

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor,
o texto completo desta tese será
disponibilizado somente a partir
de 05/08/2022



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

Arleto Tenório dos Santos

Exposição aguda e crônica de fipronil em girinos de rã touro

(*Lithobates catesbeianus*):

efeitos genotóxicos e morfológicos

São José do Rio Preto
2021

Arleto Tenório dos Santos

Exposição aguda e crônica de fipronil em girinos de rã touro

(*Lithobates catesbeianus*):

efeitos genotóxicos e morfológicos

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Animal, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof^o. Dr. Classius de Oliveira

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Lilian Franco Bellussi

São José do Rio Preto
2021

S237e

Santos, Arleto Tenório dos

Exposição aguda e crônica de fipronil em girinos de rã touro
(*Lithobates catesbeianus*) : efeitos genotóxicos e morfológicos / Arleto
Tenório dos Santos. -- São José do Rio Preto, 2021

91 f. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto
de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientador: Prof. Dr. Classius de Oliveira

Coorientadora: Profa. Dr^a. Lilian Franco Bellussi

1. Anfíbios anuros. 2. Biomarcadores. 3. Pigmentação Corporal. 4.
Melanina. 5. Melanomacrófagos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de
Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Arleto Tenório dos Santos

Exposição aguda e crônica de fipronil em girinos de rã touro

(*Lithobates catesbeianus*):

efeitos genotóxicos e morfológicos

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Animal, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Classius de Oliveira
UNESP - São José do Rio Preto
Orientador

Prof^a. Dr^a. Patrícia Simone Leite Vilamaior
UNESP - São José do Rio Preto

Prof. Dr. Rodrigo Zieri
IFPS - Barretos

Prof^a. Dr^a. Juliane Freitas Silberschmidt
UEMG - Ituiutaba

Prof^a. Dr^a. Daniela de Melo e Silva
UFG - Goiânia

São José do Rio Preto
05 de agosto de 2021

*Dedico esse trabalho primeiramente a Deus e a toda minha família.
O amor, apoio e compreensão de cada um me ampararam e alimentaram minha caminhada ao longo desse trabalho, que sem vocês certamente não seria possível.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da vida, cuja permissão foi dada a mim de buscar e realizar todos os meus sonhos.

Agradeço à minha família pelo nome e sobrenome que tenho. Busco sempre honrá-la nas escolhas e decisões que tomo, pois tudo o que fiz, faço e sempre farei será por todos vocês.

Agradeço a minha esposa, Karen Fernanda Rodrigues Tenorio, pelo apoio e orientações durante toda a caminhada durante o meu doutorado.

A minha filha Maria Alice Rodrigues Tenorio pelo carinho de sempre renovar minhas forças, passando boas energias.

Em especial, quero agradecer imensamente aos meus pais minha mãe, senhora Iralde Tenorio dos Santos. Agradeço ao meu saudoso papai, Sr. Ananias Lopes dos Santos (*in memoriam*).

Aos meus irmãos Adauto Tenorio, Acacio Tenorio e Vanessa Tenorio.

Agradeço a Minha querida avó Maria Rodrigues Tenório (*in memoriam*).

Ao meu orientador e amigo, Prof^o Dr. Classius de Oliveira, pela orientação, conselhos e ideias que trilharam meus caminhos durante a execução do projeto. Agradeço-lhe também por ter sempre acreditado e confiado em mim durante todos esses anos trabalhando em conjunto.

A minha co-orientadora, Prof.^a Dra. Lilian Franco Belussi, pela parceria estabelecida e pelos conhecimentos que pude adquirir, além da confiança depositada, pois sem a sua ajuda não teria chegado até aqui com esta pesquisa tanto no Laboratório de Anatomia, quanto na escrita.

Gostaria de agradecer imensamente ao Bruno Valverde por todo suporte e contribuição no desenvolvimento deste projeto de pesquisa.

A todos os colegas do Laboratório de Anatomia, por me auxiliarem em várias etapas do desenvolvimento do projeto e pelo suporte nas horas de tensão ao Ibilce pelo acolhimento.

Agradeço a Prof^a Lucia Maria Pacheco pela correção ortográfica deste trabalho.

“E o enchi do Espírito de Deus, de sabedoria, e de entendimento, e de ciência em todo artifício”.

Ex 31,3

RESUMO

Os agrotóxicos têm sido utilizados em grande escala para garantir a produtividade de diversas culturas no Brasil. O potencial de contaminação dos pesticidas deve-se principalmente ao fato de que a função biocida desses produtos não exercem ação completamente seletiva, mas ampliam-se a quaisquer outras comunidades que tenham contato, podendo introduzir-se direta ou indiretamente em corpos d' água, solo causando a vulnerabilidade de todo o sistema, com danos irreversíveis e em escalas incalculáveis. O uso indiscriminado destes agroquímicos tem resultado em impactos negativos ao ambiente, principalmente com resíduos tóxicos presentes na água, solo, ar, plantas e animais. O fipronil é uma molécula extremamente ativa e um potente desregulador do Sistema Nervoso Central (SNC), um inseticida classificado como altamente tóxico para o meio ambiente com um tempo de meia vida, longo é o mais utilizado no Brasil. Foi realizado um estudo cienciométrico que reuniu os trabalhos toxicológicos que utilizaram a espécie *Lithobates catesbeianus* (= *Rana catesbeiana*) como animal modelo experimental nos últimos 10 anos. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos genotóxicos e morfológicos sistêmicos, tanto de uma exposição aguda quanto crônica de girinos de rã touro, ao fipronil. Expostos a três concentrações diferentes de Regent® 800 WG (80% fipronil), 0,00 (controle), 0,04, 0,08, 0,4 mg/L; e quatro tempos tratamento na pigmentação da cabeça e cauda, o Fipronil induziu uma diminuição do peso individual e da massa hepática ao final dos experimentos, quanto aos índices experimentais: 4, 8, 12 e 16 dias. A pigmentação corporal respondeu diretamente ao tratamento e ao tempo de exposição. Houve uma diminuição dependente do hepatossomático que não variou de acordo com o tratamento. Para os animais expostos e para o grupo controle, a área de melanina hepática aumentou à medida que o tempo de exposição aumentava. O fipronil teve efeitos genotóxicos em girinos *Lithobates catesbeianus* mesmo após curtos tempos de exposição (por exemplo, 4 e 8 dias), e a principal anormalidade nuclear está nas células anucleadas. Observou-se correlação relevante entre biomarcadores genotóxicos e melanina cutânea e interna. A frequência de anormalidades nucleares está inversamente correlacionada tanto com a área de melanina hepática quanto com a melanina cutânea dos animais. O fipronil tem efeitos sistêmicos distintos sobre girinos com base em sua concentração, bem como em seu tempo de exposição. Alterações (nível de

pigmentação e taxa de anormalidade eritrócito) resultam em efeitos morfológicos e fisiológicos, que podem comprometer o comportamento e a sobrevivência dos anuros.

Palavras-chave: Anfíbios anuros, Biomarcadores, Pigmentação Corporal, Melanina, Melanomacrófagos.

ABSTRACT

Pesticides have been used on a large scale to ensure the productivity of various crops in Brazil. The potential for pesticide contamination is mainly due to the fact that the biocide function of these products does not exert completely selective action, but is extended to any other communities that have contact, and may be introduced directly or indirectly into water bodies, soil causing the vulnerability of the entire system, with irreversible damage and in incalculable scales. The indiscriminate use of these agrochemicals has resulted in negative impacts on the environment, especially with toxic residues present in water, soil, air, plants and animals. Fipronil is an extremely active molecule and a potent disruptor of the Central Nervous System (CNS), an insecticide classified as highly toxic to the environment with a long, half-life life is the most widely used in Brazil. Was scientometric study was carried out that brought together toxicological studies that used the species *Lithobates catesbeianus* (=Rana catesbeiana) as an experimental model animal in the last 10 years. The aim of this study was to evaluate the systemic genotoxic and morphological effects of both acute and chronic exposure of bull frog tadpoles to fipronil. Exposed to three different concentrations of Regent® 800 WG (80% fipronil), 0.00 (control), 0.04, 0.08, 0.4 mg/L; and four treatment times in head and tail pigmentation, Fipronil induced a decrease in individual weight and liver mass at the end of the experiments, regarding the experimental indices: 4, 8, 12 and 16 days. Body pigmentation responded directly to treatment and exposure time. There was a hepatosomatic-dependent decrease that did not vary according to treatment. For the exposed animals and for the control group, the hepatic melanin area increased as the exposure time increased. Fipronil has had genotoxic effects on *Lithobates catesbeianus* tadpoles even after short exposure times (e.g., 4 and 8 days), and the main nuclear abnormality is in anucleated cells. The relevant correlation was observed between genotoxic biomarkers and cutaneous and internal melanin. The frequency of nuclear abnormalities is inversely, correlated with both the area of hepatic melanin and the cutaneous melanin of the animals. Fipronil has distinct systemic effects on tadpoles based on their concentration as well as their exposure time. Changes (level of pigmentation and erythrocyte abnormality rate) result in morphological and physiological effects, which may compromise the behavior and survival of anurans.

