
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA, EVOLUÇÃO E
BIODIVERSIDADE**

**AVALIAÇÃO DE MÚLTIPLOS BIOMARCADORES APÓS EXPOSIÇÃO AOS
PESTICIDAS GLIFOSATO E FIPRONIL DURANTE O DESENVOLVIMENTO
PRÉ-ECLOSÃO DE *PODOCNEMIS EXPANSA* (TESTUDINES,
PODOCNEMIDAE)**

JULIANA DOS SANTOS MENDONÇA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA, EVOLUÇÃO E
BIODIVERSIDADE

**AVALIAÇÃO DE MÚLTIPLOS BIOMARCADORES APÓS EXPOSIÇÃO AOS
PESTICIDAS GLIFOSATO E FIPRONIL DURANTE O DESENVOLVIMENTO
PRÉ-ECLOSÃO DE *PODOCNEMIS EXPANSA* (TESTUDINES,
PODOCNEMIDIDAE)**

JULIANA DOS SANTOS MENDONÇA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do *Campus* de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ecologia, Evolução e Biodiversidade.

Orientador: Prof. Dr. Denis Otavio Vieira de Andrade

Coorientador: Prof. Dr. André Luiz Quagliatto Santos

**Rio Claro – SP
2021**

M539a Mendonça, Juliana dos Santos
Avaliação de múltiplos biomarcadores após exposição aos
pesticidas glifosato e fipronil durante o desenvolvimento pré-eclosão
de Podocnemis expansa (Testudines, Podocnemididae) / Juliana dos
Santos Mendonça. -- Rio Claro, 2021
116 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientador: Denis Otavio Vieira de Andrade
Coorientador: André Luiz Quagliatto Santos

1. Agrotóxicos. 2. Ecotoxicologia. 3. Répteis. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de
Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: AVALIAÇÃO DE MÚLTIPLOS BIOMARCADORES APÓS EXPOSIÇÃO AOS PESTICIDAS GLIFOSATO E FIPRONIL DURANTE O DESENVOLVIMENTO PRÉ-ECLOSÃO DE PODOCNEMIS EXPANSA (TESTUDINES, PODOCNEMIDIDAE)

AUTORA: JULIANA DOS SANTOS MENDONÇA

ORIENTADOR: DENIS OTAVIO VIEIRA DE ANDRADE

COORIENTADOR: ANDRÉ LUIZ QUAGLIATTO SANTOS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em ECOLOGIA, EVOLUÇÃO E BIODIVERSIDADE, área: Zoologia pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. DENIS OTAVIO VIEIRA DE ANDRADE (Participação Virtual)
Departamento de Biodiversidade / UNESP - Instituto de Biociências de Rio Claro

Profa. Dra. ADRIANA REGINA CHIPPARI-GOMES (Participação Virtual)
Programa de Pós-Graduação em Ciências Animal / Universidade Vila Velha

Prof. Dr. CLASSIUS DE OLIVEIRA (Participação Virtual)
Departamento de Biologia / UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Rio Claro, 04 de novembro de 2021

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus pela determinação, fé e perseverança.

Aos meus pais, Omilton e Ana Abadia pelas inúmeras conversas, compreensão e acolhimento diário. A minha irmã Anelise por ser minha melhor amiga, conselheira, motivadora e por toda incansável ajuda. Sou infinitamente grata por tudo que fizeram e fazem por mim! Ao meu namorado Jeferson pelas inúmeras palavras de encorajamento, otimismo e por acreditar que eu seria capaz! Obrigada pelo acolhimento emocional de vocês durante toda essa trajetória.

Ao professor Dr. Denis Otavio Vieira de Andrade pelo voto de confiança, orientação e por me ajudar a crescer como pesquisadora. Obrigada por todo o apoio, respeito e por ser tão solícito.

Ao professor Dr. André Luiz Quagliatto Santos, meu coorientador, que sempre manteve as portas do LAPAS/UFU abertas para mim, agradeço todo o amparo, incentivo e assistências nos momentos inesperados, além do espaço físico para o desenvolvimento desta pesquisa.

As professoras Dras. Lucélia Gonçalves Vieira e Líria Queiroz Luz Hirano pela parceria já estabelecida há alguns anos nas pesquisas e projetos científicos. Minha gratidão por todo o auxílio, discussões e reuniões. E também pelas risadas, conselhos e pela amizade estabelecida. Ao veterinário e mestrando Julio Cesar Neves de Almeida pela colaboração no laboratório e nas análises e por toda a empolgação contagiante com a pesquisa.

Aos professores Drs. Evandro de Abreu Fernandes, Robson José de Oliveira Junior e Marcelo Emílio Beletti, pela coparticipação, suporte, ensinamentos e paciência.

Aos meus amigos, agradeço pelos momentos de descontração e pela amizade sincera e tão duradoura.

Ao Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Répteis e Anfíbios (RAN) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) por permitir à realização da pesquisa, oportunidade, parceria e motivação. À Universidade Estadual Paulista (UNESP) e aos Programas de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) e Ecologia, Evolução e Biodiversidade pela realização do Doutorado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Obrigada!

“Se, a princípio, a ideia não é absurda, então não há esperança para ela.”
(Albert Einstein)

Resumo

Os agrotóxicos exercem importantes funções na produção agrícola garantindo formas mais econômicas de plantio e colheita com o aumento da produtividade, qualidade e redução de perdas. Apesar de resultar em benefícios para o produtor, seu uso irracional e aplicação exacerbada tornaram-no a principal fonte de contaminantes orgânicos, levando altas concentrações de resíduos de pesticidas para o meio ambiente. Dentre os agrotóxicos, destacam-se o glifosato e o fipronil, que são frequentemente utilizados conjuntamente no Brasil e são suscetíveis a causar efeitos indesejáveis, sobretudo em ecossistemas hídricos. Dentre os possíveis organismos não alvo, os répteis aquáticos, sobretudo os Testudines, representam uma das ordens de animais que estão indiretamente afetadas pela aplicação dos agrotóxicos. Nesse contexto, objetivou-se investigar os potenciais efeitos tóxicos de diferentes concentrações de glifosato e/ou fipronil em embriões e neonatos de *Podocnemis expansa* expostos a substrato contaminado durante incubação artificial. Após a exposição, foi realizada a avaliação de múltiplos biomarcadores por meio da análise de viabilidade de ovos, biomassa corpórea, malformações ósseas, bromatologia das cascas dos ovos, mutageneidade, histopatologia hepática e cerebral de embriões ou neonatos de *P. expansa*. Para tal fim, ovos coletados no ambiente natural foram incubados artificialmente em areia umedecida com água contendo glifosato Atar 48 nas concentrações de 65µg/L ou 6500µg/L e fipronil Regent 800WG a 4µg/L ou 400µg/L, ou a associação de ambos os agrotóxicos. A exposição combinada se deu a partir de 65µg/L de glifosato e 4µg/L de fipronil e 6500µg/L de glifosato com 400µg/L de fipronil. Os resultados do presente estudo demonstram que a exposição aos agrotóxicos testados, isoladamente ou em combinação, interferem no crescimento embrionário de *P. expansa*, bem como induz malformações ósseas no anel ossicular escleral. Com relação a bromatologia, a exposição aos pesticidas ocasionou redução do teor de umidade e proteína bruta e aumento nos níveis de extrato etéreo da casca dos ovos. Alterações de micronúcleo, demais anormalidades nucleares eritrocitárias e histopatológicas de fígado e encéfalo evidenciaram danos mutagênicos, hepatóxicos e neurotóxicos em neonatos de *P. expansa*. Essas descobertas ressaltam o potencial risco ecotoxicológico das formulações comerciais de glifosato e fipronil sobre a biologia da espécie estudada, reforçando a importância da inclusão dos Testudines nos testes de risco ambiental causados por agrotóxicos.

Palavras-Chave: Anormalidades eritrocitárias, bromatologia, ecotoxicologia, malformações, histopatologia.

Abstract

Pesticides play important roles in agricultural production, ensuring more economical ways of planting and harvesting with productivity and quality increasing and reduced losses. Despite resulting in benefits for the producer, its irrational use and exacerbated application made it the main source of organic contaminants, taking high concentrations of pesticide residues into the environment. Among pesticides, glyphosate and fipronil stand out, which are often used together in Brazil and are susceptible to causing undesirable effects, especially in water ecosystems. Among the possible non-target organisms, aquatic reptiles, especially Testudines, represent one of the animals orders that are indirectly affected by the application of pesticides. In this context, the objective of this work was to investigate the potential toxic effects of different concentrations of glyphosate and/or fipronil on *Podocnemis expansa* embryos and neonates exposed to contaminated substrate during artificial incubation. After exposure, multiple biomarkers were evaluated by analyzing the viability of eggs, body biomass, bone malformations, egg shell bromatology, mutagenicity, hepatic and cerebral histopathology of *P. expansa* embryos or neonates. For this purpose, eggs collected in the natural environment were artificially incubated in sand moistened with water containing glyphosate Atar 48 at concentrations of 65µg/L or 6500µg/L and fipronil Regent 800WG at 4µg/L or 400µg /L, or the association of both pesticides. The combined exposure was from 65µg/L of glyphosate and 4µg/L of fipronil and 6500µg/L of glyphosate with 400µg/L of fipronil. The results of the present study demonstrated that exposure to the tested pesticides, alone or in combination, interfered with the embryonic growth of *P. expansa*, as well as inducing bone malformations in the scleral ossicular ring. Regarding bromatology, exposure to pesticides caused a reduction in the moisture and crude protein content and increased the levels of ether extract from the eggshells. Micronucleus alterations, other nuclear erythrocyte and histopathological abnormalities of the liver and brain showed mutagenic, hepatotoxic and neurotoxic damage in neonates of *P. expansa*. These findings highlighted the potential ecotoxicological risk of commercial formulations of glyphosate and fipronil on the biology of the studied specie, reinforcing the importance of including Testudines in tests for environmental risk caused by pesticides.

Keywords: Erythrocyte abnormalities, bromatology, ecotoxicology, malformations, histopathology.

Lista de Figuras

Figura 1-1:	Fórmula estrutural do Glifosato. Fonte: ANVISA.	18
Figura 1-2:	Forma estrutural do Fipronil. Fonte: ANVISA.	20
Figura 2-1:	Área de reprodução de <i>Podocnemis expansa</i> . 1- Em destaque a localização do Rio Araguaia, GO e da Universidade Federal de Uberlândia (UFU, MG), onde os ovos foram coletados e incubados, respectivamente. Distância entre os pontos de 854km. 2 - Área de Proteção Ambiental Meandros do Rio Araguaia, e identificadas por letras, as praias de nidificação da espécie. Fonte: Foto de satélite (GOOGLE) e ICMBio/MMA, Brasil, 2021.	46
Figura 3-1:	Imagem esquemática do anel ossicular escleral de Testudines: A) Anel ossicular escleral formado por vários ossículos da esclera (so) com suas bordas sobrepostas (ov) aos ossículos adjacentes. B) Anel ossicular com presença de malformações de ausência de ossículo (ao), formato irregular (is), fusão de ossículos (fo) e ossículo rudimentar (r).	53
Figura 3-2:	Viabilidade de ovos de <i>Podocnemis expansa</i> expostos ou não ao glifosato e fipronil (isoladamente ou em combinação) em incubação artificial. Os tratamentos não diferem significativamente ao nível de 0,05 pelo Teste Binomial: duas proporções. Tratamentos: G1- glifosato 65µg/L; G2- glifosato 6500µg/L; F1- fipronil 4µg/L; F2- fipronil 400µg/L; GF1- glifosato 65µg/L associado ao fipronil 4µg/L; GF2- glifosato 6500µg/L associado ao fipronil 400µg/L.	55
Figura 3-3:	Biomassa corporal, em gramas (g), de embriões de <i>Podocnemis expansa</i> expostos ou não ao glifosato e fipronil (isoladamente ou em combinação) em incubação artificial. Os tratamentos com letras distintas diferem significativamente a 0,05 pelos testes de Kruskal-Wallis e Dunn. Tratamentos: G1- glifosato 65µg/L; G2- glifosato 6500µg/L; F1- fipronil 4µg/L; F2- fipronil 400µg/L; GF1- glifosato 65µg/L associado ao fipronil 4µg/L; GF2- glifosato 6500µg/L associado ao fipronil 400µg/L.	55
Figura 3-4:	Embriões de <i>Podocnemis expansa</i> expostos ao glifosato e fipronil durante a incubação artificial, diafanizados por KOH e corados de vermelho de alizarina (ossos). (A) e (B) Grupo controle, indivíduo em estágio 26; (C) e (D) Grupo glifosato 6500 µg/L; (E) e (F) Grupo fipronil 400 µg/L e (G)	57

e (H) Grupo glifosato 6500 µg/L associado ao fipronil 400 µg/L. (C-H) Indivíduos em estágio 21. Vista ventral e dorsal, respectivamente. Destaque para o retardo na ossificação das fontanelas cranial (Fcr) e caudal (Fca) dos grupos expostos aos agrotóxicos (C, E, G) em comparação com indivíduo do grupo controle (A). Fusão dos ossos costais (Co) e neurais (Ne) presentes no indivíduo do grupo controle (B) e ausentes nos demais indivíduos dos grupos tratados (D, F, H). Ossos nucais (Nu) e periféricos (Pr) desenvolvidos no indivíduo do grupo controle (B) e retardatários nos demais indivíduos dos grupos tratados (D, F, H). Escala 5mm.

Figura 3-5: Retardo no desenvolvimento ósseo de *Podocnemis expansa* expostos ao glifosato e fipronil durante incubação artificial, diafanizados por KOH e corados de vermelho de alizarina (ossos). (A, B e C) Indivíduos Controle; (D, E e F) Indivíduos Tratados. (D) Ossificação nos ossos do crânio com a presença da fontanela (seta) no embrião do grupo tratado exposto ao glifosato 6500µg/L associado ao fipronil 400µg/L; (E) Membros torácicos esquerdos com destaque para os ossos do carpo ainda em início de desenvolvimento (seta) em grupo exposto ao fipronil 4µg/L. (F) Membros pelvins direitos com destaque para os ossos do tarso em estágio retardatário de desenvolvimento (seta) em grupo exposto ao glifosato 6500µg/L associado ao fipronil 400µg/L. Escala 5mm.

Figura 3-6: Ossículos esclerais de embriões de *Podocnemis expansa* expostos a agrotóxicos durante incubação artificial. Análise macroscópica. (A) Grupo controle; (B) e (C) Grupo glifosato 65µg/L e 6500µg/L, respectivamente; (D) Grupo fipronil 4µg/L; (E) e (F) Grupo fipronil 400µg/L; (G) e (H) Grupo glifosato 65µg/L associado ao fipronil 4µg/L; e (I) Grupo glifosato 6500µg/L associado ao fipronil 400µg/L. Observa-se a presença de: ov – sobreposição de ossículos (A); r - ossículos rudimentares (B, C, D); ao - ausência de ossificação (D e F); fo - fusão dos ossículos (E); is - formato irregular (G, H e I). Escala 1mm.

Figura 3-7: Cortes histológicos da esclera de embriões de *Podocnemis expansa* expostos a agrotóxicos durante incubação. (A) Grupo controle; (B) Grupo glifosato 65µg/L; (C) Grupo glifosato 6500µg/L (D) Grupo fipronil 4µg/L; (E) Grupo fipronil 400µg/L. As setas apontam para malformações. Observa-se a presença de: os – ossículos (A e B), ov - sobreposição de

ossículos (A e B), ao – ausência de ossificação (B e D), fo- fusão dos ossículos (C e E), r- ossículo rudimentar (D). Coloração realizada por Hematoxilina e Eosina. Escala de 200µm.

