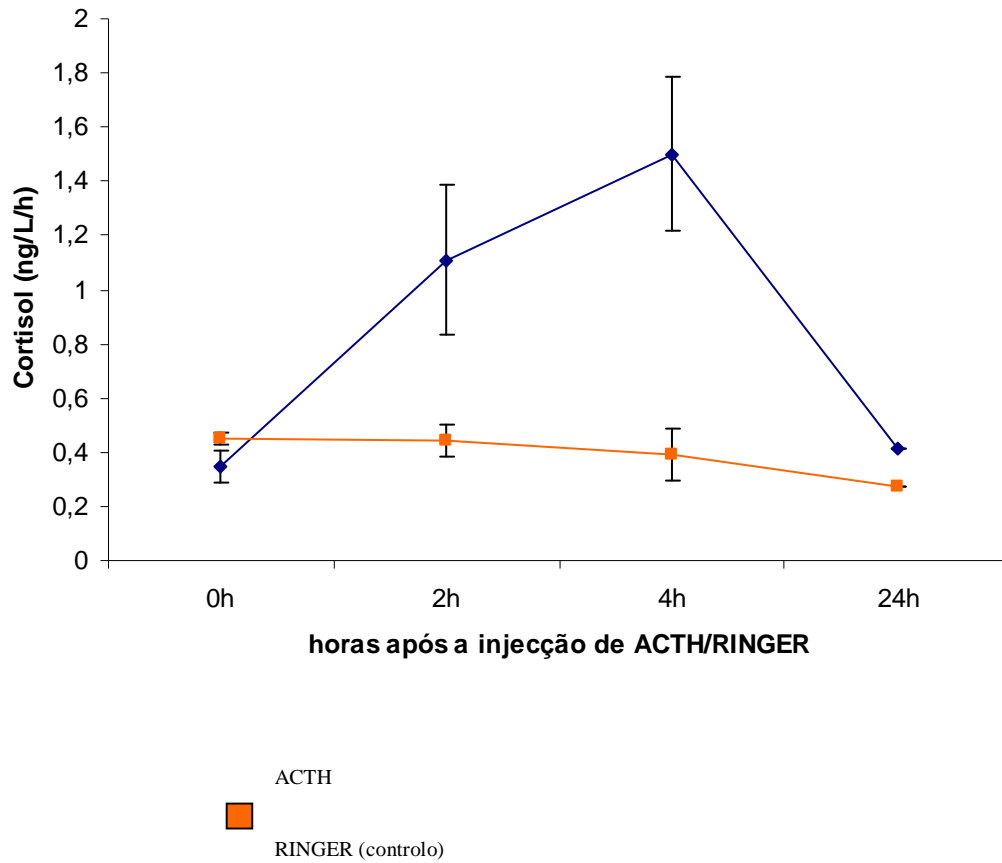


Figura 20 – Variação média de cortisol na água ao longo do tempo (média  $\pm$  SEM) nos indivíduos de *M. bonita* após a validação do método através de injeções de ACTH ou RINGER (controlo) por via intraperitoneal.

## **ANEXO VI: Recomendações práticas para a realização da flutuação no Rio Sucuri**

Recomendam-se uma série de medidas de melhoramento da actividade ecoturística no Rio Sucuri, com base em propostas sugeridas por Sabino (2003):

- Deverá efectuar-se um ajuste rigoroso do intervalo entre os grupos de flutuação contados a partir da saída da piscina de treinamento, de modo a que as espécies tenham tempo para recuperarem a sua actividade normal antes da chegada do próximo grupo;
- O treino na piscina deverá ter um tempo mínimo a partir do qual se assegure o uso correcto dos equipamentos obrigatórios por parte dos turistas, assim como um comportamento adequado na água durante a flutuação; aqueles visitantes que não se adaptarem, não devem realizar a actividade;
- Cada grupo deverá permanecer o menos tempo possível parado no ponto de iniciação à flutuação;
- Os guias que acompanham os grupos devem ter uma formação correcta acerca da ecologia do local, de modo a aumentar a consciência ecológica do visitante assim como a sua sensibilidade ao impacto que ele próprio é susceptível de causar;
- A implementação de novas estratégias de monitorização do impacto ambiental causado pelo Ecoturismo não apenas baseadas na capacidade de carga de turistas por dia, como a que actualmente se utiliza no Rio Sucuri, mas mais sensíveis e específicas como as desenvolvidas em outros países como “LIMITES DE MUDANÇA ACEITÁVEL”, com base no princípio de que qualquer acção de maneo ou uso (inclusive visita recreativa) de um ambiente natural gera, necessariamente, alterações no mesmo (Mitraud, 2001).