Keywords: Anuran amphibians, Biomarkers, Body Pigmentation, Melanomacrophages

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Registros de Agrotóxicos no Brasil. Retirado de Ministério da Agricultura – Infográfico atualizado em 28/12/2019	17
Figura 2.	Aparência do formulado comercial Regent® 800wg (80% fipronil)	19
Figura 3.	Produtos de degradação do fipronil	22
Figura 4.	Organização do experimento no laboratório de anatomia comparada	31
Figura 5.	Delineamento do experimento utilizando o Regent® 800 wg em girinos <i>Lithobates catesbeianus</i>	32
CAPÍTULO I ATUAL STATUS DO CONHECIMENTO SOBRE O USO DE LITHOBATES CATESBEIANUS (=RANA CATESBEIANA) COMO ESPÉCIE MODELO PARA ESTUDOS DE EFEITOS DE AGROQUÍMICOS		
Figura 1.	Distribuição dos trabalhos encontrados, segundo as palavras chaves utilizadas para realização das buscas nas plataformas de dados	53
Figura 2.	Tendência temporal em publicações de artigos sobre o uso da <i>Lithobates catesbeianus</i> (=Rana catesbeiana) como modelo experimental em pesquisas científicas entre os anos de 2010 a 2020	53
Figura 3.	Relação das principais substâncias e estressores ambientais avaliados em estudos científicos, utilizando como modelo bioindicador a espécie <i>Lithobates catesbeianus</i> (=Rana catesbeiana)	54
Figura 4.	Correlação das principais técnicas aplicadas em relação ao material coletado e os conteúdos analisados nos artigos publicados e selecionados para esta pesquisa	55
Figura 5.	Estágio dos animais utilizados nos trabalhos publicados em artigos que foram selecionados para esta pesquisa	59
CAPÍTULO II GENOTOXIC AND MELANIC ALTERATIONS IN LITHOBATES CATESBEIANUS (ANURA) TADPOLES EXPOSED TO FIPRONIL INSECTICIDE”		
Figure 1.	(A) <i>L. catesbeianus</i> tadpoles exposed to Fipronil at a concentration of 0.00 (control group) after four days of exposure. (B) <i>L. catesbeianus</i> tadpoles exposed to Fipronil at a concentration of 0.04 mg/L after 16 days of exposure	78
Figure 2.	Head and tail darkening percentage. Different letters indicate differences between the same treatments at different exposure times.	78
Figure 3.	Histology of the hepatic tissue showing hepatic melanin (circles). HE – 25 µm	79
Figure 4.	Nuclear Abnormalities. (A) Normal erythrocyte (arrow) and anucleate erythrocyte. (B) Micronucleus. (C) Segmented nucleus. (D) Binucleated erythrocyte	80
Figure 5.	Total nuclear abnormalities. Different letters indicate differences between the same treatments at different exposure times.	81

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I ATUAL STATUS DO CONHECIMENTO SOBRE O USO DE *LITHOBATES CATESBEIANUS* (= *RANA CATESBEIANA*) COMO ESPÉCIE MODELO PARA ESTUDOS DE EFEITOS DE AGROQUÍMICOS

Tabela 1. Base de dados, termos de busca e quantidade de artigos após aplicação de cada um dos filtros 52

CAPÍTULO II GENOTOXIC AND MELANIC ALTERATIONS IN *LITHOBATES CATESBEIANUS* (ANURA) TADPOLES EXPOSED TO FIPRONIL INSECTICIDE”

Table 1. Biometric Variables. Different letters indicate differences between the same treatments at different exposure times 77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente
PH	Potencial hidrogeniônico
Koc:	Coeficiente de adsorção
Kow	Coeficiente de partição octanol-água
GABA	Ácido gama-amino butírico
MT	Mato Grosso (Estado)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
MM	Melanomacrófagos
CAUNESP	Centro de Aquicultura da UNESP - Jaboticabal
Wg	Grânulos Dispersíveis
2,4D	Ácido diclorofenoxiacético
CO₂	Dióxido de carbono
DMA	Dimetilamina
TH	Terapia hormonal
EDCs	Desreguladores dos sistemas endócrinos
PCR	Proteína C-reativa
LPS	Lipopolissacarídeo

LISTA DE SÍMBOLOS

ng/L ¹	Nano grama por litro
%	Porcentagem
mg/L ¹	miligrama por litro
mg/kg ¹	miligrama por Quilo
m/m	(massa de soluto) / (massa de solução)

SUMÁRIO

1	Introdução geral	16
1.1	Situação atual dos agrotóxicos	17
1.2	Fipronil	18
1.2.1	Mecanismo de ação do Fipronil	20
1.2.2	Degradação do Fipronil	21
1.2.3	Estudo com o Fipronil	22
1.3	Anfíbios como Bioindicadores	25
1.3.1	Espécie <i>Lithobates catesbeianus</i>	28
2	Objetivo e Hipóteses	30
3	Material e métodos	30
3.1	Metodologia da Cienciometria	30
3.2	Delineamento experimental	31
3.2.1	Análise de anormalidades nucleares	33
3.2.2	Quantificação da área de melanina	33
	Referências	34
CAPÍTULO I	ATUAL STATUS DO CONHECIMENTO SOBRE O USO DE <i>LITHOBATES CATESBEIANUS</i> (=RANA CATESBEIANA) COMO ESPÉCIE MODELO PARA ESTUDOS DE EFEITOS DE AGROQUÍMICOS	46
	Introdução	48
	Anfíbios e a Pesquisa Científica	48
	<i>Lithobates catesbeianus</i> (=Rana catesbeiana) como modelo animal	49
	Objetivos	51
	Metodologia	51
	Resultados e discussões	52
	Perspectivas futuras	60
	Referências	61
CAPÍTULO II	GENOTOXIC AND MELANIC ALTERATIONS IN <i>LITHOBATES CATESBEIANUS</i> (ANURA) TADPOLES EXPOSED TO FIPRONIL INSECTICIDE	70
	Introduction	72
	Materials and Methods	74
	Animal Sampling and Experimental Design	74
	Biometric Analyses	75
	Body Darkness Analyses	75
	Hepatic Melanin	75
	Nuclear Abnormalities in Erythrocytes	76
	Statistical Analysis	76
	Results	76
	Biometrics	76
	Body Darkness	77
	Hepatic Melanin	78
	Nuclear Abnormalities	79
	Compared Analysis between Nuclear Abnormalities and Melanin	81
	Discussion	82
	Conclusion	85
	References	86

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os agrotóxicos tem sido utilizados em grande escala para garantir a produtividades de diversas culturas. O uso destes produtos tem resultado em impactos negativos ao ambiente natural, em função de suas atuações direta e indireta sobre a biodiversidade e as suas bases genéticas (OMITTOYIN et al., 2006; NAQVI, SHOAI, ALI, 2016; TOMIAZZI et al., 2018). O uso desses agroquímicos tem efeitos negativos sobre espécies não-alvo que habitam ou ocupam esporadicamente estas paisagens (MANN et al., 2009; ZHANG et al. 2016; GIBSON, 2017). Os produtos fitossanitários são apontados como causa potencial do declínio de anfíbios, agindo de forma isolada ou em combinação com outros estressores presentes no ambiente (MANN et al., 2009; BABALOLA, VAN WYK, 2018; WELTJE et al., 2018; FAO, 2019).

A quantidade de agrotóxicos presentes na água tem aumentado devido ao uso crescente em (doses e concentrações) cada vez mais elevadas e ao descarte incorreto das embalagens destes pesticidas (VASCONCELOS, 2014; ZHANG et al. 2016). Essas substâncias são tóxicas, e apresentam diferentes graus de persistência e mobilidade no ambiente e com potencial atividades citotóxicas, genotóxicas ou carcinogênica, mutagênica e teratogênica (SILVA et al., 2011; FENT, 2014; TOMIAZZI et al., 2018) que podem promover alterações de comportamento e malformações, é limitar o sucesso reprodutivo (JOSENDE, 2015). Estas alterações podem comprometer a conectividade entre habitats e populações (FICETOLA; DI BERNARDI, 2004).

As intoxicações por agroquímicos pode ocorrer por dois motivos (CHASIN e AZEVEDO 2003): a) Pela acumulação de xenobiótico no organismo, que ocorre quando a quantidade de xenobiótico eliminado é inferior à que é absorvida, a concentração de agente tóxico no organismo aumenta progressivamente até obtenção de níveis suficientes para gerar efeitos adversos; b) pelos efeitos causados pela exposição repetida, sem que o tóxico acumule no organismo.