Figura 5-1: Anormalidades nucleares eritrocitárias identificadas em neonatos *P. expansa* expostos ou não ao glifosato e fipronil, isoladamente ou em combinação, em incubação artificial. A- Fotomicrografia representativa dos eritrócitos; B- Eritrócito normal; C- Núcleo com brotamento; D- Eritrócito binucleado; E- Núcleo reniforme; F- Constrição simétrica; G- Constrição assimétrica; H- Núcleo multilobado; I- Núcleo deslocado; J- Núcleo entalhado; K- Núcleo deslocado; L- Eritrócito micronucleado. Escala: 60µm. 88

Figura 5-2: Frequência total de anormalidades nucleares eritrocitárias em neonatos de *Podocnemis expansa* expostos ou não ao glifosato e fipronil, isoladamente ou em combinação, em incubação artificial. As barras indicam a média + erro padrão. Os tratamentos com letras distintas diferem significativamente a nível de 5% pelo teste de Kruskal-Wallis com comparações entre duas amostras utilizando o teste de Mann-Whitney. Tratamentos: G1- glifosato 65µg/L; G2- glifosato 6500µg/L; F1- fipronil 4µg/L; F2- fipronil 400µg/L; GF1- glifosato 65µg/L associado ao fipronil 4µg/L; GF2- glifosato 6500µg/L associado ao fipronil 400µg/L. 89

Figura 5-3: Alterações estruturais teciduais em fígado de neonatos de *Podocnemis expansa* expostos ou não ao glifosato e fipronil, isoladamente ou em combinação, em incubação artificial. De acordo com a histopatologia no tecido, foi categorizado quatro estágios de alterações: tecidos sem alteração (1), alteração discreta (2), alteração moderada (3) e alteração acentuada (4). As barras indicam a média + erro padrão. Os tratamentos com letras distintas diferem significativamente a 0,05 pelos testes de Kruskal-Wallis e Dunn. Tratamentos: G1- glifosato 65µg/L; G2- glifosato 6500µg/L; F1- fipronil 4µg/L; F2- fipronil 400µg/L; GF1- glifosato 65µg/L associado ao fipronil 4µg/L; GF2- glifosato 6500µg/L associado ao fipronil 400µg/L. 90

Figura 5-4: Alterações histológicas em fígado de neonatos de *Podocnemis expansa* expostos ou não ao glifosato e fipronil, isoladamente ou em combinação, em incubação artificial. (A) e (B) - Congestão nos vasos (setas) no grupo F2 (fipronil 400µg/L) e GF1(glifosato 65µg/L associado ao fipronil 91

4µg/L), respectivamente. (C) e (D) - Infiltrado inflamatório com presença de heterófilos (asteriscos) no grupo F1 (fipronil 4µg/L) e F2 (fipronil 400µg/L), respectivamente. Escala: (A) e (C) 300µm; (B) e (D) 200µm.

Figura 5-5: Alterações estruturais teciduais em encéfalo de neonatos de *Podocnemis expansa* expostos ou não ao glifosato e fipronil, isoladamente ou em combinação, em incubação artificial. De acordo com a histopatologia no tecido, foi categorizado quatro estágios de alterações: tecidos sem alteração (1), alteração discreta (2), alteração moderada (3) e alteração acentuada (4). As barras indicam a média + erro padrão. Os tratamentos com letras distintas diferem significativamente a 0,05 pelos testes de Kruskal-Wallis e Dunn. Tratamentos: G1- glifosato 65µg/L; G2- glifosato 6500µg/L; F1- fipronil 4µg/L; F2- fipronil 400µg/L; GF1- glifosato 65µg/L associado ao fipronil 4µg/L; GF2- glifosato 6500µg/L associado ao fipronil 400µg/L. 92

Figura 5-6: Alterações histológicas em encéfalo de neonatos de *Podocnemis expansa* expostos ou não ao glifosato e fipronil, isoladamente ou em combinação, em incubação artificial. (A) e (B) - Congestão nos vasos (setas) no grupo e GF2 (glifosato 6500µg/L associado ao fipronil 400µg/L). (C) e (D) - Necrose (pontas de setas) no grupo F2 (fipronil 400µg/L). Escala: (A) e (C) 300µm e (B) e (D) 200µm. 93

Lista de Tabelas

Tabela 3-1:	Total, média, desvio padrão (DP), erro padrão (EP), p-valor e o valor do teste de Kruskal-Wallis (H-valor) da frequência de malformação em ossículos esclerais de <i>Podocnemis expansa</i> expostos ou não - in ovo - ao glifosato e fipronil (isoladamente ou em combinação).	60
Tabela 4-1:	Média e desvio padrão, em porcentagem, da composição química de cascas de ovos de <i>Podocnemis expansa</i> expostos aos agrotóxicos glifosato, fipronil, isolados ou em associação, durante a incubação artificial.	75
Tabela 5-1:	Frequência (média $\pm$ erro padrão) de micronúcleos e outras anormalidades nucleares eritrocitárias evidenciadas em recém-eclodidos de <i>Podocnemis expansa</i> expostos ou não - in ovo - ao glifosato e fipronil (isoladamente ou em combinação).	88

Lista de abreviaturas

ABRASCO	=	Associação Brasileira de Saúde Coletiva
AChE	=	Acetilcolinesterase
ANVISA	=	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ao	=	Ausência de ossículo
BASF	=	Badische Anilin & Soda Fabrik
CAPES	=	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEUA	=	Comitê de Ética na Utilização de Animais
CFMV	=	Conselho Federal de Medicina Veterinária
CITES	=	Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies Ameaçadas
CL50	=	Concentração Letal Média
Cm	=	Centímetro
Co	=	Ossos costais
CONCEA	=	Controle de Experimentação Animal
CONAMA	=	Conselho Nacional do Meio Ambiente
°C	=	Temperatura em Graus Celsius
DNA	=	Ácido desoxirribonucleico
DP	=	Desvio padrão
EE	=	Extrato etéreo
ENAs	=	Anormalidades nucleares eritrocitárias
EP	=	Erro padrão
EPA	=	Agência de Proteção Ambiental
EPSPS	=	Enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase
et al.	=	e colaboradores
FAMEV	=	Faculdade de Medicina Veterinária

FAO	=	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
Fca	=	Fontanela caudal
Fcr	=	Fontanela cranial
fo	=	Fusão de ossículos
F1	=	Fipronil Regent 800WG 4µg/L
F2	=	Fipronil Regent 800WG 400µg/L
G	=	Gramas
GABA	=	Ácido gama-aminobutírico
g/L	=	Grama por litro
GO	=	Goiás
G1	=	Glifosato Atar 48 65µg/L
G2	=	Glifosato Atar 48 6500µg/L
GF1	=	Glifosato Atar 48 65µg/L e Fipronil Regent 800WG 4µg/L
GF2	=	Glifosato Atar 48 6500µg/L e Fipronil Regent 800WG 400µg/L
H	=	Valor do teste de Kruskal-Wallis
HBG	=	Herbicidas à base de glifosato
IBAMA	=	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ICMBio	=	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
is	=	Formato irregular de ossículos
IPA	=	Sal de isopropilamina
IUCN	=	União Internacional para a Conservação da Natureza
Kg	=	Kilograma
KOH	=	Hidróxido de potássio
L	=	Litros
LAMRA	=	Laboratório de Nutrição Animal

LAPAS	=	Laboratório de Ensino e Pesquisa em Animais Silvestres
LM	=	Lumens
M	=	Molar
MAPA	=	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MG	=	Minas Gerais
mg/Kg	=	Miligrama por quilograma
mg/L	=	Miligrama por litro
ml	=	Mililitro
mm	=	Milímetros
MM	=	Matéria Mineral
MMA	=	Ministério do Meio Ambiente
MN	=	Micronúcleo
MS	=	Matéria Seca
µg/g	=	Microgramas por grama
µg/Kg	=	Micrograma por quilograma
µg/L	=	Microgramas por litro
µg/ovo	=	Micrograma por ovo
µl	=	Microlitro
µm	=	Micrômetro
n	=	N amostral
N	=	Nitrogênio
Ne	=	Ossos neurais
NRR	=	Norma Regulamentadora Rural
Nu	=	Ossos nugal
ov	=	Ossículos com bordas sobrepostas
n°	=	Número

p	=	P-valor
PB	=	Proteína bruta
pH	=	Potencial hidrogeniônico
POEA	=	Polioxietileno amina
Pr	=	Ossos periféricos
r	=	Ossículo rudimentar
RAN	=	Centro de Conservação e Manejo de Répteis e Anfíbios
ROS	=	Espécies reativas de oxigênio
SISBIO	=	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
SNC	=	Sistema Nervoso Central
so	=	Ossículos da esclera
SP	=	São Paulo
U	=	Valor do Teste de Mann-Whitney
UE	=	União Europeia
UFU	=	Universidade Federal de Uberlândia
UNESP	=	Universidade Estadual Paulista
USEPA	=	U.S. Environmental Protection Agency
UV	=	Radiação ultravioleta
W	=	Watts
WHO	=	Organização Mundial de Saúde
%	=	Porcentagem
<	=	Menor que
±	=	Mais ou menos

Sumário

1.	Capítulo 1- Introdução Geral.....	16
1.1.	Agrotóxicos	16
1.1.1.	Glifosato	17
1.1.2.	Fipronil	19
1.2.	Ecotoxicologia	21
1.2.1.	Ecotoxicologia em Répteis	22
1.3.	<i>Podocnemis expansa</i>	24
1.4.	Biomarcadores	27
1.5.	Objetivos Gerais	29
1.6.	Hipótese	30
1.7.	Referências	30
2.	Capítulo 2 - Delineamento experimental.....	45
2.1.	Coleta dos ovos.....	45
2.2.	Incubação dos ovos.....	46
2.3.	Protocolo experimental.....	46
2.4.	Referências	48
3.	Capítulo 3 - Exposição <i>in ovo</i> a formulações comerciais de glifosato e fipronil retarda o crescimento e altera o desenvolvimento ósseo de embriões de Tartarugas- da-Amazônia (<i>Podocnemis expansa</i>, Testudines)	49
3.1.	Introdução	49
3.2.	Material e métodos	52
3.2.1.	Coleta de materiais biológicos	52
3.2.2.	Viabilidade dos ovos e massa corpórea dos embriões	52
3.2.3.	Análise morfológica de cartilagem e osso	52
3.2.4.	Técnica histológica	53
3.2.5.	Análise estatística.....	53
3.3.	Resultados e Discussão.....	54
3.3.1.	Impacto do fipronil e glifosato na viabilidade dos ovos e biomassa corpórea dos indivíduos de <i>P. expansa</i>	54
3.3.1.1.	Viabilidade dos ovos	54
3.3.1.2.	Biomassa corpórea.....	55
3.3.2.	Efeitos dos agrotóxicos nas alterações ósseas dos indivíduos de <i>P. expansa</i> ...	56

3.3.2.1.	Esqueleto axial e apendicular	56
3.3.2.2.	Anel ossicular escleral	59
3.4.	Conclusões.....	64
3.5.	Referências	65
4.	Capítulo 4 - Redução da umidade, proteína bruta e aumento do extrato etéreo da casca de ovos de <i>Podocnemis expansa</i> em exposição às formulações comerciais de glifosato e fipronil	72
4.1.	Introdução.....	72
4.2.	Material e Métodos.....	74
4.2.1.	Coleta das cascas e análise da composição química.....	74
4.2.2.	Análise estatística.....	75
4.3.	Resultados e Discussão.....	75
4.4.	Conclusão	79
4.5.	Referências	80
5.	Capítulo 5 - Mutageneicidade, hepatotoxicidade e neurotoxicidade dos pesticidas glifosato e fipronil em neonatos de Tartarugas-da-Amazônia (<i>Podocnemis expansa</i>)	83
5.1.	Introdução.....	83
5.2.	Material e Métodos.....	85
5.2.1.	Coleta de Materiais Biológicos.....	85
5.2.1.1.	Teste de micronúcleo e outras anormalidades nucleares eritrocitárias ...	86
5.2.1.2.	Histopatologia hepática e cerebral.....	87
5.2.2.	Análise estatística	87
5.3.	Resultados.....	87
5.3.1.	Mutagenicidade	87
5.3.2.	Histopatologia hepática e cerebral.....	89
5.4.	Discussão	93
5.4.1.	Mutagenicidade	93
5.4.2.	Histopatologia hepática	96
5.4.3.	Histopatologia cerebral	98
5.5.	Conclusões.....	101
5.6.	Referências	101
6.	Considerações finais	111

Capítulo 1 - Introdução Geral

1.1. Agrotóxicos

Os agrotóxicos exercem importantes funções na produção agrícola, permitindo formas mais econômicas de plantio e colheita, aumentando a qualidade, as safras e reduzindo perdas durante estocagem e transporte (HAYES JR., 1991; ZHANG et al., 2019; FERNANDES et al., 2020). Com o intenso crescimento agrícola a partir da década de sessenta, determinadas culturas tornaram-se dependentes destas substâncias (VALDES, 2010). No entanto, apesar do uso de agrotóxicos ter proporcionado um aumento da produção de alimentos e redução de perdas (ZHANG et al., 2019), seu uso irracional e aplicação exacerbada tornaram-no a principal fonte de contaminantes orgânicos, levando altas concentrações de resíduos de pesticidas para o meio ambiente (MILLER et al., 2019). Em sua aplicação nas lavouras, cerca de 99% dos pesticidas ministrados não são absorvido pelas plantas, dispersando pelo ambiente e infiltrando-se no solo e nas águas subterrâneas e contaminando direta ou indiretamente organismos não-alvo (ZHANG et al. 2011; DE CASTRO LIMA et al., 2020).

O Brasil é considerado um dos grandes produtores agrícolas mundiais e desde 2008, o país assumiu a colocação de maior consumidor de agrotóxicos do mundo (IBAMA, 2016; ZHANG, 2018). Nos últimos dez anos, o mercado brasileiro de agroquímicos cresceu 190%, mais que o dobro do mercado mundial (cerca de 93%), evidenciando que o modelo de agricultura desenvolvida atualmente no país está cada vez mais dependente dos produtos fitossanitários (SANTOS et al., 2021). Segundo boletim anual de 2020, o país aprovou o registro de 493 agrotóxicos anteriormente não certificados, sendo esse volume o maior número já documentado pelo Ministério da Agricultura (DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO, 2021).

De acordo com a Norma Regulamentadora Rural (NRR) nº 5, acompanhada da Lei Federal nº 7.802 de 11 de julho de 1989, são definidos como agrotóxicos os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas; além de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos.

Agrotóxicos, pesticidas, defensivos agrícolas, praguicidas são apenas algumas das inúmeras denominações relacionadas a um grupo de substâncias químicas utilizadas no

controle de pragas animais e vegetais (FUNDACENTRO, 1998). Essas substâncias químicas alcançam a água de rios e do mar por diversas vias, seja com o carreamento pelas chuvas e pelo ar, por acidentes durante o uso de substâncias tóxicas em processos agrícolas, ou por lançamento de esgotos domésticos e efluentes industriais (ARIAS et al., 2007). A vulnerabilidade desse ambiente depende de vários fatores como as propriedades físicas e químicas dos contaminantes, da concentração que chega ao ecossistema, se a descarga do contaminante é pontual ou difusa, da localização do ecossistema em relação ao ponto onde o contaminante foi liberado e da capacidade dos organismos deste ecossistema de armazenar e biotransformar estas substâncias (AZEVEDO e CHASIN, 2003; MOZETO e ZAGATTO, 2006; IGNÁCIO, 2018).

Dentre os agrotóxicos, as classes utilizadas em maior volume são os herbicidas e os inseticidas e dentre estes, destacam-se o glifosato e o fipronil, respectivamente (SIMONDELSON et al., 2015; BECKIE et al., 2020).

1.1.1. Glifosato

Os herbicidas representam o maior grupo de agrotóxicos utilizados, tanto em termos de volume quanto em número de classes químicas e moléculas desenvolvidas (VALDES, 2010). Estes produtos têm alta susceptibilidade a causar impactos em ecossistemas aquáticos, já que tendem a apresentar maior solubilidade em água do que outros tipos de agrotóxicos (HARTLEY et al., 2001).

O grande destaque na utilização dos herbicidas é a participação do ingrediente ativo glifosato, que representa 76% do total de herbicidas comercializados e 40% do total de agrotóxicos utilizados na produção agrícola brasileira (CARNEIRO, 2015; DEMICHELLI et al., 2020). Trata-se de uma substância química cuja aplicação deve ocorrer em caráter pós-emergencial nas plantas invasoras das culturas de algodão, ameixa, arroz, banana, cacau, café, cana-de-açúcar, citros, coco, feijão, fumo, maçã, mamão, milho, nectarina, pastagem, pera, pêssego, seringueira, soja, trigo e uva (SZEPANOWSKI et al., 2018; DUKE, 2020). Segundo a Associação Brasileira de Saúde Coletiva (ABRASCO), o aumento constante na utilização de agrotóxicos no Brasil, no decorrer da última década, deve-se principalmente à expansão do cultivo da soja transgênica e à resistência adquirida pelas plantas daninhas combatidas mediante aplicação do glifosato (CARNEIRO, 2015). Em consequência disso, esse herbicida passou a ser utilizado mais frequentemente, muitas vezes em doses mais elevadas, resultando em potenciais efeitos secundários adicionais (VAN BRUGGEN et al., 2018).