Em ambiente aquático, a ocorrência dos efeitos crônicos é mais frequente devido: à contaminação pontual e difusa dos xenobióticos oriundos das águas contaminadas em contribuição às relações antagonistas, estas atribuídas à rápida associação que ocorre entre a maioria das partículas e a matéria húmica e à sedimentação de sólidos em suspensão. Dessa forma, os organismos se expõem a baixas concentrações de determinados poluentes durante longo período de tempo

(STEPHAN E MOUNT 1973), ocasionando efeitos em níveis subletais e até mesmo letais ao longo do tempo.

1.1 Situação atual dos agrotóxicos

A utilização em grande escala de agrotóxicos na agricultura atual vem causando uma crescente preocupação em países em desenvolvimento devido à poluição difusa de diferentes compartimentos ambientais (LOCKE et al., 2002; CORREIA et al., 2010; VASCONCELOS, 2014; LAI, 2017). O Brasil é considerado um país em desenvolvimento e o maior consumidor de agroquímicos do mundo (MMA, 2020).

O desenvolvimento acelerado da agricultura no Brasil tem levado ao aumento do uso de agrotóxicos (GASQUES et al., 2012). Nos últimos dez anos, o mercado mundial de agroquímicos cresceu cerca de 93%, enquanto no mercado brasileiro cresceu 190%, ficando claro que o modelo de agricultura desenvolvida atualmente no Brasil está cada vez mais dependente dos produtos fitossanitários, o que o levou ao posto de maior mercado mundial de agrotóxicos (ANVISA, 2012; ABIM, 2013; MMA, 2018; LOPES 2018; MMA, 2019; ANVISA, 2019; IBGE, 2020). A figura 1 apresenta o crescimento na quantidade de registros de agroquímicos no Brasil.

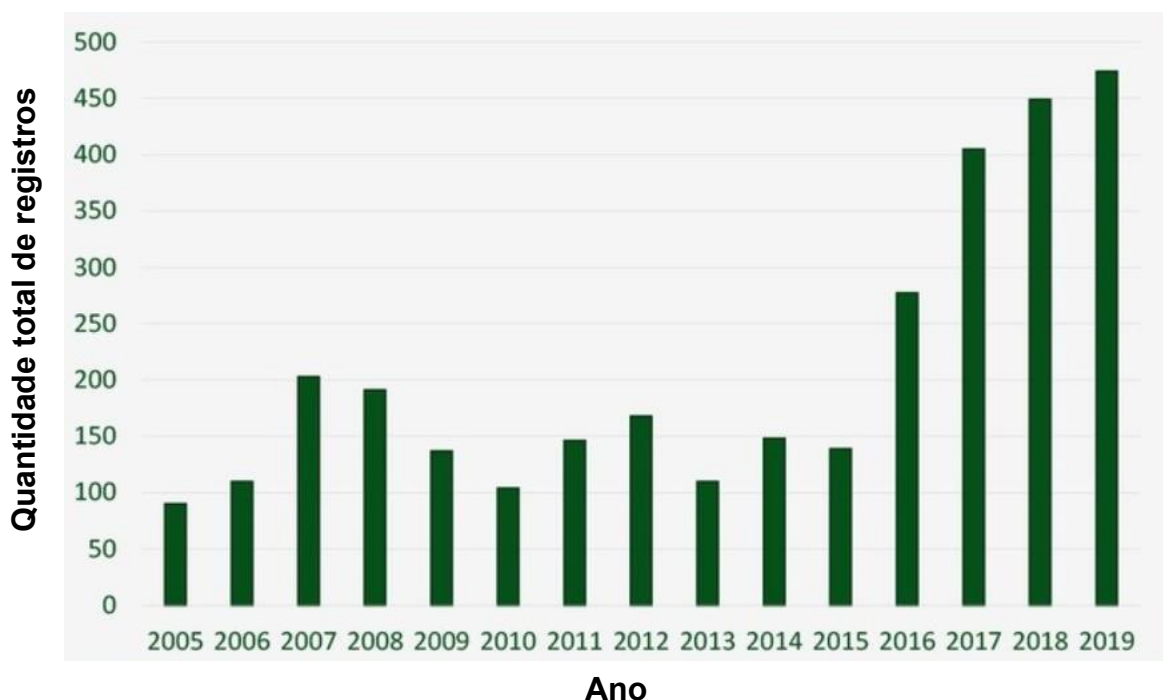


Figura 1. Registros de Agrotóxicos no Brasil.

Fonte: Retirado de Ministério da Agricultura – Infográfico atualizado em 28/12/2019.

Este aumento no uso de substâncias químicas para produção agrícola tem despertado grande preocupação à população em geral e pesquisadores, principalmente no que diz respeito à contaminação dos recursos hídricos (THOPSON et al., 2007; RIBEIRO et al., 2013). A presença de agentes químicos em ecossistemas naturais pode ser resultado de amplo uso destes produtos (KONSTANTINO et al., 2006; HILDENBRANT et al., 2008; FOIT et al., 2010).

Estima-se que mais de 90% dos agrotóxicos aplicados convencionalmente não atingem seu alvo, em um tempo definido, nas quantidades precisas (SINGH et al. 2009; YING et al. 2011). Com o objetivo de compensar estas perdas, são utilizadas quantidades exacerbadas destas substâncias químicas (CHEVILLARD et al. 2012).

Estas acabam sendo carregadas para águas superficiais onde atingem organismos não-alvo. Embora concentrações ambientais relevantes desses compostos são geralmente baixas, essas condições ainda podem causar efeitos subletais, reduzindo a aptidão dos indivíduos (SILVA et al., 2019).

A avaliação da periculosidade ambiental de um agrotóxico é de fundamental importância para minimizar possíveis riscos de contaminação dos recursos naturais. Essas avaliações requerem informações sobre seu comportamento ambiental como a lixiviação, sorção e degradação (IBAMA, 2010).

1.2 Fipronil

Esta molécula é facilmente encontrada no mercado em diversas formas físicas como a (Figura 2), o fipronil ($C_{12}H_4Cl_2F_6N_4OS$, (5-amino-1-[2,6-dicloro-4-(trifluormetil)fenil]-4-[(trifluormetil) sulfinil]-1H-pirazol-3-carbonitrila). É um inseticida de amplo espectro, derivado quimicamente da família do fenilpirazol, considerado de nova geração, altamente ativo (WILDE et al., 2001). Foi descoberto por Rhone Poulenc Agro em 1987, sendo o primeiro produto sintetizado do grupo dos fenilpirazóis lançado no mercado em 1993 e registrado como um pesticida nos Estados Unidos da América, em 1996 (CONNELLY, 2001; IKEDA et al., 2001; GUNASEKARA et al., 2007). A toxicidade do fipronil é 500 vezes mais seletiva para insetos, em comparação a outros inseticidas e possui baixa toxicidade para mamíferos, quando comparado com os clássicos tais como dieldrin, endosulfan, organofosforados e piretróides (GRANT et al., 1998; RATRA e CASSIDA, 2001; IBAMA, 2018).

A solubilidade do fipronil em água é baixa (2,4 mg L⁻¹ em pH 5), com coeficiente de sorção (K_{oc}) igual a 803 mL g⁻¹ e o log K_{ow} igual a 4,01. Assim, o fipronil é uma molécula de caráter hidrofóbico com baixo potencial de lixiviação e forte adsorção no solo e em sedimentos, e maior afinidade por matrizes orgânicas tais como lipídeos, óleos e solventes orgânicos (BARCELÓ, 1997; GUNASEKARA et al., 2007).



Figura 2. Aparência do formulado comercial Regent ® 800wg (80% fipronil).
Fonte: Autor.

O fipronil é um inseticida amplamente conhecido em mais de 70 países e utilizado em mais de 100 diferentes culturas agrícolas, é largamente utilizado na saúde pública, tratamentos veterinários e dedetização urbana, rural e domissanitária (ZHAO e SALGADO, 2010; AMARAL, 2012). O crescente uso deste inseticida, se dá, principalmente, devido à sua alta toxicidade para invertebrados, facilidade e flexibilidade com que pode ser aplicada, sua longa persistência e natureza sistêmica, fatores que garante que ele se espalhe para todas as partes da cultura alvo (VAN DER SLUIJS et al., 2015). Este inseticida classifica-se como classe II, sendo altamente tóxico ao meio ambiente (ANVISA, 2018, MAPA, 2019).

Além destes efeitos já citados, o fipronil também provoca efeitos de toxicidade reprodutiva (USEPA, 1996, JOSENDE et al. 2015), hepatotoxicidade (SOUSA et al., 1997, FERREIRA et al. 2012) e desregulação endócrina (USEPA, 1998, SILVA et al. 2011). Por isso é classificado como carcinogênico para organismos vivos (FENT

2014). Além de perturbações endócrinas, alteração da função imunológica e comportamentais (POCHINI; HOVERMAN, 2017) o fipronil pode acarretar riscos significativos ao ecossistema, independentemente das concentrações, visto que o uso do produto apresenta um conjunto crescente de evidências de que as concentrações persistentes e baixas desses inseticidas à base de fipronil representam sérios riscos de impactos ambientais (FICETOLA; DI BERNARDI, 2004; BISOGNIN, WOLFF, CUNHA et al., 2017; CARISSIMI, 2018).

O fipronil foi detectado em ambientes aquáticos localizados em áreas com predominância de lavouras de cana-de-açúcar no estado de São Paulo (Brasil), mas sua presença também tem sido relatada em corpos d'água em todo o mundo, em concentrações que variam de 0,7 a 153 ng/L (SIMON-DELSO et al., 2015; ALBUQUERQUE et al., 2016; BERNABÒ et al., 2016, FANG et al., 2019). No caso de fipronil, as concentrações observadas variaram de 6 a 465 ng/L próximos áreas cultivadas com cana de açúcar (CETESB, 2018). O fipronil também é usado em várias outras culturas agrícolas, incluindo arroz, milho, soja e trigo. Portanto, a avaliação da periculosidade ambiental para o fipronil e seus compostos é de fundamental importância para minimizar possíveis riscos de contaminação dos recursos naturais. essa avaliação requer informações sobre seu comportamento ambiental como a lixiviação, sorção e degradação (IBAMA, 2010).

1.2.1 Mecanismo de ação do Fipronil.

O fipronil é um inseticida que não segue a mesma rota bioquímica dos piretroides, que têm como função o bloqueio dos canais de sódio, interferindo nos canais de ligação com gaba (GUNASEKARA e TROUNG, 2007).

Estudos realizados mostram que o fipronil é capaz de produzir uma ampla gama de impactos adversos letais e subletais em invertebrados e também em alguns vertebrados (GIBBONS; MORRISEY e MINEAU, 2015; SIMON-DELSO et al., 2015; VANDER SJUILS et al., 2015). Determinadas alterações na integridade do DNA são umas das primeiras manifestações dos organismos após exposições a produtos químicos mutagênicos como o fipronil (GANT et al., 1998; FRENZILLI et al., 2009).

Este inseticida é muito mais tóxico em invertebrados que em vertebrados devido a suas diferentes afinidades de ligação do receptor Gaba (HAINZL et al., 1998).

O fipronil e seus derivados têm propriedades disruptivas endócrinas (GOFF et al., 2017). A exposição ao fipronil e seus metabólitos em concentrações ambientalmente é relevantes e pode danificar o sistema fisiológico e estabelecer estresse oxidativo em girinos da espécie *Eupemphix nattereri*, *Scinax fuscovarius*, resultando em mudanças em suas condições fisiológicas (TOFFOLI et al., 2015; GRIPP et al., 2017).

O fipronil pode causar efeitos irreversível no ecossistema aquático em diferentes níveis tróficos, como a inibição no crescimento e desenvolvimento dos girinos, redução da diversidade de plâncton e aumento na mortalidade de organismos aquáticos (e.g., BEGGEL et al., 2012; GIBBONS et al., 2015; QURESHI et al., 2016; GOFF et al., 2017; LI et al., 2017; HOUSSOU et al., 2018; FREDIANE et al., 2019; MOREIRA SANTOS et al., 2019; GAO et al., 2020).

1.2.2 Degradação do Fipronil.

A degradação do fipronil acarreta a atenuação dos níveis de resíduos do agrotóxico no solo e na água, caracterizando seu grau de periculosidade e persistência. Esta degradação pode ocorrer de forma biótica e/ou abiótica. Fatores como umidade, temperatura e tipo de solo podem influenciar em sua degradação (WANG et al., 2010).

Segundo os autores Bobé et al. (1998) e Rameshv & Balsubramanian (1999), o fipronil pode sofrer transformações metabólicas e degradações abióticas no meio ambiente. Os quatro principais produtos da degradação do fipronil são; o fipronil dessulfínil, fipronil sulfeto, Fipronil sulfona e fipronil amida como mostram a figura 3 (BOBÉ et al., 1998; RAMESHV & BALSUBRAMANIAN, 1999). Sendo o fipronil sulfídio, fipronil sulfona, e desulfínilfipronil, os metabólitos mais tóxicos a organismos aquáticos, a sulfona de fipronil e fipronil sulfídio são 6, 6 e 1,9 vezes mais tóxicos a invertebrados de água doce que o fipronil em si (USEPA, 1996; PERET et al., 2010).

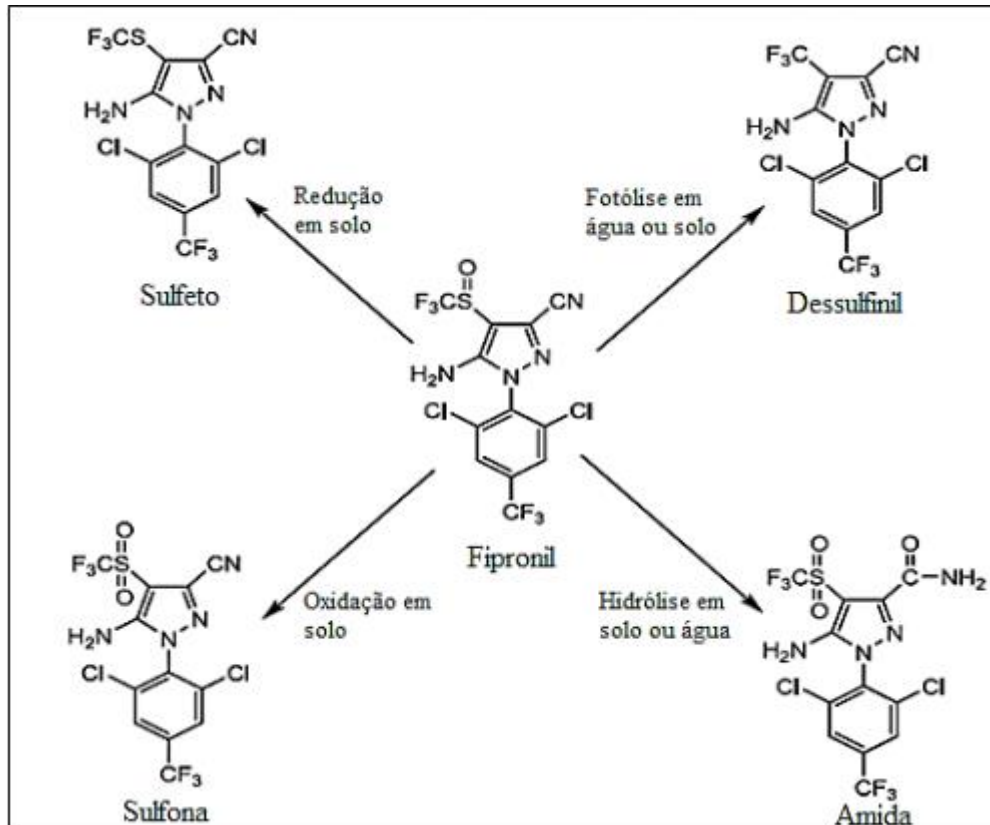


Figura 3. Produtos de degradação do fipronil.

Fonte: Adaptado de Bobé et al. (1998).

Connelly (2001) descreveu a transformação do fipronil no meio aquático, onde o produto gera o desulfetil, subproduto com ação neurotóxica semelhante à molécula original do fipronil, que mantém a ação tóxica aos organismos expostos. Sua degradação em solo e água são lentas, sendo que em água, em condição anaeróbica, seu tempo de meia vida está entre 116 e 132 dias (USEPA, 1996). O fipronil é um composto altamente persistente no solo (EFSA, 2006), possuindo de baixa a moderada solubilidade em água (JACKSON et al., 2009), garantindo ainda mais sua persistência no solo e na água (RÖMBKE et al., 2017;). Os produtos de degradação podem ser mais tóxicos, biologicamente ativos persistentes, bioacumulativos, e menos seletivos ao ambiente do que o próprio composto original, segundo (PERET et al., 2010)

1.2.3 Estudo com o Fipronil

O conceito de ecotoxicologia é definido por vários autores como os estudos dos efeitos tóxicos sobre organismos vivos, e populações naturais (CONNELL, 1997).

Propõe a ecotoxicologia como sendo a rota ambiental do agrotóxico, associado à toxicidade e seus efeitos sobre o meio ambiente (LANDIS e YU 1999).

Nos últimos anos, estudos brasileiros têm documentado a contaminação de mananciais hídricos por vários tipos de agrotóxicos. Entre eles, o fipronil foi encontrado em todas as épocas avaliadas, provavelmente devido a sua longa meia-vida no ambiente de 123 até 600 dias (SILVA et al., 2009).