O glifosato [N-(fosfonometil) glicina] (Figura 1-1) é considerado tóxico para espécies aquáticas, pouco tóxico para organismos do solo e pouco bioacumulável (ANNETT et al., 2014). Embora seja degradado por microrganismos, esse herbicida apresenta persistência variável no ambiente, sendo que sua meia-vida varia de menos de uma semana a alguns meses, dependendo dos teores de matéria orgânica, argila e do nível de atividade microbiana (BLAKE e PALLETT, 2018; CHAULET et al., 2019; DUKE, 2020). No entanto, a sua utilização intensiva tem resultado em um crescente nível de resíduos no ambiente, sobretudo no meio aquático (lençóis freáticos, lagos e rios) (VAN BRUGGEN et al., 2018).

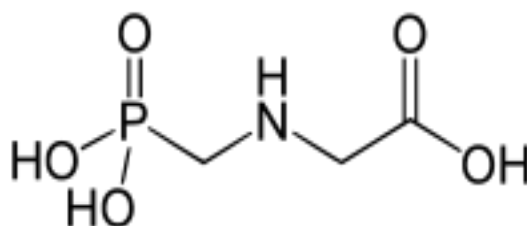


Figura 1-1: Fórmula estrutural do Glifosato. Fonte: ANVISA.

Quimicamente, o glifosato é constituído pelo aminoácido glicina e por um grupo fosfonometil e é o princípio ativo de vários produtos fitofarmacêuticos (AZIZ, 2020). Possuindo várias formulações e concentrações, denominou-se o seu conjunto como herbicidas à base de glifosato (HBG), destacando o Roundup, Buggy 360, Touchdown premium, Tornado, Glifos Titan, Spasor K, Rumbo, Verdys e o Glifosato Atar 48 como seus principais representantes comerciais (OLIVEIRA e HENRIQUES, 2011). Em sua formulação há a presença de sal de amônio ou sal de isopropilamina em concentrados ou grânulos hidrossolúveis, além de vários adjuvantes, em particular surfactantes, como o polioxietilenoamina (POEA) capazes de maximizar a eficácia do herbicida, aumentando sua toxicidade (AZIZ, 2020).

A Agência de Proteção Ambiental (EPA) classifica o glifosato como sendo “praticamente não-tóxico e não irritante em toxicidade aguda”, e a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) e a Organização Mundial de Saúde (WHO) têm classificado esse composto como “seguro”, desde que não exceda o valor máximo de ingestão diário (FAO-WHO refere que esse valor é de 1mg/kg de peso vivo - PV) (WHO, 2017; AZIZ, 2020). No Brasil, após a reclassificação dos agrotóxicos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o glifosato teve sua toxicidade reduzida, sendo suas formulações classificadas como “categoria 4 - produto pouco tóxico” e “categoria 5 - produto improvável de causar dano agudo” (DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO, 2019).

A avaliação dos riscos potenciais do herbicida glifosato para a saúde humana e ambiental foi centrada na presença de resíduos nos vegetais e animais destinados ao consumo humano (RIBEIRO et al., 2018). No que se refere a definição dos parâmetros de segurança relativos à quantidade de resíduos de glifosato que podem ser encontrados nos alimentos, percebe-se que houve, nos últimos anos, um grande aumento no que tange ao limite máximo estabelecido como condição para preservação do meio ambiente e da saúde humana (MACHADO, 2016). Comparando com os parâmetros de segurança estabelecidos no Brasil e na União Europeia, percebe-se uma assimetria referente aos mesmos, visto que o resíduo de glifosato permitido no Brasil para a soja é até duzentas vezes maior do que aquele permitido na União Europeia, (0,05mg/kg na UE e 10mg/kg no Brasil) (BOMBARDI, 2017; RIBEIRO et al., 2018).

Pesquisadores em todo o mundo têm manifestado preocupações sobre a segurança do glifosato, defendendo que este acarreta vários efeitos nocivos na saúde humana e animal, além de problemas ambientais (AZIZ, 2020). Alguns estudos de efeitos adversos em laboratório e em campo demonstraram que o glifosato tem baixa toxicidade para abelhas, minhocas e aves, e que o risco é pequeno para organismos aquáticos (DALLEGRAVE, 2003). No entanto, estudos têm demonstrado que o glifosato é capaz, por exemplo, de causar distúrbios comportamentais e morfológicos em *Danio rerio* (0,065 e 0,5mg/L - BRIDI et al., 2017), danos ao DNA de *Salvator merianae* (100µg/ovo - SCHAUMBURG et al. 2016), alterações teciduais hepáticas em *Dendropsophus minutus* (65, 130, 260 e 520µg/L - LOPES et al. 2021), estresse oxidativo em *Trachemys scripta elegans* (30mg/L - HÉRITIER et al., 2017) e mutageneidade em *Caiman latirostris* (500, 750, 1000µg/ovo - LÓPEZ GONZÁLEZ et al. 2017).

Com relação ao contato humano, esse herbicida foi considerado de baixa toxicidade, volatilidade e de reduzida absorção cutânea, tornando sua aplicação segura para trabalhadores que utilizam todos os equipamentos de proteção (DALLEGRAVE, 2003). No entanto, estudos já constataram além de rinite e dermatites em pessoas que entraram em contato com esse herbicida, alterações mutagênicas no DNA e cromossomos de células humanas (NIELSEN et al., 2007; MLADINIC et al., 2009; SLAGER et al., 2010; IARC, 2015).

1.1.2. Fipronil

Dentre os inseticidas, o fipronil [5-amino-1- (2,6-dicloro-R, R, -trifluoropropil) -4-(trifluorometil) sulfinil] pirazole-3-carbonitrilo] (Figura 1-2) é considerado altamente ativo e de amplo espectro, sendo utilizado em mais de 100 diferentes culturas agrícolas, além de ser

empregado na saúde pública, tratamentos veterinários e dedetização urbana, rural e domissanitária (ROBERTS e REIGART, 2013; CHAULET et al, 2019; SANTOS et al., 2021). Derivado quimicamente da família do fenilpirazol, esse inseticida é um potente disruptor do sistema nervoso central dos insetos, mediante o bloqueio dos canais de cloro mediados pelos aceptores do ácido gama amino butírico (GABA), promovendo paralisia, convulsões e morte (TINGLE et al., 2003; CHAULET et al, 2019).

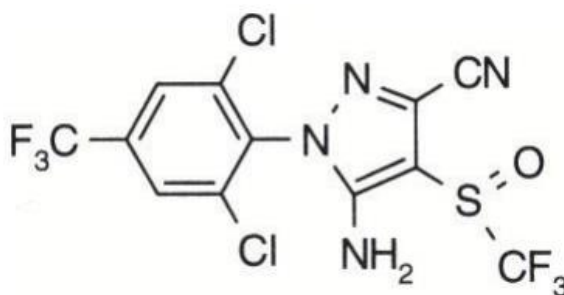


Figura 1-2: Forma estrutural do Fipronil. Fonte: ANVISA.

Sendo altamente persistente no solo e possuindo baixa a moderada solubilidade em água, o fipronil pode ser degradado mediante os processos de fotólise, pela radiação ultravioleta, e/ou degradação microbiana originando subprodutos que muitas vezes são mais tóxicos do que a molécula original (CONNELLY, 2001, GRANZOTO, 2018). De caráter hidrofóbico, sua molécula apresenta baixo potencial de lixiviação e forte adsorção no solo e em sedimentos, apresentando maior afinidade por matrizes orgânicas tais como lipídeos, óleos e solventes orgânicos (GUNASEKARA et al., 2007; SANTOS, 2021).

A utilização do fipronil em grandes quantidades pode gerar resíduos no ambiente, principalmente nos recursos hídricos próximos às áreas nas quais foi utilizado (CHAULET et al, 2019). Sua degradação é considerada lenta no solo e na água, com uma meia-vida variando entre 36 horas a quase 8 meses, dependendo do substrato e condições do ambiente (SCORZA JUNIOR e FRANCO, 2013; GRANZOTO, 2018). Tendo em vista sua alta toxicidade, alguns países da Europa como França, Itália, Alemanha e Eslovênia proibiram a comercialização do fipronil (OLIVEIRA et al., 2012; GRANZOTO, 2018). No Brasil, o fipronil é um dos inseticidas mais utilizados para combater pragas, principalmente em culturas alimentícias (SIMON-DELISO et al., 2015), sendo comercialmente encontrado com vários nomes como Icon, Ascend, Chipco, Adonis, Frontline e Regent (CHAGURI, 2016). É classificado “classe II - moderadamente perigoso” pela WHO e “categoria 2 - produto altamente tóxico” pela ANVISA (WHO 2009; DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO, 2019).

A crescente utilização do fipronil ocorre, sobretudo, devido à sua alta toxicidade para invertebrados, sendo até 500 vezes mais seletivo para insetos em comparação a outros inseticidas como dieldrin, endosulfan, organofosforados e piretróides (GRANT et al., 1998; RATRA e CASIDA, 2001; SANTOS, 2021). Além disso, a facilidade e flexibilidade com que o fipronil pode ser aplicado, sua longa persistência e natureza sistêmica são fatores que garante que ele se espalhe para todas as partes da cultura alvo (VAN DER SLUIJS et al., 2015; SANTOS et al., 2021).

Existem evidências de que o fipronil e seus derivados podem bioacumular, principalmente em peixes e anfíbios, podendo representar um risco para o meio aquático (QIAN et al., 2017; CHAULET et al., 2019). No entanto, existem escassas informações sobre os impactos que este inseticida podem causar nesses ambientes. Efeitos adversos do fipronil podem ocasionar redução da atividade alimentar, peso corporal e da proporção fígado e/ou gordura corporal de *Acanthodactylus dumerili* (30µg/g de peso corporal - PEVELING e DEMBA, 2003), alterações cerebrais em *Rutilus frisii* (632mg/kg - ARDESHIR et al. 2017), aumento da mortalidade e redução na taxa de eclodibilidade e comprimento corporal em *D. rerio* (2,5, 7,5 e 15mg/L - PARK et al. 2020), efeitos teratogênicos e mortalidade em *Silurana tropicalis* (0,35-3,50 mg/L – SAKA e TADA, 2021) e alterações genotóxicas e melânicas em *Lithobates catesbeianus* (0,04, 0,08, 0,4mg/L – SANTOS et al., 2021). Além de perturbações endócrinas, alteração da função imunológica e comportamentais (POCHINI; HOVERMAN, 2017), o fipronil é classificado como carcinogênico para organismos vivos (FENT, 2014; SANTOS, 2021), podendo o seu uso gerar riscos significativos ainda desconhecidos ao ecossistema (CUNHA et al., 2017; SANTOS et al., 2021).

1.2. Ecotoxicologia

Considerando a alta toxicidade tanto do glifosato quanto do fipronil, sua grande utilização e o alto potencial de contaminação da rede hidrográfica, tornam-se relevantes os estudos ecotoxicológicos e de avaliação do potencial de risco destes agrotóxicos. Nesse sentido, a ecotoxicologia é a ciência que estuda os efeitos das substâncias químicas sobre os organismos vivos e populações naturais, podendo a resposta ser aguda ou crônica e diferindo na duração e intensidade das exposições (SILVA et al., 2015). Trata-se de uma ferramenta auxiliar nas análises de impactos ambientais causados por tais elementos, estimando assim sua toxicidade em relação ao organismo teste utilizado (WALKER et al., 2012; SILVA et al., 2015).

Segundo Buss e et al. (2008), os resultados das análises químicas por si só não retratam o impacto ambiental causado pelos poluentes, pois não demonstram os efeitos sobre o ecossistema. Somente os sistemas biológicos podem detectar os efeitos tóxicos das substâncias, demonstrando a importância destas análises na hora de se avaliar se há ou não riscos à biota encontrada no local de enfoque da pesquisa (MAGALHÃES e FILHO, 2008; SILVA et al., 2015). Enquanto as análises químicas identificam e quantificam as concentrações das substâncias tóxicas, os testes de toxicidade avaliam o efeito dessas substâncias sobre sistemas biológicos (COSTA et al., 2008). Sendo assim, partes destes compostos podem causar danos aos organismos, e estes serão considerados quando houver mudanças bioquímicas ou fisiológicas que adversamente afetam os indivíduos nas taxas de nascimento, crescimento ou mortalidade (WALKER et al., 2012).

A ecotoxicidade de determinado composto químico é variável e depende também das propriedades dos ingredientes ativos e inertes que compõe o produto (IBAMA, 2009; SILVA et al., 2015). Dependendo de sua toxicidade e do tempo que permanece disponível no meio ambiente, os agrotóxicos podem interferir em processos básicos do ecossistema, como respiração do solo, ciclagem de nutrientes, mortalidade de peixes ou aves, redução em população de espécies, entre outros (IBAMA, 2009). Tendo em vista a grande complexidade e variedade das interações entre esses parâmetros, tornou-se fundamental a padronização de estudos e monitoramento para analisar os impactos ambientais (METCALF; EDDY, 2003). Esses testes são aplicados também para avaliar a sensibilidade relativa de organismos aquáticos para determinado contaminante ou agente tóxico ou ainda a eficiência de diferentes métodos de tratamento para efluentes industriais (METCALF; EDDY, 2003). Testes em laboratório são realizados com organismos aquáticos, principalmente com peixes, vistos que os mesmos podem acumular substâncias tóxicas em concentrações muito acima daquelas encontradas nas águas onde vivem de forma direta (HELFRICH et al. 1996). No entanto, há poucos estudos referentes a contaminação e a exposição de outros organismos aquáticos, como os répteis, sobretudo da fauna brasileira.

1.2.1. Ecotoxicologia em Répteis

A perda da biodiversidade global causada sobretudo pela poluição ambiental são uma ameaça iminente para muitos grupos taxonômicos de vertebrados, incluindo os répteis (BÖHM et al. 2013; MINGO, 2019). De acordo com a Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN, estima-se que 15-32% da diversidade mundial de répteis esteja ameaçada, enquanto, 42% de todas as espécies europeias apresentam tendências de declínio

populacional (COX e TEMPLE, 2009; MINGO et. al., 2017; MINGO 2019). Embora os répteis tenham sido tradicionalmente estudados juntamente com anfíbios no campo da herpetologia, foi somente nos recentes anos que o interesse em sua conservação começou a aumentar (SPARLING et al. 2010). No entanto, esses animais permanecem o táxon menos estudado entre os grupos de vertebrados, correspondendo a menos de 1% dos estudos de ecotoxicologia (SPARLING et al., 2010; MINGO 2019; ZHANG, 2019).

Os agrotóxicos são considerados como um dos principais causadores de declínio populacional dos répteis em todo o mundo, juntamente com perda e degradação de habitat, espécies invasoras introduzidas, doenças, uso insustentável e mudanças climáticas globais (TODD et al., 2010; BÖHM et al. 2013; MINGO et. al., 2017). Essa susceptibilidade a contaminação se deve sobretudo pela exposição direta ao solo contaminado, inalação, ingestão de alimento, penetração na pele e ingestão regular do solo (RICH e TALENT, 2009; AMARAL et al., 2012; BÖHM et al., 2013). Embora muitas espécies tenham conseguido se adaptar persistindo nos habitats alterados por atividades agrícolas, eles agora têm que lidar com a carga adicional de poluição resultante do aumento do uso de pesticidas e outros agroquímicos (GIBBS et al., 2009; MINGO et. al., 2017).

Muitas das espécies de répteis são caracterizadas pela fidelidade às suas pequenas áreas de vida, frequentemente apresentando baixas capacidades de dispersão com poucas habilidades para escapar da exposição a pesticidas (BÖHME, 1981; HUEY, 1982; SOUTHWOOD e AVENS, 2010; MINGO et. al., 2017), o que os tornam ideais para estudos envolvendo efeitos de contaminantes locais (GIBBONS, 2000; CAMPBELL e CAMPBELL, 2002). Além disso, uma variedade de répteis tem determinação do sexo dependente da temperatura, um processo que pode ser particularmente sensível a perturbações por substâncias químicas que imitam hormônios naturais (disruptores endócrinos) (GIBBONS, 2000; HOPKINS, 2000; GARDNER e OBERDÖRSTER, 2005).