Estudos realizados com o inseticida Fipronil em ratos têm demonstrado grandes alterações, como por exemplo, a diminuição dos valores hematológicos, alterações de parâmetros sanguíneos (colesterol, cálcio e proteína), alterações dos hormônios da tireoide, alterações na bioquímica da urina, alterações grosseiras à necropsia, aumento do peso do fígado e tireoide e efeitos renais (USEPA, 1996). Além destes efeitos, o Fipronil também provoca efeitos de toxicidade reprodutiva (USEPA, 1996), hepatotoxicidade (SOUSA et al., 1997), e desregulação endócrina (USEPA, 1998).

Durante os anos de 2007 a 2010, uma pesquisa da UFMT e da FIOCRUZ, realizada em Lucas do Rio Verde – MT (Brasil) constatou a presença de resíduos de vários tipos de agrotóxicos em sedimentos de duas lagoas, semelhantes aos tipos de resíduos encontrados no sangue de anuros, sendo que a incidência de má formação congênita nestes animais foi quatro vezes maior do que na lagoa controle (MOREIRA et al., 2010).

Estudos realizados com agrotóxicos têm mostrado que menos de 10% das quantidades aplicadas atingem os organismos alvos, o restante (90%) ficam disponíveis para se moverem a outros compartimentos ambientais, como águas superficiais e subterrâneas (SABIK et al., 2000; MOREIRA et al., 2020).

A avaliação dos efeitos de agroquímicos constitui-se em uma importante ferramenta para análise dos efeitos prejudiciais em espécies não alvos, ou seja, àqueles a quem o produto não é diretamente destinado (SILVA et al., 2013). Isto porque os inseticidas não têm ação seletiva, intoxicam os organismos alvo de controle e não-alvos que entrarem em contato com o ambiente contaminado. Portanto, a contaminação ambiental com o uso do fipronil pode ser avaliada por meio da determinação da toxicidade aguda e ou crônica de organismos não-alvos e as concentrações crescentes de agroquímico causaram diminuição da taxa de crescimento da população e mortalidade dos anfíbios (STARK e VARGAS, 2005; LOZI, 2019). Muitos estudos já demonstraram a toxicidade dos pesticidas para uma

variedade de insetos (CHATON et al., 2001; KOLACZINZKI e CURTIS, 2001; TIECHER et al., 2003; OVERMYER et al., 2005), crustáceos (KEY et al., 2003; BEJARANO et al., 2005; KONWICK et al., 2005), peixes e outros vertebrados (COX, 2005).

Gan et al. (2012) avaliaram a ocorrência de fipronil de uso doméstico e seus derivados em água de escoamento de 6 grandes comunidades, cada uma constituída por 152 a 460 casas unifamiliares, no município de Sacramento e Orange County, Califórnia (EUA) ao longo de 26 meses. Foram encontrados níveis de fipronil variando de 340 a 1170 ng L^{-1} , valores de risco ambiental.

Ardeshir et al. (2019) relatam que se a concentração de fipronil aumenta, há dano potencial à molécula de DNA e também aumenta o dano em outras moléculas, podendo levar à diminuição do crescimento e sobrevivência de alevinos de peixe, e deve ser considerado como um dos perigosos fatores na sobrevivência de alevinos de peixes cáspios, o pesticida tem potencial para dano ao DNA do fígado e pode ser considerado como uma das causas mais relevantes de câncer nas províncias do Norte do Irã.

Na China, o fipronil tem sido usado incorretamente e em excesso (ZHANG et al., 2016), as propriedades tóxicas do agrotóxico permanecem por longo tempo em solos aeróbicos e na água, com meia-vida variando de 2 dias a 7,3 meses, dependendo do substrato e das condições (BOBÉ et al., 1997; GUNASEKARA et al., 2007). Por suas propriedades físico-químicas, o fipronil tornou-se um contaminante ambiental generalizado (STONE et al., 2014). Após a absorção, o fipronil é encontrado predominantemente nos tecidos adiposos. A excreção do agroquímico ocorre principalmente através das fezes, urinas e em animais lactantes até 5% da dose absorvida pode ser excretada através do leite (JUNQUERA, 2016).

Scott et al. (2008) determinaram o efeito do fipronil nos córregos usados para irrigação da cultura de arroz, e por meio da avaliação da comunidade macro invertebrados verificaram que a persistência, após seis meses de uma única aplicação de fipronil foi de 0,005 mg/L^{-1} diminuiu a população dos macro invertebrados aquáticos estudados. De acordo com Cox (2005), o fipronil é tóxico para aves, lagartos, peixes, lagostim, camarão, abelhas e outros animais. Concentrações baixas (tão baixas quanto cinco partes por trilhão) causaram efeitos adversos. MOSSA et al. (2015). Sugere-se que fipronil induziu danos hepáticos e renais que são constatados com as lesões histopatológicas (DORNELLES e OLIVEIRA, 2014; PESSOA et al., 2017).

O fígado é um órgão fundamental no metabolismo, de desintoxicação e biotransformação de xenobióticos e é indicado para avaliação da resposta de exposição a poluentes ambientais em vertebrados (LUCIA et al., 2010; THIRUMAVALAVAN, 2010; REILLY et al., 2012). Esse órgão possui grande suprimento sanguíneo, além de alta capacidade metabólica (HINTON, et al., 2001) e desempenha um papel fundamental na biotransformação dos xenobióticos. Quando um composto é excretado diretamente na bile em processos de desintoxicação ele pode ser reabsorvido no intestino delgado ou eliminado pelas fezes (BOENING, 2000).

Nos Estados Unidos a comercialização do fipronil foi suspensa para tratamento de sementes, teve seu uso proibido nos demais países da Europa, após a identificação do seu alto grau de toxicidade comprovado pelos problemas sérios registrados em organismos expostos (OLIVEIRA, 2010; BEASLEY, 2020), (STEVENS et al., 1998; VALAVADINIS, 2018). Várias pesquisas apontam efeitos danosos dos pesticidas ao meio ambiente (MIZE et al., 2007; SCORZAS JUNIOR e FRANCO, 2013; GRIPP et al., 2016; TEERLINK, HERNANDEZ E BUDD, 2017; VIEIRA et al., 2018; SADARIA, et al., 2019, ARDESHIR et al., 2019; MOREIRA et al., 2020; RUTKOSKI et al., 2020; FANG et al., 2019). Sua presença também tem sido relatada em corpos d'água em todo o mundo em concentrações que variam de 0,7 a 153 ng/L, 0,05- 26,2 g/L¹ de fipronil (ALBUQUERQUE et al., 2016; FANG et al., 2019).

1.3 Anfíbios como Bioindicadores

Os anfíbios estão entre as formas de vida aquática que mais sofrem com a presença de agrotóxicos na água, são considerados bons bioindicadores de poluição ambiental por exercerem importante papel nos ecossistemas aquáticos. São animais que atendem todas as características morfológicas e fisiológicas que um bioindicador deve apresentar para testes de efeitos toxicológicos por agroquímicos, avaliando as respostas em diferentes biomarcadores de efeito.

Para a escolha do organismo-teste geralmente usa-se os seguintes critérios de seleção de espécies: abundância e disponibilidade; significativa representação ecológica dentro da biocenose; cosmopolitismo da espécie; conhecimento da sua biologia, fisiologia e hábitos alimentares; estabilidade genética e uniformidade de suas

populações; baixos índices de sazonalidade constante e apurada; importância comercial e facilidade de cultivo em laboratório (RANDI e PETROCELLI, 1995; BRODEUR e CANDIOTI, 2017).

Anfíbios são animais vertebrados tetrápodes, que habitam diversos ambientes com a presença de água e a probabilidade de entrarem em contato direto com agrotóxicos em seu habitat é alta (SEMLITSCH et al., 1988; BRANDÃO et al., 2011; WRUBLESWKI et al., 2018; FROST, 2018; FROST, 2019; SABINO et al., 2019). Associada à permeabilidade da pele, a dieta dos anfíbios também facilita a absorção de contaminantes (MCCOMB et al., 2008).

Anfíbios são conhecidos como bioindicadores de fatores que afetam o meio ambiente, sendo sensíveis a alterações ambientais (HARTMANN et BRODEUR et al., 2012; BRODEUR e CANDIOTI, 2017; JAYAWARDENA et al., 2010; VASCONCELOS, 2014; MACAGNAN et al., 2017; RUTKOSKI et al., 2018). Estudos mostram que a exposição aos agrotóxicos resulta em redução da sobrevivência, maior tempo para desenvolvimento, modificações de comportamento e deformações (MACAGNAN et al., 2017; RUTKOSKI et al., 2018), deixando-os mais vulneráveis a predadores e com capacidade reprodutiva reduzida (GIBBONS et al., 2000; USEPA, 2002; ASPENGREN et al., 2009; JAYAWARDENA et al., 2010; MARCANTONIO et al., 2011; SKOLD et al., 2016; BRODEUR E CANDIOTI. 2017; IUCN, 2019).