Em relação a seu metabolismo, os répteis são considerados animais de sangue frio e, como tal, têm taxas mais baixas de catabolismo e depuração do que outros animais, como pássaros e mamíferos, podendo manter cargas corporais mais elevadas de contaminantes (PORTELLI e BISHOP, 2000). Além disso, muitas espécies de répteis são conhecidas por armazenar quantidades de gordura corporal, que podem servir para bioacumular lipofílicos contaminantes (CAMPBELL e CAMPBELL, 2000; PORTELLI e BISHOP, 2002). São também predadores ou catadores e ocupam posições relativamente altas em níveis tróficos. Isso resulta em uma maior probabilidade de maior exposição a contaminantes persistentes como resultado da biomagnificação (acúmulo progressivo de substâncias de um nível trófico

para outro ao longo da teia alimentar) (HALL, 1980; CAMPBELL e CAMPBELL, 2002; PEVELING; DEMBA 2003).

Com relação aos atributos de sua história de vida, muitos répteis possuem alta longevidade e desenvolvimento tardio se comparado com outras classes de animais (GARDNER e OBERDÖRSTER, 2005). Isto proporciona uma oportunidade para se avaliar os efeitos de contaminantes em espécies que foram expostas por longos períodos e determinar as respostas das populações a toxicidade (HOPKINS, 2000; GARDNER e OBERDÖRSTER, 2005).

Embora a quantidade de estudos sobre os efeitos toxicológicos de pesticidas em répteis sejam escassos, já foram observados efeitos potencialmente letais (WEIR et al., 2014; CHANG et al., 2016; EMERY et al. 2021), bem como diversos efeitos subletais. Estes últimos incluem uma série de implicações para indivíduos expostos, que vão desde respostas hormonais e enzimáticas, alterações morfológicas, estresse oxidativo, implicações neurotóxicas e imunossupressão, reações fisiológicas, prejuízos na fertilidade, desenvolvimento e desempenho locomotor, até o hermafroditismo (HOPKINS e WINNE, 2006; AMARAL et al., 2012; BICHO et al., 2013; LATORRE et al., 2013; LÓPEZ-GONZÁLEZ et al., 2013; CARDONE, 2015; CARPENTER et al., 2016; SCHAUMBURG et al., 2016; SOLTANIAN, 2016; LATORRE et al., 2016; MINGO et al., 2017; HIRANO et al., 2019; MESTRE et al., 2019; DE-OLIVEIRA et al. 2020; CHEN et al., 2020).

Dentre os répteis, os Testudines representam importantes bioindicadores para estudos ecotoxicológicos (FORERO-MEDINA et al., 2019). Dentre eles, destacam-se as tartarugas de água doce, que desempenham importantes funções no ambiente por meio de sua grande biomassa, alta produtividade secundária e contribuição para o fluxo de energia dentro e entre os ecossistemas (LOVICH et al., 2018; FORERO-MEDINA et al., 2019).

1.3. *Podocnemis expansa*

Dentre os répteis, os Testudines estão entre os animais mais ameaçados do mundo (BONIN, et al., 2006). O Brasil possui 36 espécies distribuídas nos seus mais diversos ecossistemas aquáticos e terrestres, sendo 29 espécies de água doce, 2 terrestres e 5 marinhas (COSTA e BÉRNILS, 2018). Dentre eles, destaca-se a família Podocnemididae, onde se encontram as espécies *Peltocephalus dumerilianus*, *Podocnemis unifilis*, *P. eritrocephala*, *P. sextuberculata* e *P. expansa* (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA, 2014).

Popularmente conhecida como tartaruga-da-Amazônia, tartaruga-verdadeira, aráu ou jurará-açu, a *Podocnemis expansa* consiste no maior Testudines de água do doce da América do Sul (ERNST e BARBOUR, 1989; PRITCHARD, 1979). É particularmente vulnerável, apresentando ampla distribuição geográfica pelos rios e lagos das bacias do Amazonas e Orinoco na Colômbia, Venezuela, Guianas, Equador, Peru, Bolívia e Brasil; e atingindo a bacia Araguaia-Tocantins na região central do território brasileiro (RUEDA-ALMONACID et al., 2007; VOGT et al., 2015; SANTOS e FIORI, 2020). Sendo valiosa fonte de alimento e renda, possui uma extensa história de exploração com a instalação humana ao longo desses rios e a comercialização de sua carne, vísceras, gordura e ovos, o que resultou em populações esgotadas em toda a área de distribuição da espécie (SANTOS e FIORI, 2020; CARVALHO et al., 2020).

Assim como todos os representantes de sua ordem, *P. expansa* apresenta a carapaça como instrumento de defesa e fuga de seus predadores, sendo esta achatada e mais larga na região posterior, característica que dá nome a espécie (ATAÍDES, 2020). Os adultos apresentam coloração marrom, cinza ou verde-oliva enquanto que os filhotes e jovens possuem manchas amarelas na cabeça, que se tornam marrom-escuro com o avançar da idade (VOGT, 2008; ATAÍDES, 2020). Em ambiente natural são predominantemente herbívoros e consomem grande variedade de frutos, sementes, flores, folhas e talos, sendo que a matéria vegetal pode representar mais de 90% de sua dieta (RUEDA-ALMONACID et al., 2007). Itens de origem animal, como por exemplo, insetos, crustáceos e pequenos peixes, geralmente são consumidos em pequenas quantidades (IBAMA, 1989; BALENSIEFER e VOGT, 2006; MALVASIO et al., 2003; VOGT, 2008). Em cativeiro essa espécie pode ser onívora e oportunista, consumindo alimento animal quando disponível (ATAÍDES, 2020).

A espécie *Podocnemis expansa* pode chegar a medir 107 cm de comprimento de carapaça e pesar 90kg, e se caracteriza por apresentar baixa capacidade de crescimento populacional, alta longevidade e maturidade sexual tardia (POUGH, et al. 2003; ATAÍDES, 2020). O desenvolvimento desses animais é influenciado pela temperatura, trocas gasosas e hídricas (POUGH et al., 2008). Sabe-se ainda que a própria determinação sexual depende de tais condições (MALVASIO, 2001). Durante a estação chuvosa, quando os rios transbordam, indivíduos de todas as faixas etárias vão para lagos e florestas inundadas a procura de alimento (PRITCHARD; TREBBAU, 1984; IVERSON, 1992). No período de seca, juvenis e sub-adultos tendem a permanecer nesses locais, enquanto os indivíduos adultos retornam ao leito dos rios, especialmente para as áreas onde se formam as praias, onde se reproduzem (VOGT, 2008; ATAÍDES, 2020).

Há uma sincronização entre a vazante dos rios da Amazônia e o desencadeamento do início do período reprodutivo de *P. expansa* (VOGT, 2008; ATAÍDES, 2020). Quando as águas dos rios atingem seus níveis mais baixos, as fêmeas formam grandes grupos em algumas poucas praias e desovam coletivamente (RUEDA-ALMONACID et al., 2007; ATAÍDES et., 2021). A nidificação ocorre preferencialmente nas praias após a meia-noite em grupo de centenas e até milhares de animais (DUPRE et al., 2007, SALERA JÚNIOR et al., 2009). As fêmeas sobem as praias, caminham lentamente pela areia, escavam um ninho profundo e depositam em média 100 ovos de formato esférico e casca flexível dentro das câmaras (RUEDA-ALMONACID et al., 2007). Após sua oviposição, as fêmeas fecham os ninhos e retornam para o rio (VANZOLINI, 1967; ALHO e PÁDUA, 1982, PRITCHARD e TREBBAU, 1984). Após um período de incubação que varia de 36 a 75 dias, dependendo da localidade, os filhotes rompem a casca dos ovos, saem do ninho e se deslocam até o rio (ERNST e BARBOUR, 1989; FERREIRA JUNIOR e CASTRO, 2003; ATAÍDES, 2020).

Em consequência da excessiva exploração de suas populações naturais e da constante degradação de seu habitat, *P. expansa* está classificada como espécie quase ameaçada de extinção pelo Ministério do Meio Ambiente brasileiro (VOGT et al., 2015; ICMBio, 2018; ATAÍDES et al., 2021). Na Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais, a espécie é classificada como de baixo risco de extinção, mas dependente de ações de conservação (IUCN, 2018); e está listada no Apêndice II da Convenção sobre Comércio Internacional das Espécies da Fauna e Flora Selvagens Ameaçadas de Extinção, tendo seu comércio sujeito a controle e regulamentação rigoroso (CITES, 2017).

A grande predação de Testudines ocorrida entre os anos de 1960 e 1970 alarmou o Governo Federal Brasileiro, que em 1979, estabeleceu o Projeto de Proteção e Manejo de Quelônios da Amazônia (ROCHA, 2011). Esse projeto de proteção é coordenado desde 1989 pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e visa recuperar e proteger áreas de reprodução, e por meio de estratégias de manejo, aumentar o sucesso reprodutivo das espécies de tartarugas, especialmente de *P. expansa* (CANTARELLI, 2006; BANZAN, 2008).

Alguns estudos já relataram efeitos tóxicos da exposição à agrotóxicos em *Podocnemis expansa* como redução na taxa de eclosão e nos níveis de fósforo e gordura total da casca de ovos expostos a parationa-metílica (35, 350 e 3500µg/L- VALDES et al. 2015), redução do número de ossículos esclerais e a presença de ossículos rudimentares e lacunas em embriões de *P. expansa* expostos a atrazina (2, 20 ou 200µg/L - CARNEIRO et al., 2019) e

alterações na morfometria eritrocitária em juvenis expostos *in ovo* à diferentes concentrações de glifosato, atrazina e fipronil (65 e 6500µg/L; 2 e 200µg/L; 4 e 400µg/L, respectivamente-DE-OLIVEIRA et al. 2020). No entanto, são ainda escassas as informações sobre os reais impactos biológicos advindos da exposição indireta dos agrotóxicos glifosato e fipronil, isolados ou em associação, na saúde dessa espécie e no meio ambiente que habitam.

1.4. Biomarcadores

No que se refere aos fatores químicos, a detecção precoce de uma intensa exposição pode diminuir significativamente a ocorrência de efeitos adversos na saúde animal (AMORIM, 2003). Por meio de informações provenientes da monitorização da exposição ambiental, há a possibilidade de implantação de medidas de prevenção e controle apropriadas, sendo necessários a definição dos níveis permissíveis de exposição e a avaliação regular dos seus possíveis riscos à saúde (BERNARD e LAUWERYS, 1986; AMORIM, 2003). Essa exposição pode ser avaliada por meio da concentração do agente químico em amostras ambientais, como o ar (monitorização ambiental), ou através da medida de parâmetros biológicos (monitorização biológica), denominados biomarcadores (AMORIM, 2003).

O termo biomarcador ou marcador biológico sintetiza o estudo das respostas biológicas aos contaminantes, e pressupõe o conceito de vigilância biológica, que tem a finalidade de sinalizar precocemente possíveis efeitos capazes de comprometer a manutenção de funções vitais desde o indivíduo até populações (ROMÉO e GIAMBÉRINI, 2012; MELO, 2015). Vários são os parâmetros biológicos que podem ser alterados como consequência da interação entre o agente químico e o organismo, entretanto, a determinação quantitativa destes parâmetros usados como biomarcadores só é possível se existir correlação com a intensidade da exposição e/ou o efeito biológico da substância (AMORIM, 2003).

O biomarcador deve ser específico, preciso, válido e sensível, e dependendo da finalidade do estudo e do tipo da exposição química, podem ser usados para vários propósitos, dentre eles para avaliação da exposição (quantidade absorvida ou dose interna), dos efeitos das substâncias químicas e da suscetibilidade individual (AMORIM, 2003; GUPTA, 2014; SILVA, 2016). Além disso, podem ser utilizados independentemente da fonte de exposição, seja através da dieta ou do meio ambiente geral (WHO, 1993). Sua sensibilidade, característica importante para a relevância do biomarcador, refere-se à capacidade para mostrar diferenças marcadas mesmo após níveis sutis de exposição toxicológica, devendo esta ser suficiente para fornecer informações sobre diferenças existentes em populações

provenientes de regiões distintas e em diversos intervalos de tempo (variações sazonais e variações ao longo do tempo) (RYAN et al., 2007; SOGORB et al., 2014; SILVA, 2016). Outras características desejáveis a um biomarcador ideal incluem sua confiança e persistência, a sua presença numa fração importante da população, uma distribuição espacial alargada e uma ocorrência temporal adequada (RYAN et al., 2007; SILVA, 2016).

A aplicação de biomarcadores em um cenário real de avaliação ambiental, como em estudos *in situ*, utilizando espécies aclimatadas em laboratório, introduz diversos fatores (variações de temperatura, pH e oxigênio, presença de múltiplas fontes de compostos) que estão ausentes em estudos em laboratório devido à manutenção de condições controladas, e oferecem maior robustez ecológica aos resultados (HANSON e LARSSON, 2011; KERAMBRUN et al., 2011; MILLER et al., 2014; MELO, 2015). Estes estudos geralmente são de curta duração e promovem respostas rápidas sobre a qualidade da água e/ou sedimento com uma boa relação custo/eficácia (CASTRO et al., 2004).

O desenvolvimento e aplicação de biomarcadores para uso em ecotoxicologia e avaliação de risco ecológico aumentou acentuadamente nos últimos anos, sendo atribuídas diversas definições de sua abordagem ao longo da história (GIL e PLA, 2001; FORBES et al., 2006; MELO, 2015). McCarthy e Shugart (1990) restringiu a aplicação do termo biomarcador a medidas a nível molecular, bioquímica ou celular em organismos expostos. Mais tarde, Depledge (1994) contribuiu para a abrangência do termo, elevando o nível hierárquico de organização biológica ao acrescentar medidas em relação ao comportamento individual dos organismos. Redefinições restringindo o termo apenas a medidas bioquímicas não foram bem aceitas pela comunidade científica (VAN DER OOST et al., 2005), que alegou a preocupação em não negligenciar outras respostas como fisiológicas e comportamentais, que podem ser utilizadas em avaliações de risco envolvendo uma mudança de escala de organização biológica de indivíduos para a população (ROMÉO e GIAMBÉRINI, 2012; MELO, 2015).

Atualmente, os biomarcadores são classificados funcionalmente como de exposição, de efeito e de suscetibilidade (CAJARAVILLE et al., 2000; MELO, 2015). De acordo com Amorim (2003), os biomarcadores de exposição podem ser usados para confirmar e avaliar a exposição individual ou de um grupo, para uma substância em particular, estabelecendo uma ligação entre a exposição externa e a quantificação da exposição interna. Os de efeito podem ser usados para documentar as alterações pré-clínicas ou efeitos adversos à saúde decorrentes da exposição e absorção da substância química. Dessa forma, a ligação dos biomarcadores entre exposição e efeitos contribui para a definição da relação dose-resposta. Já os

biomarcadores de suscetibilidade permitem elucidar o grau de resposta da exposição provocada nos indivíduos.

As estratégias adotadas para a avaliação de risco ecológico devem considerar o tipo e dinâmica do ambiente, além dos possíveis contaminantes cujos efeitos e exposição serão investigados, uma vez que as respostas biológicas e mecanismos de ação irão variar em função destes fatores (MELO, 2015). No caso de ambientes estuarinos e costeiros, áreas geralmente com significativa influência de atividades poluidoras, um das classes de contaminantes aquáticos mais frequentes e em concentrações potencialmente perigosas são os agrotóxicos (ZANARDI et al., 1999; ALBERS, 2003; MELO, 2015). Neste sentido, a avaliação destas respostas aos contaminantes aquáticos ganha uma abordagem ainda mais ampla quando são utilizadas espécies sentinelas ou residentes (MELO, 2015).

Possuindo importante papel como organismos bioindicadores, as espécies sentinelas são utilizadas para detecção precoce da presença e da toxicidade de poluentes no ambiente e se baseia no conceito de que, após a introdução de tais substâncias, os primeiros efeitos são observados ao nível do organismo, afetando posteriormente a população, a comunidade, e em última análise, o ecossistema como um todo (BERTHET, 2012; MELO, 2015). Mesmos afetados, estes organismos tem capacidade de permanecer em um ambiente pouco favorável e assim, revelar alterações que vão desde a bioacumulação e bioconcentração das substâncias em tecidos e fluidos corpóreos, alterações nos parâmetros biológicos em vários níveis de organização biológica (molecular, celular, fisiológica, individual, etc.), que conduzam ao comprometimento da sua capacidade reprodutiva e sobrevivência, e a potenciais perturbações da estrutura e funcionamento do ecossistema em longo prazo (BAYNE et al., 1985; BERTHET, 2012; MELO, 2015). Ao possibilitar a identificação precoce destes distúrbios, as espécies sentinelas elevam as chances de que as respostas biológicas sejam atenuadas ou revertidas, observadas a partir dos biomarcadores, e também aumentam a oportunidade de definir a fonte de contaminação (VAN DER OOST et al., 2003; MELO, 2015).