Segundo Hayes et al. (2010), agrotóxicos são misturas de compostos químicos que podem atrasar e/ou inibir a metamorfose dos anfíbios, e a completa inibição da metamorfose, pode impactar negativamente a reprodução (BESTEN e MUNAWAR, 2005; SAVASSI, 2019). As principais rotas de absorção de poluentes químicos por anfíbios anuros são por contato e ingestão, através dos poluentes dissolvidos ou suspensos na água. Após a absorção, a substância é transportada para diferentes compartimentos do corpo através do sangue e da linfa (no caso de vertebrados) o que pode resultar em efeitos significativos nas populações de anfíbios (WALKER et al., 2006; HAYES et al., 2010; SILVA et al., 2013).

Muitas espécies de anfíbios passam parte do seu ciclo de vida em lagoas temporárias e pequenos cursos de água, adjacentes às áreas agrícolas, onde os agrotóxicos são aplicados, e muitas vezes estas aplicações coincidem com o período reprodutivo e desenvolvimento larval, causando assim inúmeros danos para as espécies (HAYES et al., 2010; DAVID et al., 2012; ANNI et al., 2019).

O efeito de poluentes na maioria dos estudos ecotoxicológicos são conduzidos com girinos (MCDIARMID e ALTIG, 1999; PALENSKE et al., 2010). De acordo com Seixas Filho et al. (2003), os girinos nos estágios menos desenvolvidos são mais sensíveis de que em estágios mais avançados, apresentando menor capacidade de ajuste ao meio, não resistindo ao intenso trabalho metabólico, assim como a preparação para mudança de uma respiração branquial para uma respiração pulmonar. De acordo com Grisolia (2005), os estudos com anfíbios podem demonstrar claramente a fragilidade dos ecossistemas às contaminações por agroquímicos.

As alterações derivadas da ação de agroquímicos podem ser diversos, tais como reação direta com o DNA, durante a replicação celular, interferindo na divisão celular mitótica ou meiótica (VEIGA, 1995; FERNADES, 2005; COYADO et al., 2019). Estudos relatam alterações na melanina interna e na coloração da pele, devido a contaminantes ambientais (FRANCO-BELUSSI et al., 2018; SCAIA et al., 2019; PÉREZ-IGLESIAS et al., 2019), sendo correlacionado a efeitos genotóxicos (FRANCO-BELUSSI et al., 2018), demonstrando que contaminantes aquáticos podem causar prejuízos na capacidade adaptativa dos animais ao ambiente. Biomarcadores também podem ser utilizados para avaliar a atividade genotóxica e mutagênica de poluentes inespecíficos (WELSS, 2007; GONÇALVES et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2019).

Macrófagos pigmentados, ou melanomacrófagos (MMs) como são chamados são células que estão presentes nos órgãos hematopoiéticos de peixes e anuros, que auxiliam no processo de detoxificação, tais células, com atividade fagocítica semelhante à dos macrófagos (AGIUS, 1980), que contêm melanina substâncias do catabolismo celular como haemosiderina e lipofuscina (AGIUS e ROBERTS, 2003). Os MMs são biomarcadores morfológicos de efeitos (as alterações nas células hepatossomáticas e eritrócitos, MN, células anucleadas, binucleadas e apoptóticas) são utilizados como ferramentas para avaliar os efeitos dos contaminantes, por exemplo, glifosato (PÉREZ-IGLESIAS et al., 2016; BACH et al., 2018; PÉREZ-IGLESIAS et al., 2019), benzopireno (FANALI et al., 2017; 2018), flutamida (GREGORIO et al., 2016), piretróide (OLIVEIRA et al., 2016; CARBARYL ÇAKICI, 2015), bem como hormônios esteroides sexuais (ZIERI et al., 2015). Por isso, essas células são importantes para detectar alterações teciduais como resultado de possíveis xenobióticos presentes no ambiente. No entanto, há poucos estudos que avaliam o papel dessas células em girinos e não há relatos sobre os possíveis efeitos

que o fipronil pode ter sobre elas (DORNELLES e OLIVEIRA, 2014; PESSOA et al., 2017).

1.3.1. Espécie *Lithobates catesbeianus*

A espécie *Lithobates catesbeiana* tem o nome popular rã-touro, é uma espécie de ranídeo originária da América do Norte, tendo sido introduzida no Brasil na década de 1930, para cultivo comercial, em razão da grande demanda de sua carne na culinária e da utilização da pele em subprodutos, como o couro (CULLEY, 1981; CUNHA e DELARIVA, 2009; SILVA et al., 2016). É considerada uma das espécies invasoras com maior potencial impactante na diversidade natural no mundo. Estudos anteriores demonstraram que essa espécie é resistente a fatores de estresse externos e adapta-se às condições laboratoriais, além da capacidade de adaptar-se a uma grande variedade de habitats (SEMLITSCH et al., 1988; BRANDÃO et al., 2011).

Em geral, o desenvolvimento dos anfíbios anuros é caracterizado por estágios que variam de 1 a 46, sendo conhecidos como estágios de Gosner (GOSNER, 1960). O primeiro estágio, de 1 a 20, é denominado fase embrionária e é nesse período que os indivíduos se encontram protegidos por uma camada gelatinosa, isto é, estão dentro do ovo (MCDIARMMID e ALTIG, 1999). Após, ocorre a fase “larval”, composta pelos organismos jovens que eclodiram do ovo, iniciando no estágio 21 e encerrando no estágio 24. Do estágio 25 ao 41 ocorre a fase larval, que é o maior período de desenvolvimento devido ao crescimento dos membros necessários a transição da fase aquática para a terrestre (MCDIARMMID e ALTIG, 1999). A última etapa é a fase de metamorfose, a qual começa no estágio 42 e termina no estágio 46, onde se tem os indivíduos adultos (MCDIARMMID e ALTIG, 1999). Os estágios de 20 a 25 correspondem a transição da fase embrionária para larva (girino) e neste período os indivíduos desenvolvem as estruturas para alimentação, respiração e natação, como boca, brânquias e cauda, além da pigmentação da pele (MCDIARMMID e ALTIG, 1999). Na passagem da fase embrionária para larva (girino), a larva assemelha-se a um peixe (DUELLMAN e TRUEB, 1994). As larvas respiram através de brânquias, alimentam-se de partículas suspensas na água ou raspam alimentos no ambiente onde se encontram. Como possuem hábitos alimentares específicos, necessitam de peças bucais e sistema digestivo diferente dos indivíduos adultos (DUELLMAN e

TRUEB, 1994). Além disso, contém uma cauda com membranas (alas) que funciona como nadadeira, ao contrário dos adultos (DUELLMAN e TRUEB, 1994).

Dessa forma, rãs-touro oferecem um valioso indicador à análise de saúde dos ecossistemas e têm sido utilizadas como um modelo em testes toxicológicos (RISSOLI et al., 2016; ROLLINS-SMITH, 2017; STRONG et al., 2017). Dentre os critérios de escolha de rã-touro como animal modelo ressalta-se sua fácil aquisição (disponível comercialmente), e apresentar tamanho corporal grande enquanto girino, oferecendo a possibilidade de uso de um número reduzido de animais nos ensaios toxicológicos para se obter quantidades adequadas de diferentes tecidos, o que aumenta as possibilidades de análise (COSTA et al., 2008; DORNELLES e OLIVEIRA, 2014, 2016).

Girinos apresentam várias vantagens como modelos de estudo, sendo usualmente fáceis de detectar e coletar no campo. Além disso, vivem em habitats delimitados, presentes em grande número e esses, às vezes, são a única evidência da ocorrência de espécies secretas ou espécies fora do período reprodutivo (GROSJEAN et al., 2015). Em relação às outras taxas de animais, estudos ecotoxicológicos em anfíbios são escassos, até mesmo em espécies de anfíbios que enfrentam ambientes poluídos e/ou declínio populacional (LAU et al., 2015).

Vários estudos ecotoxicológicos já publicados com a finalidade de avaliar os impactos ambientais ocasionados em decorrência do uso indiscriminado de agrotóxicos, vêm utilizando a espécie *Lithobates catesbeianus*, como modelo experimental em laboratórios de pesquisas. Em levantamentos de artigos e periódicos realizados em plataformas de pesquisa são encontrados vários trabalhos e de vários pesquisadores que utilizaram a citação da espécie com a nomenclatura antiga, ou seja, *Rana catesbeiana*. Para avaliar os efeitos danosos dos agrotóxicos no meio ambiente, e no sistema aquático (SCORZAS JUNIOR e FRANCO, 2013; FRANÇA-SALGUEIRO, 2013; GRIPP et al., 2016; FROST, 2016; TEERLINK, HERNANDEZ e BUDD, 2017; VIEIRA et al., 2018; SADARIA et al., 2019; MOREIRA et al., 2020; RUTKOSKI et al., 2020), o fígado é um bom exemplo de biomarcador de efeito (ABDALLA, et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2016).

Rutkoski et al. (2020) observed changes that suggest the occurrence of oxidative damage and alterations in the central nervous system at concentrations ranging from 0.026 to 1.5 mg/L in *Physalaemus gracilis* tadpoles. As a result, we hypothesize that the sum of each specific effect can trigger systemic alterations, leading to detrimental results at the population level.

Conclusion

Fipronil has systemic effects based on its concentration (0.04, 0.08 and 0.4 mg/L) and exposure time (4, 8, 12 and 16 days). Such alterations are related to the pigment alterations and rate of abnormality in erythrocytes, which altogether, result in morphological and physiological effects, which may compromise the behavior and survival of the organism.

References

Anvisa, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2019). Accessed 12 October 2020.

Agius C, Roberts RJ. (2003) Review: Melano-Macrophage Centres and their Role in Fish Pathology. *J Fish Biol* 26:499-509. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2003.00485.x>

Agius C (1980) Phylogenetic development of melano-macrophage centres in fish. *J Zool* 191:11-31.

Agrofit, Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Regent 800 WG: Relatório de produtos formulados (2020) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, 3p.

Albuquerque AF, Ribeiro JS, Kummrow F, Nogueira AJA, Montagner CC, Umbuzeiro GA (2016) Pesticides in Brazilian freshwaters: a critical review. *Environ Sci Processes Impacts* 18:779-787. <https://doi.org/10.1039/C6EM00268D>

Allen TD, Awasthi A, Rana SVS (2004) Fish chromatophores as biomarkers of arsenic exposure. *Environ Biol Fishes* 71:7-11. <https://doi.org/10.1023/B:EBFI.0000043145.58953.86>

Amaral RB (2012) Investigação do comportamento eletroquímico do inseticida fipronil e desenvolvimento de metodologia eletroanalítica. Thesis, Universidade de São Paulo, São Carlos.

Ambali SF, Ayo JO, Esievo Kan, Ojo SA (2011) Hemotoxicity induced by chronic chlorpyrifos exposure in Wistar rats: Mitigating effect of vitamin C. *Vet Med Int* <https://doi.org/10.4061/2011/945439>

Aspengren S, Hedberg D, Sköld HN, Wallin M (2009) New Insights into Melanosome Transport in Vertebrate Pigment Cells. *Int Rev Cell Mol Biol* 272: 245-302. [https://doi.org/10.1016/S1937-6448\(08\)01606-7](https://doi.org/10.1016/S1937-6448(08)01606-7)

Barni S, Bertone V, Croce AC, Bottiroli G, Bernini F, Gerzeli G (1999) Increase in Liver Pigmentation during Natural Hibernation in some Amphibians. *J Anat* 195:19-25. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.1999.19510019.x>

Bernabò I, Guardia A, Macirella R, Sesti S, Crescente A, Brunelli E (2016) Effects of long-term exposure to two fungicides, pyrimethanil and tebuconazole, on survival and life history traits of Italian tree frog (*Hyla intermedia*). *Aquatic Toxicol* 172:56–66. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.12.017>

Bach NC, Marino DJG, Natale GS, Somoza GM (2018) Effects of glyphosate and its commercial formulation, Roundup® Ultramax, on liver histology of tadpoles of the neotropical frog, *Leptodactylus latrans* (Amphibia: Anura). *Chemosphere* 202:289-297. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.110>

Boone MD (2008) Examining the single and interactive effects of three insecticides on amphibian metamorphosis. *Environ Toxicol Chem* 27:1561-1568.

<https://doi.org/10.1897/07-520.1>

Boscolo CNP, Felício AA, Pereira TSB, Margarido TCS, Rossa-Feres DC, Almeida EA, Freitas JS (2017). Comercial insecticide fipronil alters antioxidant enzymes response and accelerates the metamorphosis in *Physalaemus nattereri* (Anura: Leiuperidae) tadpoles. *European Journal of Zoological Research* 5:1-7.

Brodeur JC, Candiotti JV (2017). Impacts of agriculture and pesticides on amphibian terrestrial life stages: potential biomonitor/bioindicator species for the pampa region of Argentina. In *Ecotoxicology and genotoxicology: non-traditional terrestrial models*. Larramendy, ML (ed) Royal Society of Chemistry, Cambridge, U.K. pp. 163-194.

Brunelli E, Bernabò I, Berg C, Lundstedt-Enkel K, Bonacci A, Tripepi S (2009) Environmental relevant concentrations of endosulfan impair development, metamorphosis and behavior in *Bufo* tadpoles. *Aquatic Toxicol* 91:135-142.

<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.09.006>

Cauble K, Wagner RS (2005) Sublethal effects of the herbicide glyphosate on amphibian metamorphosis and development. *Bul Environ Contam Toxicol* 75:429-435.

Césarini JP (1996) Melanins and their Possible Roles through Biological Evolution. *Adv Space Res* 18:35-40. [https://doi.org/10.1016/0273-1177\(96\)00025-7](https://doi.org/10.1016/0273-1177(96)00025-7)

Çakici Ö (2015) Histopathologic changes in liver and kidney tissues induced by carbaryl in *Bufotes variabilis* (Anura: Bufonidae). *Exp Toxicol Pathol* 67: 237-243.

<https://doi.org/10.1016/j.etp.2014.12.003>

Daiwile AP, Naoghare PK, Giripunje MD, Rao PP, Ghosh TK, Krishnamurthi K, Sivanesan S (2015) Correlation of melanophore index with a battery of functional genomic stress indicators for measurement of environmental stress in aquatic ecosystem. *Environ Toxicol Pharmacol* 39: 486-495.

<https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.12.006>

De Oliveira C, Franco-Belussi L, Fanali LZ, Santos LR (2017) Use of melanin-pigmented cells as a new tool to evaluate effects of agrochemicals and other emerging contaminants in Brazilian anurans. Section II: Terrestrial vertebrates as experimental models. In *Ecotoxicology and genotoxicology: non-traditional terrestrial models*. Larramendy, ML (ed) Royal Society of Chemistry, Cambridge, U.K. pp. 125-139.

Denver RJ, Crespi EJ (2006) Stress hormones and human development plasticity: lessons from tadpoles. *NeoReviews* 7:183-188. <https://doi.org/10.1542/neo.7-4-e183>

Fanali LZ, Valverde BSL, Franco-Belussi L, Provete DB, Oliveira C (2017) Response of digestive organs of *Hypsiboas albopunctatus* (Anura: Hylidae) to benzo[a]pyrene. *Amphibia-Reptilia*. 38:175-185. <https://doi.org/10.1163/15685381-00003101>

Fanali LZ, Franco-Belussi L, Bonini-Domingos CR, Oliveira C (2018) Effects of benzo[a]pyrene on the blood and liver of *Physalaemus cuvieri* and *Leptodactylus fuscus* (Anura: Leptodactylidae). Environ Pol. 237:93-102.

<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.02.030>

Fent GM (2014) Fipronil. Encyclopedia of Toxicology: Third Edition, 2:596-597.

Ferreira M, Oliveira PR, Denardi SE, Bechara GH, Mathias MIC (2012) Action of the chemical agent Fipronil (active ingredient of acaricide frontline1) on the liver of mice: An ultrastructural analysis. Microsc Res Technique 75:197-205.

Franco-Belussi L, Nilsson Sköld H, De Oliveira C (2018) Regulation of eye and jaw colouration in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). J fish Biol 92:1788-1804. <https://doi.org/10.1111/jfb.13620>

Franco-Belussi L, Skold HN, Oliveira C (2016) Internal pigment cells respond to external UV radiation in frogs. J Exp Biol 219:1378-1283.

<https://doi.org/10.1242/jeb.134973>

Franco-Belussi L, Provete DB, Borges RE, De Oliveira C, Santos LRS (2020) Idiosyncratic liver pigment alterations of five frog species in response to contrasting land use patterns in the Brazilian Cerrado. PeerJ, 8, e9751.

Fredianelli AC, Pierin VH, Uhlig SC, Galeb LAG, Rocha DCC, Ribeiro DR, Anater A, Pimpão CT (2019) Hematologic, biochemical, genetic, and histological biomarkers for the evaluation of the toxic effects of fipronil for *Rhamdia quelen*. Turk J Vet An Sci 43:54-59.

Foit A, Chatzinotas M, Liess K (2010) Short-term disturbance of a grazer has long-term effects on bacterial communities - Relevance of trophic interactions for recovery from pesticide effects. Aquat Toxicol 99: 205 – 211.