1.5. Objetivos Gerais

Tendo em vista a importância de trabalhos referentes à exposição de contaminantes em répteis, sobretudo em Testudines, e seus possíveis efeitos nesses organismos, nesta tese de doutorado analisou-se, por meio de múltiplos biomarcadores, os possíveis efeitos da contaminação dos agrotóxicos glifosato e fipronil durante o desenvolvimento pré-eclosão de *Podocnemis expansa*. Para isto, foram definidos os seguintes objetivos específicos:

1. Investigar a viabilidade dos ovos, o crescimento dos animais (biomassa corpórea) e malformações embrionárias em exposição de embriões de *P. expansa* incubados em substrato contendo diferentes concentrações das formulações comerciais glifosato e/ou fipronil.
2. Identificar possíveis alterações na matéria seca (MS) e mineral (MM), proteína bruta (PB), nitrogênio (N) e extrato etéreo (EE) das cascas dos ovos de *P. expansa* incubados em substrato expostos a diferentes concentrações de glifosato e/ou fipronil.
3. Investigar os potenciais efeitos mutagênico, hepatóxico e neurotóxico em neonatos de *P. expansa* expostos a substrato contaminado com diferentes concentrações de glifosato e/ou fipronil durante incubação artificial.

1.6. Hipótese

A hipótese testada foi que a incubação de ovos de *Podocnemis expansa* em substrato poluído com diferentes concentrações de glifosato e/ou fipronil causa contaminação dos embriões e neonatos, interferindo em sua saúde e desenvolvimento.

1.7. Referências

- ALBERS, P. H. Petroleum and individual polycyclic aromatic hydrocarbons. In: HOFFMAN, D. J.; RATTNER, B. A.; BURTON G. A.; CAIRNS J. (eds), **Handbook of Ecotoxicology**. Boca Raton, FL: Lewis Publishers, p.341-371, 2003.
- ALHO, C.J.R.; PÁDUA, L.F.M. Early growth of pen-reared Amazon turtles (*Podocnemis expansa*) (Testudinata, Pelomedusidae). **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v.42, n.4, p.641-646, 1982.
- AMARAL, M.J.; SANCHEZ-HERNANDEZ, J.C.; BICHO, R.C.; CARRETERO, M.A., VALENTE, R., FAUSTINO, A.M., SOARES, A.M., MANN, R.M. Biomarkers of exposure and effect in a lacertid lizard (*Podarcis bocagei* Seoane) exposed to chlorpyrifos. **Environ. Toxicol. Chem.** v.31, p.2345–2353, 2012.
- AMORIM, L.C.A. Biomarkers for evaluating exposure to chemical agents present in the environment. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.6, n.2, p. 158- 170, 2003.
- ANNETT, R.; HABIBI, H.R.; HONTELA, A. Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. **J Appl Toxicol.** v.34, p.458–479, 2014.

ARDESHIR, R. A.; ZOLGHARNEIN, H.; MOVAHEDINIA, A.; SALAMAT, N.; ZABIHI, E. Comparison of waterborne and intraperitoneal exposure to fipronil in the Caspian white fish (*Rutilus frisii*) on acute toxicity and histopathology. **Toxicology Reports**, v.4, p.348–357, 2017.

ARIAS, A. R. L.; BUSS, D. F.; ALBURQUERQUE, C.; INÁCIO, A. F.; FREIRE, M. M.; EGLER, M.; MUGNAI, R.; BAPTISTA, D. F. Use of bioindicators for assessing and monitoring pesticides contamination in streams and rivers. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.12, n.1, p. 61-72, 2007.

ATAÍDES, A.G. **Parâmetros populacionais e aspectos da conservação de *Podocnemis expansa* (Testudines, Podocnemididae), nas regiões do médio Araguaia e baixo Xingu, Brasil**. 123 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Tocantins, Campus. Universitário de Palmas, Palmas, Tocantins, 2020.

ATAÍDES, A. G.; SILVA, R. L.; MALVASIO, A. Percepções sobre aspectos da conservação dos quelônios na região do Baixo Xingu, Sudeste da Amazônia Brasileira. **Revista Ibero Americana de Ciências Ambientais**, v.12, n.1, p.663-679, 2021.

AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Carlos: RiMa, São Paulo: Intertox, 340p. 2003.

AZIZ Z.A. **Efeitos toxicológicos do glifosato**. 70p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Instituto Universitário Egas Moniz, Almada, Portugal, 2020.

BALENSIEFER, D. C.; VOGT, R. C. Diet of *Podocnemis unifilis* (Testudines, Podocnemididae) during the dry season in the Mamirauá Sustainable development Reserve, Amazonas, Brazil. **Chelonian Conservation and Biology**, v.5, n.2, p.312-317, 2006.

BANZAN, N. M. **Sucesso reprodutivo da tartaruga-da-amazônia *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) (Reptilia: Pelomedusidae), no município de Ribeirão Cascalheira – MT**. 2008. 43p. Trabalho de Conclusão de Curso, Departamento Ciências Biológicas – Universidade do Estado do Mato Grosso, 2008.

BAYNE, B.L.; BROWN, D.A.; BURNS, K.; DIXON, D.R.; IVANOVICI, A.; LIVINGSTONE, D.A.; LOWE, D.M.; MOORE, M.N.; STEBBING, A.R.D.; WIDDINGS, J. **The Effects of Stress and Pollution on Marine Animals**. Praeger, New York, USA, 1985.

BECKIE, H.J.; FLOWER, K.C.; ASHWORTH, M.B. Farming without Glyphosate? **Plants**. v.9, n.96, p.1-15, 2020.

BERNARD, A.; LAUWERYS, R. Assessment of human exposure to chemicals through biological monitoring. In: KOPFLER FC, CRAUN, GF (eds). **Environmental Epidemiology**. Chelsea: Lewis Publ. Inc. p.17-28, 1986.

BERTHET, B. Sentinel Species. In: AMIARD-TRIQUET, C.; AMIARD, J.C.; RAINBOW, P.S. **Ecological Biomarkers: Indicators of Ecotoxicological Effects**. CRC Press, p. 155, 2012.

BICHO, R.C.; AMARAL, M.J.; FAUSTINO, A.M.R.; POWER, D.M.; RÊMA, A.; CARRETERO, M.A.; SOARES, A.M.; MANN, R.M. Thyroid disruption in the lizard *Podarcis bocagei* exposed to a mixture of herbicides: a field study. **Ecotoxicology**, v.22, p.156–165, 2013.

BLAKE, R.; PALLETT, K. The environmental fate and ecotoxicology of glyphosate. **Outlooks on Pest Management**, v.29, n.6, p.266-269, 2018.

BÖHM, M. et al. The conservation status of the world's reptiles. **Biol. Conserv.** v.157, 372e385, 2013.

BÖHME, W. **Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas**. Akademische Verlagsgesellschaft, Wiesbaden, 1981.

BOMBARDI, L. M. **Geografia do Uso de Agrotóxicos no Brasil e Conexões com a União Europeia**. São Paulo: FFLCH – USP, 296p. 2017.

BONIN, F.; DEVAUX, B.; DUPRÉ, A. **Toutes les Tortues du Monde**. Paris: Delachaux and Niestle, 416 p. 2006.

BRIDI, D.; ALTENHOFEN, S.; GONZALEZ, J.B.; REOLON, G.K.; BONAN, C.D. Glyphosate and Roundup® alter morphology and behavior in zebrafish. **Toxicology**. v.392, p.32-39, 2017.

BUSS, D. F.; OLIVEIRA, R. B.; BAPTISTA, D. Monitoramento biológico de ecossistemas aquáticos continentais. **Oecol. Bras.**, v.12, n.3, p.339- 345, 2008.

CAJARAVILLE, M.P.; BEBIANNO, M.J.; BLASCO, J.; PORTE, C.; SARASQUETE, C.; VIARENGO, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **Science of the Total Environment**, v.247, p. 295-311, 2000.

CAMPBELL, K.R.; CAMPBELL, T.S. A logical starting point for developing priorities for lizard and snake ecotoxicology: a review of available data. **Environ. Toxicol. Chem**, v.21, n.5, p.894–898, 2002.

CAMPBELL, K.R.; CAMPBELL, T.S. Lizard contaminant data for ecological risk assessment, **Rev. Environ. Contam. Toxicol.**, v.165, n.39, p. 804-809, 2000.

CANTARELLI, V. H. **Alometria Reprodutiva da Tartaruga-da-Amazônia (*Podocnemis expansa*): Bases Biológicas para o Manejo**. Tese (Doutorado em Ecologia de Agroecossistemas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba. 2006.

CARDONE, A. Imidacloprid induces morphological and molecular damages on testis of lizard (*Podarcis sicula*). **Ecotoxicology**, v. 24, p. 94–105, 2015.

CARNEIRO, F.F. **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. (Org.) CARNEIRO, F.F.; AUGUSTO, L.G.S.; RIGOTTO, R.M.; FRIEDRICH, K.; BÚRIGO, A.C. - Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015.

CARNEIRO, I.V.; VIEIRA, L.G.; MENDONÇA, J.M.; HIRANO, L.Q.L.; VALDES, S.A.C.; MENEZES - REIS, L.T.; SANTOS, A.Q. Development of scleral ossicles in *Podocnemis expansa* (Testudines: Podocnemididae) embryos exposed to atrazine. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 14, p. 1-6. 2019.

CARPENTER, J.K.; MONKS, J.M.; NELSON, N. The effect of two glyphosate formulations on a small, diurnal lizard (*Oligosoma polychroma*). **Ecotoxicology**, v. 25, p. 548–554, 2016.

CARVALHO, A.V.; LOPES, T.K.M.; MALVASIO, A. importância social de *Podocnemis expansa*, tartaruga-da-amazônia, no rio Javaés, Tocantins, Brasil, Amazônica. **Revista de Antropologia**. v.12, n. 2. p.609 – 620, 2020.

CASTRO, B.B.; SOBRAL, O.; GUILHERMINO, L.; RIBEIRO, R. An in situ bioassay integrating individual and biochemical responses using small fish species. **Ecotoxicology**, v.13, p. 667-681, 2004.

CHAGURI, J.L. **Efeitos da exposição ao pesticida fipronil nas alterações pressóricas em ratos acordados**. 49p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia e Biotecnologia) - Instituto de Biociências, Unesp, Campus de Botucatu, São Paulo, 2016.

CHANG, J., LI, J.; WANG, H.; WANG, Y.; GUO, B.; YIN, J.; HAO, W.; LI, W.; LI, J.; XU, P. Tissue distribution, metabolism and hepatic tissue injury in Chinese lizards (*Eremias argus*) after a single oral administration of lambda-cyhalothrin. **Environ. Pollut.** v.218, p.965–972, 2016.

CHAULET, F.C.; BARCELLOS, H.H.A.; FIOR, D.; POMPERMAIER, A.; KOAKOSKI, G.; ROSA, J.G.S.; FAGUNDES, M.; BARCELLOS, L.J.G. Glyphosate- and Fipronil-Based Agrochemicals and Their Mixtures Change Zebrafish Behavior. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.77, n.3, p.443-451, 2019.

CHEN, L.; WANG, D.; ZHOU, Z.; DIAO, J. Comparing alpha-cypermethrin induced dose/gender-dependent responses of lizards in hepatotoxicity and nephrotoxicity in a food chain. **Chemosphere**, v.256, 127069, 2020.

CITES - CONVENTION ON INTERNATIONAL TRADE IN ENDANGERED SPECIES OF WILD FAUNA AND FLORA. Appendices I, II and III. 2017. Disponível em <<https://cites.org/eng>>. Acesso em: 20 setembro 2021.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v.31, n.7, p.1820-1830, 2008.

COSTA, H. C.; BÉRNIL, S. R. S. Répteis do Brasil e suas Unidades Federativas: Lista de espécies. **Herpetologia Brasileira**, v.7, n.1, p.11-57, 2018.

CONNELLY, P. Environmental Fate of Fipronil. **Calif. Environ. Protec. Ag.** California, EUA, 2001.

COX, N.A., TEMPLE, H.J. **European Red List of Reptiles**. IUCN - International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, Gland, Luxembourg. 2009.

CUNHA, E.L.R.; MATOS, R.S.; PEREIRA, N.R.C.; OLIVEIRA, P.R; DAEMON, E.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Histopathological changes in the liver and thyroid of mice (*Mus musculus*) caused by the acaricides: fipronil and thymol. **Journal of Histology & Histopathology**, p.4-9, 2017.

DALLEGRAVE, E.; MANTESE, F. D.; COELHO, R. S.; PEREIRA, J. D.; DALSENTER, P. R.; LANGELOH, A. The teratogenic potential of the herbicide glyphosate-Roundup in Wistar rats. **Toxicology letters**, Amsterdam, v.142, n.1-2, p. 45-52, 2003.

DE CASTRO LIMA, J. A. M.; LABANOWSKI, J.; BASTOS, M. C.; ZANELLA, R.; PRESTES, O. D.; DE VARGAS, J. P. R.; MONDAMERT, L.; GRANADO, E.; TIECHER, T.; ZAFAR, M.; TROIAN, A.; LE GUET, T.; DOS SANTOS, D.R. “Modern agriculture” transfers many pesticides to watercourses: a case study of a representative rural catchment of southern Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v.27, n.10, p.10581–10598, 2020.

DEMICHELLI, F. N.; MOURA, G. S.; FRANZENER, G.; BITENCOURT, T. B.; DOS PASSOS FRANCISCO, C. T.; CAZAROLLI, L. H. Characterization of microorganisms isolated from soil contaminated with Glyphosate in southern Brazil. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v.3, n.1, p.2-8, 2020.

DE-OLIVEIRA, J.S.P.; VIEIRA, L.G.; CARVALHO, W.F.; DE SOUZA, M.B.; DE LIMA RODRIGUES, A.S.; SIMÕES, K.; DE SILVA, D.M.; MENDONÇA, J.S.; HIRANO, L.Q.L.; SANTOS, A.L.Q.; MALAFAIA, G. Mutagenic, genotoxic and morphotoxic potential of different pesticides in the erythrocytes of *Podocnemis expansa* neonates. **Science of The Total Environment**, v.737, 140304, 2020.

DEPLEDGE, M. H. Genotypic toxicity: implications for individuals and population. **Environmental Health Perspectives**, v.102, p. 101-104, 1994.

DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Secretaria de Defesa Agropecuária/Departamento de Sanidade Vegetal e Insumos Agrícolas/Coordenação-Geral de Agrotóxicos e Afins. 2021. ATO Nº 70, de 23 de dezembro de 2020. Publicado em: 11/01/2021, Edição: 6, Seção: 1, Página: 7.

DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Secretaria de Defesa Agropecuária/Departamento de Sanidade Vegetal e Insumos Agrícolas/Coordenação-Geral de Agrotóxicos e Afins. 2019.ATO Nº 58, de 27 de agosto de 2019. Publicado em: 30/08/2019, Edição: 168, Seção: 1, Página: 5.

DUKE, S.O. Glyphosate: environmental fate and impact. **Weed Sci.** v.68, n.3, p.201–207, 2020.

DUPRE, A.; DEVAUX, B.; BONIN, F. **Turtles of the World**. A & C Black Publishers Ltd, London, 416 p. 2007.

EMERY, J.P.; MITCHELL, N.J.; COGGER, H.; AGIUS, J.; ANDREW, P.; ARNALL, S.; DETTO, T.; DRISCOLL, D. A.; FLAKUS, S.; GREEN, P.; HARLOW, P.; MCFADDEN, M.; PINK, C.; RETALLICK, K.; ROSE, K.; SLEETH, M.; TIERNAN, B.; VALENTINE, L. E.; WOINARSKI, J. Z. The lost lizards of Christmas Island: A retrospective assessment of

factors driving the collapse of a native reptile community. **Conservation Science and Practice**, v.3, n.2, p.1-20, 2021.

ERNST, C. H.; R. W. BARBOUR. **Turtles of the world**. Washington, DC: Smithsonian Institution Press. 313 p. 1989.

FENT, G.M. **Fipronil**. **Encyclopedia of Toxicology**, Eds 3, v.2, p.596-597, 2014.

FERNANDES, C.L.F.; VOLCÃO, L.M.; RAMIRES, P.F.; MOURA, R.R.; DA SILVA JÚNIOR, F.M.R. Distribution of pesticides in agricultural and urban soils of Brazil: a critical review. **Environ Sci Process Impacts**, v.22, n.2, p.256-270, 2020.