<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.04.019>

Ghisi NC, Ramsdorf WA, Ferraro MVM, De Almeida MIM, De Oliveira Ribeiro CA, Cestari MM (2011) Evaluation of genotoxicity in *Rhamdia quelen* (Pisces, Siluriformes) after sub-chronic contamination with Fipronil. Environ Monit Assess 180:589-599. <https://doi.org/10.1007/s10661-010-1807-7>

Gibbons D, Morrissey C, Mineau P (2015) A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. Environ Sci Pollut Res 22:103-118. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3180-5>

Gregorio LS, Franco-Belussi L, Gomes FR, De Oliveira C (2016) Flutamide effects on morphology of reproductive organs and liver of Neotropical Anura, *Rhinella schneideri*. Aquat Toxicol 176:181-189. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.04.022>

Gripp HS, Freitas JS, Almeida EA, Bisnoti MC, Moreira AB (2017) Biochemical effects of fipronil and its metabolites on lipid peroxidation and enzymatic antioxidant defense in tadpoles (*Eupemphix nattereri*: Leiuperidae). Ecotoxicol Environ Saf 136:173-179. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.10.027>

Hildenbrandt A, Guillamon M, Lacore S, Tauler R, Barcelo D (2008) Impact of pesticides used in agriculture and vineyards to surface and groundwater quality (North Spain). *Water Res* 42:3315–3326.

<https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.04.009>

Josende ME, Tozetti AM, Alalan MT, Mathies Filho V, Ximenez SS, Silva Júnior FMR, Martins SE (2015) Genotoxic evaluation in two amphibian species from Brazilian subtropical wetlands. *Ecol Indic* 49: 83-87.

<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2014.10.007>

Konstantinou LK, Hela DG, Albanis TA (2006). The status of pesticide pollution in surface waters (rivers and lakes) of Greece. Part I. Review on occurrence and levels. *Environ Poll* 141:555–570. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.07.024>

Lopes CVA, Albuquerque GSCD (2018) Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. *Saúde em debate* 42:518-534.

Mann RM, Hyne RV, Choung CB, Wilson SP (2009) Amphibians and agricultural chemicals: Review of the risks in a complex environment. *Environ Poll* 157: 2903-2927. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.05.015>

Margarido TCS, Felício AA, Rossa-Feres DC, Almeida EA (2013) Biochemical biomarkers in *Scinax fuscovarius* tadpoles exposed to a commercial formulation of the pesticide fipronil. *Marine Environ Res* 91:61-67.

<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.02.001>

MMA - Ministério do Meio Ambiente, Brasil. Agrotóxicos. 2018. Accessed 15 February 2020.

Montagna W, Carlisle K (1991) The architecture of black and white facial skin. *J Am Acad Dermatol* 24:929-37. [https://doi.org/10.1016/0190-9622\(91\)70148-U](https://doi.org/10.1016/0190-9622(91)70148-U)

Oliveira CR, Fraceto LF, Rizzi GM, Salla RF, Abdalla FC, Costa MJ, Silva Zacarin ECM (2016) Hepatic effects of the clomazone herbicide in both its free form and associated with chitosan-alginate nanoparticles in bullfrog tadpoles. *Chemosphere* 149: 304-313. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.01.076>

Pandey AK, Tomar V (1985) Melanophores in *Bufo melanostictus* (Schneider) tadpoles following exposure to the insecticide dimethoate. *Bull Environ Contam Toxicol* 35:796-801. <https://doi.org/10.1007/BF01636590>

Pérez-Iglesias JM, Franco-Belussi L, Moreno L, Tripole S, Oliveira C, Natale GS (2016) Effect of glyphosate on hepatic tissue evaluating melanomacrophages and erythrocytes responses in neotropical anuran *Leptodactylus latinasus*. *Environ Sci Pollut Res* 23:9852–9861. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6153-z>

Pérez-Iglesias JM, Franco-Belussi L, Natale GS, Oliveira C (2019) Biomarkes at different levels of organisation after atrazine formulation (SIPTRAN 500SC®) exposure in *Rhinella schneideri* (Anura: Bufonidae) Neotropical tadpoles. *Environ Poll* 244: 733-746. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.073>

- Pochini KM, Hoverman JT (2017) Reciprocal effects of pesticides and pathogens on amphibian hosts: The importance of exposure order and timing. *Environ Poll* 221:359-366. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.11.086>
- Provete DB, Franco-Belussi L, Santos LRS, Zieri R, Moresco RM, Martins IA, De Oliveira C (2012) Phylogenetic signal and variation of visceral pigmentation in eight anuran families. *Zool Scripta* 41:547-556.
- Qureshi IZ, Bibi A, Shahid S, Ghazanfar M (2016). Exposure to sub-acute doses of fipronil and buprofezin in combination or alone induces biochemical, hematological, histopathological and genotoxic damage in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquat Toxicol* 179:103-114. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.08.012>
- R Core Team (2017) R: a language for and environment for statistical computing, version 3.4.0.
- Reynaud S, Worms IAM, Veyrenc S, Portier J, Maitre A, Miaud C, Raveton M (2012) Toxicokinetic of benzo[a]pyrene and fipronil in female green frogs (*Pelophylax kl. esculentus*). *Environ Poll* 161:206-214. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.10.029>
- Ribeiro ACA, Dores EFGC, Amorim RSS, Lourencetti C (2013) Resíduos de pesticidas em águas superficiais de área de nascente do rio São Lourenço-MT: validação de método por 72 extração em fase sólida e cromatografia líquida. *Química Nova* 36.
- Roberts JR, Reigart JR (2013) Recognition and management of pesticide poisonings. 6 ed. Washington: USEPA. 227 p.
- Rutkoski CF, Macagnan N, Folador A, Skovronski VJ, do Amaral, AM, Leitemperger JW, Hartmann, M. T. (2020) Cypermethrin-and fipronil-based insecticides cause biochemical changes in *Physalaemus gracilis* tadpoles. *Environ Sci Pollut Res* 1-11. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10798-w>
- Santos LRS, Franco-Belussi L, Zieri R, Borges RE, Oliveira C (2014) Effects of thermal stress on hepatic melanomacrophages of *Eupemphix nattereri* (Anura). *Anat Rec* 297:864-875. <https://doi.org/10.1002/ar.22884>
- Scaia MF, Gregorio LS, Franco-Belussi L, Succi-Domingues M, Oliveira C (2019) Gonadal, body color, and genotoxic alterations in *Lithobates catesbeianus* tadpoles exposed to nonylphenol. *Environ Sci Pollut Res* 26: 22209-22219. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05403-8>
- Silva MS, Concenza DS, Grillo R, Melo NFS, Tonello PS, Oliveira LC, Cassimiro DL, Rosa AH, Fraceto LF. (2011) Paraquat-loaded alginate/chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and soil sorption studies. *J Hazardous* 190: 366-374. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.03.057>

Simon-Delso N, Amaral-Rogers V, Belzunces LP, Bonmatin JM, Chagnon M, Downs C, Goulson D (2015) Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites *Environ Sci Pollut Res* 22:5-34.

<https://doi.org/10.1007/s11356-014-3470-y>

Sköld HN, Aspengren S, Cheney KL, Wallin M (2016) Fish Chromatophores—From Molecular Motors to Animal Behavior. *Int Rev Cell Mol Biol* 321:171-219.

<https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2015.09.005>

Svensson C, Kundzewicz WZ, Maurer T (2005) Trend detection in river flow series: 2. Flood and low-flow index series. *Hydrolog Sci J* 50:811-824.

<https://doi.org/10.1623/hysj.2005.50.5.811>

Toffoli AL, da Mata K, Bisinoti MC, Moreira AB (2015) Development, validation, and application of a method for the GC-MS analysis of fipronil and three of its degradation products in samples of water, soil, and sediment. *J Environ Sc Health Part B* 50: 753-759. <https://doi.org/10.1080/03601234.2015.1058091>

Tomiazzi JS, Judai MA, Nai GA, Pereira DR, Antunes PA, Favareto APA (2018) Evaluation of genotoxic effects in Brazilian agricultural workers exposed to pesticides and cigarette smoke using machine-learning algorithms. *Environ Sci Pol Res* 25:1259-1269. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0496-y>

Thompson T, Fawell J, Kunikane S, Jackson D, Appleyard S, Callan P (2007) Chemical safety of drinking water: assessing priorities for risk management. WHO World Health Organization.

Wagner N, Müller H, Viertel B (2016) Effects of a commonly used glyphosate based herbicide formulation on early developmental stages of two anuran species. *Environ Sci Pol Res* 24:1495-1508. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7927-z>

Zhao X, Salgado VL (2010) The role of GABA and glutamate receptors in susceptibility and resistance to chloride channel blocker insecticides. *Pest Biochem Physiol* 97:153-160. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2009.10.002>

Zieri R, Franco-Belussi L, Santos LRS, Taboga SR, Oliveira C (2015) Sex hormones change visceral pigmentation in *Eupemphix nattereri* (Anura): effects in testicular melanocytes and hepatic melanomacrophages. *Animal Biology* 65:21-32.

<https://doi.org/10.1163/15707563-00002457>

Zuasti A, Jara JR, Ferre C, Solano F (1989) Occurrence of melanin granules and melanogenesis in the kidney of *Sparus auratus*. *Pig Cell Res* 2:93-100.

<https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.1989.tb00168.x>