FERREIRA JÚNIOR, P. D.; CASTRO, P. T. A. Geological control of *Podocnemis expansa* and *Podocnemis unifilis* nesting areas in Javaés River, Bananal Island, Brasil. **Acta Amazonica**, v.33, n.3, p.445-468, 2003.

FORBES, V. E.; PALMQVIST, A.; BACH, L. The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.25, n.1, p. 272-280, 2006.

FORERO-MEDINA, G.; FERRARA, C.R.; VOGT, R.C.; FAGUNDES, C.K.; BALESTRA, R.A.M.; ANDRADE, P.C.M.; LACAVA, R.C.; BERNHARD, R.; LIPMAN, A.J.; LENZ, A.J., FERRER, A.; CALLE, A.; APONTE, A.F.; CALLE-RENDÓN, B.R.; SANTOS CAMILO, C.; PERRONE, E.L.; MIRAÑA, E.; CUNHA, F.; ANDREW G.; LOJA, E.; DEL RIO, J.; VERA FERNANDEZ, J.L.; HERMÁNDEZ, O.E.; DEL AGUILA, R.; PINO, R.; CUEVA, R.; MARTINEZ, S.; BERNARDES, V.C.D.; SAINZ, L.; HORNE, B.D. On the future of the giant South American river turtle *Podocnemis expansa*. **Oryx**, v.5, n.1, p.73 – 80, 2019.

FUNDACENTRO. Prevenção de acidentes no trabalho com agrotóxicos: segurança e saúde no trabalho, n. 3. São Paulo: **Fundação Jorge Duprat Figueiredo de Segurança e Medicina do Trabalho**, Ministério do Trabalho, 1998.

GARDNER, S. C.; OBERDÖRSTER, E. **Toxicology of Reptiles. New Perspectives: Toxicology and the Environment**. Eds 1, 329p. 2005.

GIBBONS, J. W. The global decline of reptiles, déjà vu amphibians, **BioScience**, v.50, n. 653, 2000.

GIBBS, K.E.; MACKEY, R.L.; CURRIE, D.J. Human land use, agriculture, pesticides and losses of imperiled species. **Divers. Distrib.** v.15, p. 242–253, 2009.

GIL, F.; PLA, A. Biomarkers as biological indicators of xenobiotic exposure. **Journal of Applied Toxicology**, v.21, n.4, p.245–25, 2001.

GRANT, D.B.; CHALMERS, A.E.; WOLFF, M.A.; HOFFMAN, H.B.; BUSHEY, D.F.; KUHR, R.J.; MOTOYAMA, N. Fipronil: action at the GABA receptor. In: **Pesticides and the Future: minimizing chronic exposure of humans and the environment**. IOS Press, Amsterdam. p.147-156, 1998.

GRANZOTO, M.R. **Toxicidade do fipronil sobre *Enchytraeus crypticus* em solo natural tropical: teste multigeracional**. 69p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia na área Ambiente) - Faculdade de Tecnologia da Universidade Estadual de Campinas, Limeira, São Paulo, 2018.

GUNASEKARA, A. S.; TRUONG, T.; GOH, K. S.; SPURLOCK, F.; TJEERDEMA, R. S. Environmental fate and toxicology of Fipronil. **J. Pest. Sci.** v.32, n.3, p.189-199, 2007.

GUPTA, R. C. Chapter 1: Introduction. In: Gupta. R. C. (Ed.). **Biomarkers in Toxicology**. Kentucky, USA, Elsevier, p. 3-5, 2014.

HALL, R. J. Effects of environmental contaminants on reptiles: a review, Washington DC, US Fish and Wildlife Service, Spec. **Sci. Rept. Wildl.**, v.1, n.128, 1980.

HANSON, N.; LARSSON, Å. Biomarker analyses in caged and wild fish suggest exposure to pollutants in an urban area with a landfill. **Environmental Toxicology**, v.26, p.315-324, 2011.

HARTLEY, W. R.; WHITE, L.E.; THIYAGARAJAH, A.; MENDLER, J.M.; GEORGE, W.J. History and risk assessment of triazine herbicides in the lower Mississippi River. In: JOHNSTON, J. J. **Pesticides and Wildlife**. Washington, DC: American Chemical Society, p.225-239, 2001.

HAYES-JR, W. H. Introduction. In: LAWS JR., E. R. **Handbook of pesticide toxicology**. California: Academic Press, Inc. v.1, n.3, p. 1-37, 1991.

HELFRICH, L.A.; WEIGMANN, D.L.; HIPKINS, P.; STINSON, E.R. **Pesticides and aquatic animals: a guide to reducing impacts on aquatic systems**. 1996. Disponível em: <www.ext.vt.edu/pubs/waterquality/420-013/420-013.pdf>. Acesso em 20 de setembro 2021.

HÉRITIER, L.; DUVAL, D.; GALINIER, R.; MEISTERTZHEIM, A.L.; VERNEAU, O. Oxidative stress induced by glyphosate-based herbicide on freshwater turtles. **Environ. Toxicol. Chem.** v.36, p.3343–3350, 2017.

HIRANO, L.Q.L.; ALVES, L.S.; MENEZES-REIS, L.T.; MENDONÇA, J.S.; SIMÕES, K.; SANTOS, A.L.Q.; VIEIRA, L.G. Effects of egg exposure to atrazine and/or glyphosate on boné development in *Podocnemis unifilis* (Testudines, Podocnemididae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.182, 109400, 2019.

HOPKINS, W.A., Reptile toxicology: challenges and opportunities on the last frontier in vertebrate ecotoxicology, **Environ. Toxicol. Chem.**, v.19, n.2391, 2000.

HOPKINS, W.A.; WINNE, C.T., Influence of body size on swimming performance of four species of neonatal natricine snakes acutely exposed to a cholinesterase inhibiting pesticide. **Environ. Toxicol. Chem.** v.25, 1208, 2006.

HUEY, R.B. Temperature, physiology, and the ecology of reptiles. In: GANS, C., POUGH, F.H. (Eds.), **Biology of the Reptilia**. Academic Press, New York, p. 25–91, 1982.

IARC – INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **IARC Monographs, volume 112: Evaluation of five organophosphate insecticides and herbicides.** IARC, 2015.

IBAMA - O INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Relatórios de comercialização de agrotóxicos.** 2016. Disponível em:< <http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#sobreosrelatorios>> Acesso em: 20 setembro 2021.

IBAMA - O INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Manual para requerimento de avaliação ambiental: agrotóxicos e afins.** Brasília: DIQUA/ CGASQ. Brasília: Ibama, 180 p. 2009.

IBAMA - O INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Projeto Quelônios da Amazônia: 10 anos.** IBAMA, Brasília, 119 p. 1989.

ICMBio - INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume I / 1. ed. -- Brasília, DF: ICMBio/MMA, 492 p. 2018.

IGNÁCIO, N. F. **Recuperação de alevinos de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tilápia (*Oreochromis niloticus*) sobreviventes à intoxicação aguda por fipronil.** 101p.Tese (Doutorado em Biologia Aquática) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) - Jaboticabal. 2018.

IUCN - INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE. 2018. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2018-2. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org/>. Acesso em: 14 setembro 2021.

IVERSON, J. B. A revised checklist with distribution maps of the turtles of the world. Indiana: Printed Privately, Richmond, 363p. 1992.

KERAMBRUN, E.; SANCHEZ, W., HENRY, F., AMARA, R. Are biochemical biomarker responses related to physiological performance of juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) caged in a polluted harbour? **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 154, 187-195, 2011.

LATORRE, M.A.; GONZÁLEZ, E.C.L.; LARRIERA, A.; POLETTA, G. L.; SIROSKI, P, A. Effects of *in vivo* exposure to Roundup® on immune system of *Caiman latirostris*. **J Immunotoxicol**, v.10, n.4, p.349-354, 2013.

LATORRE, M.A.; ROMITO, M.L.; LARRIERA, A.; POLETTA, G.L.; SIROSKI, P.A. Total and differential white blood cell counts in *Caiman latirostris* after *in ovo* and *in vivo* exposure to insecticides. **J. Immunotoxicol**. v.13, n.6, p.903–908, 2016.

LOPES, A.; BENVINDO-SOUZA, M.; CARVALHO, W.F.; NUNES, H.F.; LIMA, P.N.; COSTA, M.S.; BENETTI, E.J.; GUERRA, V.; SABOIA-MORAIS, S.M.T.; SANTOS, C.E.; SIMÕES, K.; BASTOS, R.P.; SILVA, D.M. Evaluation of the genotoxic, mutagenic, and

histopathological hepatic effects of polyoxyethylene amine (POEA) and glyphosate on *Dendropsophus minutus* tadpoles. **Environmental Pollution**, v.289, 117911, 2021.

LÓPEZ GONZÁLEZ, E.C.; LARRIERA, A.; SIROSKI, P.A.; POLETTA, G.L. Micronuclei and other nuclear abnormalities on *Caiman latirostris* (Broad-snouted caiman) hatchlings after embryonic exposure to different pesticide formulations. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.136, p.84–91, 2017.

LOVICH, J.E.; ENNEN, J.R.; AGHA, M.; GIBBONS, J.W. Where have all the turtles gone, and why does it matter? **Bioscience**, v.68, n.10, p.771–781, 2018.

MACHADO, M. O. **Glifosato: A emergência de uma controvérsia científica global**. 315p. Tese (Doutorado Interdisciplinar em Ciências Humanas) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

MAGALHÃES, D. P.; FILHO, A. S. F. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v.12, n.3, p.355-381, 2008.

MALVASIO, A. **Aspectos do mecanismo alimentar e da biologia reprodutiva em *Podocnemes expansa* (Schweigger, 1812), *Podocnemes unifilis* (Troschel, 1848) e *P.sextuberculata* (Cornalia, 1809) (Testudines, Pelomedusidae)**. 199p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Faculdade de zoologia, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

MALVASIO, A.; SOUZA, A.M.S.; MOLINA, F.B.; SAMPAIO, F.A. Comportamento e preferencia alimentar em *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812), *P. unifilis* (Troschel, 1848) e *P. sextuberculata* (Cornalia, 1849) em cativeiro (Testudines, Pelomedusidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v.20, n.1, p.161-168, 2003.

MCCARTHY, J.F.; SHUGART, L.R. Biological Markers of Environmental Contamination. In: MC CARTHY, J.F.; SHUGART, L.R., Eds., **Biomarkers of Environmental Contamination**, Lewis Publishers, Boca Raton, 3-14, 1990.

MELO, A.G.A.G.T. **Biomarcadores ecotoxicológicos em *Poecilia vivipara* para o monitoramento de ecossistemas aquáticos**. 118p. Tese (Doutorado em Biologia Animal) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 2015.

MESTRE, A.P.; AMAVET, P.S.; VANZETTI, A.I.; MOLEON, M.S.; PARACHÚ MARC O, M.V.; POLETTA, G.L.; SIROSKI, P.A. Effects of cypermethrin (pyrethroid), glyphosate and chlorpyrifos (organophosphorus) on the endocrine and immune system of *Salvator merianae* (Argentine tegu). **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v.169, 61e67, 2019.

METCALF, L.; EDDY, H.P. **Wastewater engineering treatment in reuse**. Eds.4. McGraw Hill: Boston. 2003.

MILLER, J.L.; SHERRY, J.; PARROTT, J.; QUINN, J.S. A subchronic in situ exposure method for evaluating effects in small-bodied fish at contaminated sites. **Environmental Toxicology**, v. 29, p. 54-63, 2014.

MILLER, T.H.; NG, K. T.; BURY, S.T.; BURY, S.E.; BURY, N.R.; BARRON, L.P. Biomonitoring of pesticides, pharmaceuticals and illicit drugs in a freshwater invertebrate to estimate toxic or effect pressure. **Environment International**, v.129, p.595-606, 2019.

MINGO, V.; LEEB, C.; FAHL, A.K.; LÖTTERS, S.; BRÜHL, C.; WAGNER, N. Validating buccal swabbing as a minimal-invasive method to detect pesticide exposure in squamate reptiles. **Chemosphere**, v.229, p.529-537, 2019.

MINGO, V.; LÖTTERS, S.; WAGNER, N. The impact of land use intensity and associated pesticide applications on fitness and enzymatic activity in reptiles - A field study. **Environment International**, v.124, p.284-293, 2017.

MLADINIC, M.; BEREND, S.; VRDOLJAK, A. L.; KOPJAR, N.; RADIC, B.; ZELJEZIC, D. Evaluation of genome damage and its relation to oxidative stress induced by glyphosate in human lymphocytes in vitro. **Environmental and molecular mutagenesis**, New York, v.50, n.9, p.800-807, 2009.

MOZETO, A. A; ZAGATTO, P. A. Ecotoxicologia aquática - Princípios e Aplicações. In ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Introdução de agentes químicos no ambiente**. São Carlos: Rima Editora. p.15-38. 2006.

NIELSEN, J. B.; NIELSEN, F.; SORESEN, J. A. Defense against dermal exposures is only skin deep: significantly increased penetration through slightly damaged skin. **Archives of dermatological research**, Berlin, v.299, n.9, p.423-431. 2007.

OLIVEIRA, A.B.; HENRIQUES, M. **Guia dos produtos fitofarmacêuticos**. Lista dos produtos com venda autorizada. MADRP. DGADR, 2011.

OLIVEIRA, P.R.; BECHARA, G.H.; DENARDI, S.E.; OLIVEIRA, R.J.; MATHIAS, M.I.C. Genotoxic and mutagenic effects of fipronil on mice. **Exp Toxicol Pathol**. v.64, n.6, p.569-573, 2012.

PARK, H.; LEE, J.Y.; PARK, S.; SONG, G.; LIM, W. Developmental toxicity of fipronil in early development of zebrafish (*Danio rerio*) larvae: disrupted vascular formation with angiogenic failure and inhibited neurogenesis. **Journal of Hazardous Materials**, v.385, 121531, 2020.

PEVELING, R.; DEMBA, S. A. Toxicity and pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (Deuteromycotina, Hyphomycetes) and fipronil to the fringe-toed lizard *Acanthodactylus dumerili* (Squamata: Lacertidae). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.22, n.7, p.1437–1447, 2003.

POCHINI, K.M.; HOVERMAN, J.T. Reciprocal effects of pesticides and pathogens on amphibian hosts: The importance of exposure order and timing. **Environ Poll**. v.221, p.359-366, 2017.

PORTELLI, M. J.; BISHOP, C. A. **Ecotoxicology of organic contaminants in reptiles: a review of the concentrations and effects of organic contaminants in reptiles**. In: Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles, Sparling, D.W., LINDER, G.; BISHOP, C. A., Eds., SETAC Press, Pensacola, FL, p. 495–544, 2000.

POUGH, F. H.; ANDREWS, R. M.; CADLE, J.E.; CRUMP, M.L.; SAVITSKY, A.H.; WELLS, K. D. **Herpetology**. Eds.3. New Jersey: Pearson prentice hall.736p. 2003.

POUGH, F.H.; HEISER, J.B.; JANIS, C.M. **A vida dos vertebrados**. Eds 4. São Paulo: Atheneu Editora. 684p. 2008.

PRITCHARD, P.C.H. **Encyclopedia of Turtles**. T.F.H. Publ. Inc., Neptune, 895p. 1979.

PRITCHARD, P. C. H.; TREBBAU, P. **The Turtles of Venezuela**. Caracas: Society for Study of Amphibians and Reptiles, 403p. 1984.

QIAN, Y.; WANG, C.; WANG, J.; ZHANG, X.; ZHOU, Z.; ZHAO, M.; LU, C. Fipronil-induced enantioselective developmental toxicity to zebrafish embryo-larvae involves changes in DNA methylation. **Scientific Reports**, v.7, n.1, 2017.

RATRA, G. S.; CASIDA, J. E. GABA receptor subunit composition relative to insecticide potency and selectivity. **Toxicol. Lett.** v.122, p.215-222, 2001.

RIBEIRO, J. C. J.; GUSMÃO, L. C., CUSTÓDIO, M. M. Segurança alimentar e agrotóxicos: A situação do glifosato perante o princípio da precaução. **Veredas do Direito**, Belo Horizonte, v.15, n.31, p. 95-125, 2018.

RICH, C.N.; TALENT, L.G. Soil ingestion may be an important route for the uptake of contaminants by some reptiles. **Environ. Toxicol. Chem.** v.28, p.311–315, 2009.

RYAN, P.B; BURKE, T.A.; COHEN HUBAL, E.A.; CURA, J.J.; MCKONE, T.E. Using biomarkers to inform cumulative risk assessment. **Environmental Health Perspectives**, v.155, n.5, p. 833-840, 2007.

ROBERTS, JR.; REIGART, JR. **Recognition and management of pesticide poisonings**. 6 ed. Washington: USEPA. 227p. 2013.

ROCHA, B. B. S. **Diversidade Genética da Tartaruga da Amazônia (*Podocnemis expansa* Schweigger, 1812) na Bacia Hidrográfica Tocantins-Araguaia**. Iniciação Científica - PIBIC/ICMBio, Ministério do Meio Ambiente Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Répteis e Anfíbios, Brasília, 2011.

ROMÉO, M., GIAMBÉRINI, L., 2012. History of Biomarkers. Ecological Biomarkers: Indicators of Ecotoxicological Effects, v.15, 2012.

RUEDA-ALMONACID, J. V.; CARR, J.L.; MITTERMEIER, R.A.; RODRÍGUEZ-MAHECHA, J.V.; MAST, R.B.; VOGT, R.C.; RHODIN, A.G.J.; OSSA-VELÁSQUEZ, J.A.; RUEDA, J.N.; MITTERMEIER, C.G. **Las tortugas y los cocodrilianos de los países andinos del trópico**. Bogotá: Editorial Panamericana, Formas e Impresos, 538 p. 2007.

SAKA, M.; TADA, N. Acute and chronic toxicity tests of systemic insecticides, four neonicotinoids and fipronil, using the tadpoles of the western clawed frog *Silurana tropicalis*. **Chemosphere**, v.270, 129418, 2021.

SALERA JUNIOR, G.; MALVASIO, A.; PORTELINHA, T. C.G. Evaluation of predation in *Podocnemis expansa* and *Podocnemis unifilis* (Testudines, Podocnemididae) in the Javaés River, Tocantins. **Acta Amazonica**. v.39, n.1, p.207 – 214, 2009.

SANTOS, A.T. **Exposição aguda e crônica de fipronil em girinos de rã touro (*Lithobates catesbeianus*): efeitos genotóxicos e morfológicos**. 91p. Tese (Doutorado em Biologia Animal) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, 2021.

SANTOS, A.T.; VALVERDE, B.S.L.; DE OLIVEIRA, C.; FRANCO-BELUSSI, L. Genotoxic and melanin alterations in *Lithobates catesbeianus* (anura) tadpoles exposed to fipronil insecticide. **Environmental Science and Pollution Research**, v.28. n.16, p.20072–20081, 2021.

SANTOS, C.F.M.; FIORI, M.M. Turtles, indians and settlers: *Podocnemis expansa* exploitation and the Portuguese settlement in eighteenth-century Amazonia, **Topoi** (Rio J.), v.21, n.44, p.350-373, 2020.

SCHAUMBURG, L.G.; SIROSKI, P.A.; POLETTA, G.L.; MUDRY, M.D. Genotoxicity induced by Roundup® (Glyphosate) in tegu lizard (*Salvator merianae*) embryos. **Pesticide biochemistry and physiology**, v.130, p.71-78, 2016.

SCORZA JUNIOR, R. P.; FRANCO, A. A. A temperatura e umidade na degradação de fipronil em dois solos de Mato Grosso do Sul. **Cienc. Rural**, v.43, n.7, p.1203-1209, 2013.

SILVA, A.C.A. **Biomarcadores de Contaminação Ambiental**. 72p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêutica) - Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2016.

SILVA, D. C. V. R. A.; POMPÊO, M.; PAIVA, T.C.B. Ecotoxicologia no contexto atual no Brasil. In: POMPÊO, M.; MOSCHINI-CARLOS, V.; NISHIMURA.; P.U SILVA, S.C DOVAL, J.C.L. **Ecologia de reservatórios e interfaces**. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo p. 460, 2015.

SIMON-DELISO, N.; AMARAL-ROGERS, V.; BELZUNCES, L.P.; BONMATIN, J.M.; CHAGNON, M.; DOWNS, C.; FURLAN, L.; GIBBONS, D.W.; GIORIO, C.; GIROLAMI, V.; GOULSON, D.; KREUTZWEISER, D.P.; KRUPKE, C.H.; LIESS, M.; LONG, E.; MCFIELD, M.; MINEAU, P.; MITCHELL, E.A.D.; MORRISSEY, C.A.; NOOME, D.A.; PISA, L.; SETTELE, J.; STARK, J. D.; TAPPARO, A.; VAN DYCK, H.; VAN PRAAGH, J.; VAN DER SLUIJS, J.P.; WHITEHORN P.R.; WIEMERS M. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. **Environ Sci Pollut Res Int**. v. 22, n.1, p. 5-34, 2015.

SLAGER, R. E.; SIMPSON, S. L.; LEVAN, T. D.; POOLE, J. A.; SANDLER, D. P.; HOPPIN, J. A. Rhinitis associated with pesticide use among private pesticide applicators in the agricultural health study. **Journal of toxicology and environmental health. Part A**, Washington, v.73, n.20, p.1382-1393, 2010.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA. **Lista brasileira de répteis**. Herpetologia Brasileira, v.3, n.3, 2014. Disponível em: <

<http://www.sbherpetologia.org.br/images/LISTAS/2014.03-07-MudancasTaxonomicas.pdf>>. Acesso em: 22 setembro 2021.

SOGORB, M. A.; PAMIES, D.; DE LAPUENTE, J.; ESTEVAN, C.; ESTÉVEZ, J.; VILANOVA, E. An integrated approach for detecting embryotoxicity and developmental toxicity of environmental contaminants using in vitro alternative methods, **Toxicology Letters**, v.230, p. 356-367, 2014.

SOLTANIAN, S. Effect of atrazine on immunocompetence of red-eared slider turtle (*Trachemys scripta*). **J. Immunotoxicol.** v.13,n.6, p. 804-809, 2016.

SOUTHWOOD, A.; AVENS, L. Physiological, behavioral, and ecological aspects of migration in reptiles. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 180, n.1, p. 1–23, 2010.

SPARLING, D.W.; LINDER, G.; BISHOP, C.A.; KREST, S. **Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles**. Eds.2. Taylor and Francis, Hoboken. 2010.

SZEPANOWSKI, F.; SZEPANOWSKI, L.P.; MAUSBERG, A. K.; ALBRECHT, P.; KLEINSCHNITZ, C.; KIESEIER, B. C.; STETTNER, M. Differential impact of pure glyphosate and glyphosate-based herbicide in a model of peripheral nervous system myelination. **Acta Neuropathologica**, v.136, p.979–982, 2018.

TINGLE, C.C.; ROTHER, J.A.; DEWHURST, C.F.; LAUER, S.; KING, W.J. Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. **Rev Environ Contam Toxicol**, v.176, p.1-66, 2003.

TODD, B.D.; WILLSON, J.D.; GIBBONS, J.W. **The global status of reptiles and causes of their decline**. In: SPARLING, D.W., LINDER, G., BISHOP, C.A., KREST, S. (Eds.), *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles*, Eds 2. Taylor and Francis, Hoboken, p.47–67, 2010.

VALDES, S. A. C. Avaliação da exposição a agrotóxicos em aves silvestres de vida livre. In: VON MATTER, S.; STRAUBE, F. C.; ACCORDI, I.; PIACENTINI, V.; CÂNDIDO-JR, J. F. **Ornitologia e conservação: ciência aplicada, técnicas de pesquisa e levantamento**. Rio de Janeiro: Technical Books Editora, p.429-439, 2010.

VALDES, S. A. C.; VIEIRA, L. G. ; FERREIRA, C. H.; MENDONÇA, J. S. ; RIBEIRO, P. R. Q.; FERNANDES, E. A.; SANTOS, A. L.Q. Effects of Exposure to Methyl Parathion on Egg Hatchability and Eggshell Chemical Composition in *Podocnemis expansa* (Testudines, Podocnemididae). **Zoological Science**, v.32, p.135-140, 2015.

VAN BRUGGEN, A. H. C.; HE, M. M.; SHIN, K.; MAI, V.; JEONG, K. C.; FINCKH, M. R.; MORRIS JR, J. G. Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. **Science of the Total Environment**, v.616, p. 255-268, 2018.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, p. 57-149, 2003.

VAN DER OOST, R.; PORTE-VISA, C.; VAN DEN BRINK, N. Biomarkers in environmental assessment. **Ecotoxicological testing of marine and freshwater ecosystems**. Taylor & Francis, p. 87-152. 2005.

VAN DER SLUIJS, J. P.; AMARAL-ROGERS, V.; BELZUNCES, L. P.; BIJLEVELD VAN LEXMOND, BONMATIN, J.M.; CHAGNON, M.; DOWNS, C. A.; FURLAN, L.; GIBBONS, D. W.; GIORIO, C.; GIROLAMI, V.; GOULSON, D.; KREUTZWEISER, D.P.; KRUPKE, C.; LIESS, M., LONG, E.; MCFIELD, M.; MINEAU, P.; MITCHELL, E. A. D.; MORRISSEY, C. A.; NOOME, D. A.; PISA, L.; SETTELE, J.; SIMON-DELISO, N.; STARK, J. D.; TAPPARO, A., VAN DYCK, H.; VAN PRAAGH, J.; WHITEHORN, P. R.; WIEMERS, M. Conclusions of the Worldwide Integrated Assessment on the risks of neonicotinoids and fipronil to biodiversity and ecosystem functioning. **Environmental Science and Pollution Research**, v.22, n.1, p.148–154, 2014.

VANZOLINI, P.E. Notes on the nesting behavior of *Podocnemis expansa* in the Amazon Valley (Testudines, Pelomedusidae). **Papéis avulsos de zoologia**, São Paulo, v.20, n.17, p.191-215, 1967.

VOGT, R.C. **Tartarugas da Amazônia**. Lima, Peru: Gráfica Biblos.104p. 2008.

VOGT, R.C.; FAGUNDES, C.K.; BATAUS, Y.S.L.; BALESTRA, R. A.M.; BATISTA, F.R.W.; UHLIG, V.M.; SILVEIRA, A.L.; BAGER, A.; BATISTELLA, A.M.; SOUZA, F.L.; DRUMMOND, G.M.; REIS, I.J.; BERNHARD, R.; MENDONÇA, S.H.S.T.; LUZ, V.L.F. **Avaliação do Risco de Extinção de *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) no Brasil**. Processo de avaliação do risco de extinção da fauna brasileira. ICMBio. 2015. Disponível em: <<https://www.icmbio.gov.br/portal/faunabrasileira/estado-de-conservacao/7431-repteis-podocnemis-expansa-tartaruga-da-amazonia2>>. Acesso em: 13 setembro 2021.

WALKER, C.H.; SIBLY, R.M.; HOPKIN, S.P.; PEAKALL, D.B. **Principles of ecotoxicology**. Eds 4. New York: CRC Press, 2012.

WEIR, S.M.; TALENT, L.G.; ANDERSON, T.A.; SALICE, C.J. Unraveling the relative importance of oral and dermal contaminant exposure in reptiles: insights from studies using the western fence lizard (*Sceloporus occidentalis*). **PLoS One**, v 9, e99666. 2014.

WHO- WORLD HEALTH ORGANIZATION. International Programme on Chemical Safety (IPCS) – Environmental Health Criteria 155: Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. Geneva. 1993.

WHO- WORLD HEALTH ORGANIZATION. The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification, 71, 2009.

WHO- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Pesticide residues in food-2016**: toxicological evaluations / Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group on Pesticide Residues, Geneva, Switzerland, p. 9–13, 2017.

ZANARDI, E.; BÍCEGO, M.C.; WEBER, R.R. Dissolved/dispersed petroleum aromatic hydrocarbons in the São Sebastião Channel, São Paulo, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v.38, p. 410-413, 1999.

ZHANG, L.; CHEN, L.; MENG, Z.; ZHANG, W.; XU, X.; WANG, Z.; QUIN, Y.; DENG, Y.; LIU, R.; ZHOU, Z.; DIAO, J. Bioaccumulation, behavior changes and physiological disruptions with gender-dependent in lizards (*Eremias argus*) after exposure to glufosinate-ammonium and l-glufosinate-ammonium. **Chemosphere**, v.226, p.817–824, 2019.

ZHANG, W.; JIANG, F.; OU, J. Global pesticide consumption and pollution: with China as a focus. **Proc Int Acad Ecol Environ Sci**, v.1, n.2, p.125–144, 2011.

ZHANG, W. Global pesticide use: Profile, trend, cost/benefit and more. **Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences**, v.8, n.1, p.1-27, 2018.

Capítulo 2 - Delineamento experimental

Foram adotadas as seguintes metodologias para todos os experimentos realizados nesta presente tese:

2.1. Coleta dos ovos

Em outubro dos anos de 2018 e 2019, cento e sessenta e um (161) e quarenta e nove (n=49) ovos de *P. expansa*, respectivamente, foram coletados no mesmo dia de diferentes praias de nidificação. A coleta ocorreu em praias arenosas previamente mapeadas ao longo das margens do rio Araguaia, na Área de Proteção Ambiental Meandros do Rio Araguaia (GO, Brasil) (13° 20' 38" S e 50° 38' 05" W). Essa área apresenta alta oxigenação, pH ligeiramente ácido, baixas concentrações de coliformes termotolerantes, turbidez e baixos teores de carbono orgânico total, nitrogênio e fósforo total (MUNIZ et al., 2020). Os ovos, oriundos do mesmo dia de postura, foram retirados dos ninhos e acondicionados para transporte, no mesmo dia de coleta, em caixas de papelão forradas com sacos plásticos contendo vermiculita umedecida com água na proporção de 2:1. Os ovos foram levados ao Laboratório de Ensino e Pesquisa de Animais Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (UFU, MG, Brasil) para incubação artificial (Figura 2-1). Todos os procedimentos foram autorizados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da UFU sob o registro n. 039/18 e pelo Sistema de Autorização e Informações sobre Biodiversidade (SISBIO-IBAMA), licença nº 65167-1/2018.

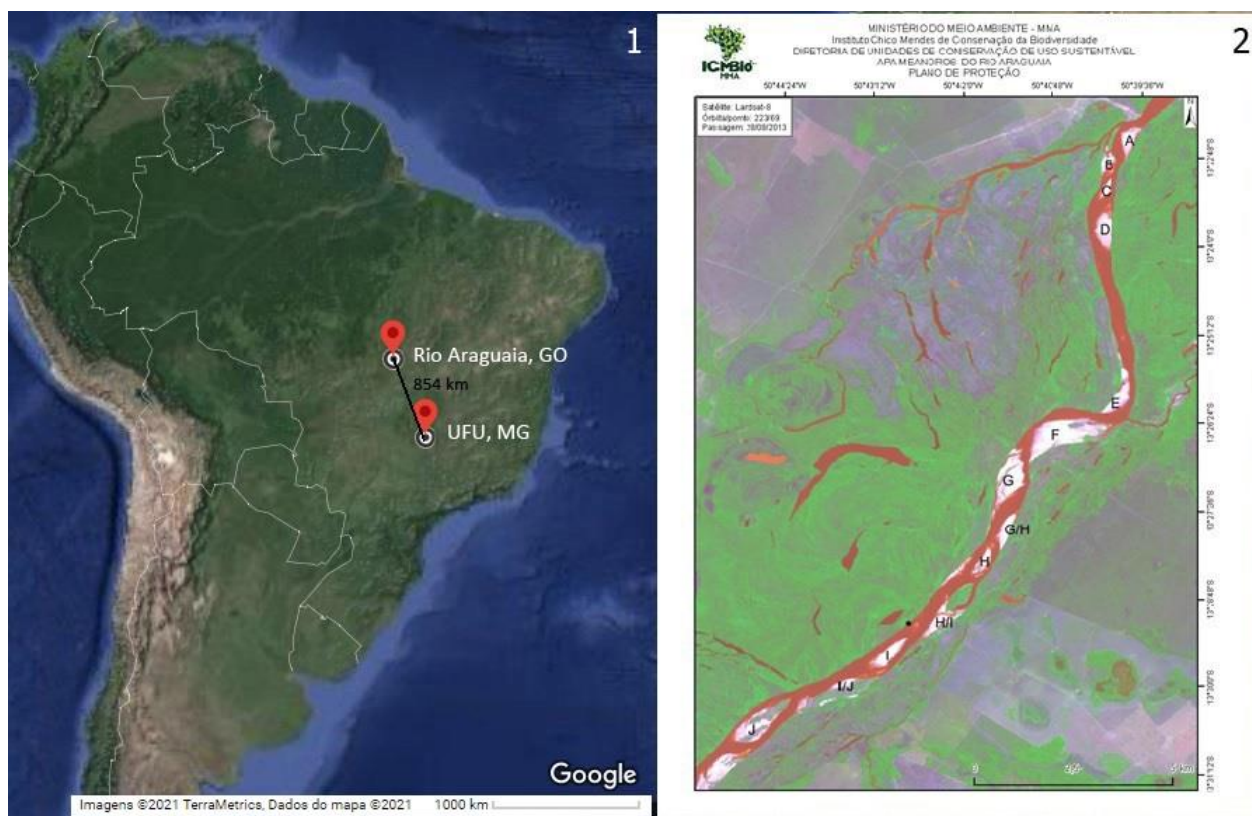


Figura 2-1: Área de reprodução de *Podocnemis expansa*. 1- Em destaque a localização do Rio Araguaia, GO e da Universidade Federal de Uberlândia (UFU, MG), onde os ovos foram coletados e incubados, respectivamente. Distância entre os pontos de 854km. 2 - Área de Proteção Ambiental Meandros do Rio Araguaia, e identificadas por letras, as praias de nidificação da espécie. Fonte: Foto de satélite (GOOGLE) e ICMBio/MMA, Brasil, 2021.

2.2. Incubação dos ovos

Após a chegada ao laboratório, 24 horas após sua coleta, os ovos foram distribuídos aleatoriamente em bandejas plásticas (30 x 50 cm; 10 cm de profundidade) com aproximadamente 2kg de areia do local de coleta dos ovos, sendo 23 ovos por tratamento. Este número de ovos é justificado por possíveis perdas por infertilidade e prováveis “ovos de óleo” (CAUT et al., 2006). As bandejas foram então transferidas para incubadoras de isopor de 90L confeccionadas sob medida, equipadas com dois termostatos controlados por lâmpadas de 15W (Lumens 80LM). A temperatura e a umidade relativa das incubadoras foram avaliadas diariamente com um termohigrômetro digital e mantidas entre 28°C e 31°C e 80 e 100%, respectivamente (VERDADE et al., 1992). A incubação foi conduzida em diferentes câmaras de incubação sob diferentes tratamentos.

2.3. Protocolo experimental

Os produtos formulados Glifosato Atar 48® (Albaugh Agro Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil) e Fipronil Regent® 800WG (BASF S.A., São Paulo, SP, Brasil) foram utilizados para a contaminação do substrato de incubação dos ovos. Os agrotóxicos foram diluídos em água destilada e incorporados ao substrato pulverizando-o com aproximadamente 100mL da solução a cada três dias. Essa exposição constante aos pesticidas teve como objetivo simular a contaminação da água por escoamento agrícola, independente dos efeitos residuais. Sendo assim, não foram determinados os níveis exatos de pesticidas no substrato de incubação.

Duas concentrações de glifosato Atar 48 - 65µg/L (G1) e 6500µg/L (G2) - e de fipronil Regent 800WG - 4µg/L (F1) e 400µg/L (F2) foram utilizadas, assim como a combinação entre os dois agrotóxicos formulados em duas concentração: glifosato 65µg/L + fipronil 4µg/L (GF1) e glifosato 6500µg/L + fipronil 400µg/L (GF2). Essa combinação foi utilizada para analisar potenciais efeitos sinérgicos, a fim de simular corpos d'água contendo mais de um desses agroquímicos. Para o grupo controle, o substrato foi umedecido apenas com água destilada em mesmo volume dos grupos tratados. Ao final do experimento, infere-se que as concentrações dos agrotóxicos aumentaram gradativamente sendo estas próximas a 48,75 e 4875,00µg/Kg de areia para o glifosato e de 3 e 300µg/Kg para o fipronil (menores e maiores concentração, respectivamente) uma vez que a meia vida desses agrotóxicos em solo arenoso é em média de 26,7 para o glifosato 32 dias para o fipronil (BERGSTRÖM et al., 2011; MANDAL e SINGH, 2013).

A menor concentração de glifosato foi determinada de acordo com a Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) nº 357/2005 que estabelece o valor máximo de contaminação em águas doce de Classe I. A menor concentração de fipronil testada foi selecionada de acordo com os valores de concentração letal média (CL₅₀) disponíveis para diferentes espécies de peixes (USEPA, 1996; MANRIQUE e MACHADO NETO, 2008; CELLA, 2009), uma vez que não são conhecidos valores de referência para répteis e nem limites de detecção desse composto estabelecido na legislação brasileira. Esse limite máximo é ecologicamente relevante, pois estudos prévios demonstraram que em águas superficiais, concentrações muito superiores são identificadas, as quais já são capazes de induzirem efeitos toxicológicos na biota (CARLES et al., 2019). As concentrações máximas de glifosato e fipronil foram determinadas com o intuito de simular uma alta poluição e representam uma concentração 100 vezes maior do que aquela prevista na resolução CONAMA nº 357/2005. Dessa forma, optou-se por simular dois cenários: um otimista com as menores concentrações, e outro altamente pessimista, que seriam próximas a áreas agrícolas.

2.4. Referências

- BERGSTRÖM, L.; BORJESSON, E.; STENSTROM, J. Laboratory and lysimeter studies of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in a sand and a clay soil. **J Environ Qual.**, v. 40, p. 98–108, 2011.
- CARLES, L.; GARDON, H.; JOSEPH, L.; SANCHÍS, J.; FARRÉ, M.; ARTIGAS, J. Meta-analysis of glyphosate contamination in surface waters and dissipation by biofilms. **Environment International.** v. 124, p. 284–293, 2019.
- CAUT, S.; GUIRLET, E.; JOUQUET, P.; GI-RONDOT, M. Influence of nest location and yolkless eggs on the hatchling success of leatherback turtle clutches in French Guiana. **Can. J. Zool.** v. 84, p. 908-915, 2006.
- CELLA, A.L. **Ecotoxicologia do agrotóxico fipronil em pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg) e paulistinha (*Danio rerio*) e resíduos de agrotóxicos na bacia do rio Corumbataí.** 93p. Tese de doutorado em Química na Agricultura e no Ambiente – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, 2009.
- MANDAL, K.; SINGH, B. Persistence of fipronil and its metabolites in sandy loam and clay loam soils under laboratory conditions. **Chemosphere.** v. 91, p. 1596–1603, 2013.
- MANRIQUE, W. G., MACHADO NETO, J. G. Toxicidad aguda y riesgo ambiental del fipronil para el guppy (*Poecilia reticulata*). **The Biologist.** v. 6, p. 85-93, 2008.
- MUNIZ, D.H.F.; SANTANA, M.L.C.; OLIVEIRA-FILHO, E.C. Avaliação da qualidade da água e condições de balneabilidade no Médio Rio Araguaia. **Journal of Social, Technological and Environmental Science.** v. 9, n. 2, p. 308-327, 2020.
- USEPA - U.S. Environmental Protection Agency, New Pesticide Fact Sheet. PB96-181516.EPA737-F-96-005. U.S. EPA Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, p. 1-10, 1996.
- VERDADE, L.M.; MICHELOTTI, F.; RANGEL, M.C.; CULLEN JR., L.; ERNANDES, M.M.; LAVORENTI, A. **Manejo dos ovos de jacare-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*). In: Workshop Sobre Conservacao e Manejo do Jacare-De-Papo-Amarelo.** CIZBAS/ESALQ/USP, São Paulo, p. 92–99, 1992.

Capítulo 3 - Exposição *in ovo* a formulações comerciais de glifosato e fipronil retarda o crescimento e altera o desenvolvimento ósseo de embriões de Tartarugas-da-Amazônia (*Podocnemis expansa*, Testudines)

Resumo:

Os agrotóxicos são amplamente utilizados na produção agrícola e podem afetar direta/indiretamente tanto a flora, quanto a fauna. Entre os animais, os organismos aquáticos, incluindo os répteis, são especialmente susceptíveis aos efeitos das contaminações. Nesse contexto, objetivou-se testar a hipótese de que a incubação de ovos de *Podocnemis expansa* em substrato contendo glifosato e fipronil altera a viabilidade dos ovos, interfere no crescimento dos animais e induz malformações ósseas. Para isso, ovos coletados no ambiente natural foram incubados artificialmente em areia umedecida com água contendo glifosato Atar 48 nas concentrações de 65µg/L (G1) ou 6500µg/L (G2) e fipronil Regent 800WG a 4µg/L (F1) ou 400µg/L (F2), ou a associação de ambos os pesticidas. A exposição combinada se deu a partir de 65µg/L de glifosato e 4µg/L de fipronil (GF1) e 6500µg/L de glifosato com 400µg/L de fipronil (GF2). Os resultados do presente estudo demonstram que a exposição aos agrotóxicos testados, isoladamente ou em combinação, não afetou a viabilidade dos ovos. No entanto, os embriões dos grupos tratados apresentaram menor biomassa corporal e retardo no desenvolvimento. Além disso, malformações ósseas no anel ossicular escleral identificadas em embriões amostrados no 44º dia de incubação também foram observadas em indivíduos expostos a F1, F2 e ao GF1. Logo, isso sugere que os agrotóxicos testados interferem negativamente na organogênese do modelo estudado. Em conclusão, o presente estudo confirma a hipótese de que a incubação dos ovos em substrato poluído com glifosato e fipronil interfere no crescimento embrionário de *P. expansa*, bem como induz malformações ósseas, o que reforça o potencial risco ecotoxicológico dos agrotóxicos sobre a biologia da espécie estudada.

Palavras-Chave: Agrotóxico, Ecotoxicologia, Malformações, Répteis, Ontogenia.

3.1. Introdução

O Brasil é o país líder no consumo de agrotóxicos e está, juntamente com China, Estados Unidos e União Europeia, entre os maiores fabricantes de pesticidas agrícolas do mundo (Zhang, 2018; Faber, 2020). Em 2020, o Ministério da Agricultura do Brasil aprovou o registro de 493 agrotóxicos anteriormente não certificados, o maior número já documentado

pelo Ministério da Agricultura (Diário Oficial da União, 2021). Esse volume é 4% superior ao do ano de 2019, quando foram liberados 474 pesticidas, um recorde até então (Diário Oficial da União, 2019).

Grande parte dos agrotóxicos utilizados no Brasil são direcionados à agricultura, onde desempenham um papel crucial na melhoria da produção e produtividade agrícola (Fernandes et al., 2020). No entanto, de acordo com estimativas globais, apenas 1% do volume aplicado atinge o organismos-alvo, sendo que os 99% restantes permanecem no solo, atmosfera, água, sendo eventualmente absorvido por organismos não-alvo (Zhang et al. 2011; Lima et al., 2019).

Animais terrestres e aquáticos podem ser expostos aos agrotóxicos de diferentes maneiras, seja por meio de contato com aerossóis durante a aplicação em lavouras (Chambers e Carr, 1995), ingestão (Rich e Talent, 2009) ou pela exposição direta ao solo contaminado. Em organismos aquáticos, a exposição aos agrotóxicos pode ocorrer pela dispersão dos produtos na água (Lind et al., 2004). Contudo, alguns grupos, como os répteis aquáticos, a exposição também pode ocorrer via solo ou bancos de areia contaminados, uma vez que muitas espécies depositam seus ovos em substratos terrestres, especialmente nas margens de rios ou praias (Ji et al., 2016; Hirano et al., 2019). Isso é particularmente preocupante por três razões principais: 1) as cascas de ovos de répteis são notoriamente permeáveis (Marco et al., 2004; Valdes et al., 2015); 2) o tempo de incubação pode ser bastante dilatado, estendendo o tempo de exposição (Gomes e Ferreira Júnior, 2011; Magalhães, 2017), e 3) o desenvolvimento embrionário é um período muito sensível às perturbações físico-químicas (Bell et al., 2003; Packard et al., 2000), que podem interferir deletariamente na viabilidade e organogênese do organismo.

O glifosato e o fipronil se destacam entre os agrotóxicos mais utilizados no Brasil e no mundo (Simon-Delso et al., 2015; Beckie et al., 2020). Ambos têm sido associados à malformações viscerais e esqueléticas e alterações moleculares em diferentes espécies animais. O glifosato é capaz, por exemplo, de causar distúrbios comportamentais e morfológicos em *Danio rerio* (0,065 e 0,5mg/L - Bridi et al., 2017), malformações craniofaciais e oculares em *Xenopus laevis* (5mg/L - Bonfanti et al., 2018), danos ao DNA de *Salvator merianae* (100µg/ovo - Schaumburg et al. 2016) e estresse oxidativo em *Trachemys scripta elegans* (30mg/L - Héritier et al., 2017). Já o fipronil promove aumento da mortalidade e redução na taxa de eclodibilidade e comprimento corporal em *D. rerio* (2,5, 7,5 e 15mg/L - Park et al.2020), efeitos teratogênicos e mortalidade em *Silurana tropicalis* (0,35-3,50 mg/L – Saka e Tada, 2021), alterações genotóxicas e melânicas em *Lithobates catesbeianus* (0,04,

0,08, 0,4mg/L – Santos et al., 2021) e redução da atividade alimentar, peso corporal e da proporção fígado e/ou gordura corporal de *Acanthodactylus dumerili* (30µg/g de peso corporal - Peveling e Demba, 2003).

Grande parte dos estudos que investigam o impacto dos agrotóxicos em ecossistemas aquáticos têm se concentrado principalmente em pesticidas individuais (Muturi et al., 2017). Habitats aquáticos, no entanto, costumam estar embutidos dentro e ao redor de terras agrícolas e são frequentemente expostos a vários diferentes pesticidas que podem coexistir no meio ambiente (Muturi et al., 2017; Hirano et al., 2019). De acordo com Mansano (2020), interações entre os componentes de uma mistura pode levar a efeitos aditivos ou causar maior (sinergismo) ou menor toxicidade (antagonismo) para os organismos. Estudos com combinação de agrotóxicos, como os herbicida glifosato e atrazina já constataram modificações reprodutivas em peixes marinhos (1-100µg/L, expostos por 42 dias - Le Mer et al., 2013) e misturas de herbicidas (atrazina, glifosato) e inseticidas (malatião, carbaril, permetrina) induziram mudanças na diversidade e na estrutura da comunidade microbiana (20 mg/L expostos 3 e 7 dias - Muturi et al., 2017). Em estudo com répteis, a associação de herbicidas ocasionou aumento de malformações embrionárias em *P. unifilis* com exposição ao glifosato e atrazina (65 ou 6500µg/L e/ou 2 ou 200µg/L, respectivamente -Hirano et al., 2019).

Com exceção do estudo de De-Oliveira et al. (2020), no qual foi relatado alterações na morfometria eritrocitária em juvenis expostos *in ovo* à diferentes concentrações de glifosato, atrazina e fipronil, pouco se sabe sobre os efeitos do glifosato e fipronil em outras espécies de testudíneos, tais como *Podocnemis expansa*. A referida espécie é também conhecida popularmente como tartaruga-amazônica e apresenta-se distribuídas em baías de grandes rios, como os das bacias do Amazonas, Araguaia e Tocantins (IUCN, 2011). É o maior Testudines de água doce da América do Sul e é classificada como espécie quase ameaçada de extinção pelo Ministério do Meio Ambiente brasileiro devido à predação humana e à instalação de bacias hidrográficas, que levam ao seu declínio populacional (Vogt et al., 2015). Assim, visando expandir o conhecimento sobre os fatores que podem afetar a saúde desses animais, objetivou-se investigar os impactos biológicos advindos da exposição *in ovo* de embriões de *P. expansa* incubados em substrato contendo diferentes concentrações de glifosato e fipronil. Supõe-se que tais agrotóxicos alteram a viabilidade dos ovos, interferem no crescimento dos animais (inferido pelo aumento da biomassa corpórea), bem como induz malformações embrionárias.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Coleta de materiais biológicos

O dia 0 (zero) foi considerado a partir da colocação dos ovos nas incubadoras. As coletas de todos os embriões foram realizadas no 44º dia de incubação, quando apenas o grupo controle iniciou a eclosão. Os demais grupos que foram expostos aos agrotóxicos apresentaram atraso em sua eclosão. Os embriões foram eutanasiados com sobredose de tiopental sódico (Thiopentax®, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Itapira, SP, Brasil), administrado por via intracelomática (CONCEA, 2018). Após a eutanásia, os embriões foram preservados em formaldeído 3,7%.

3.2.2. Viabilidade dos ovos e massa corpórea dos embriões

O número de ovos contendo embriões foi contabilizado para todos os tratamentos aos 44 dias de incubação. Com estes dados foi calculado a porcentagem de viabilidade dos ovos, definido como a razão entre o número de embriões e o número total de ovos em cada incubadora, sendo descartados os ovos não fecundados e atrésicos (ovos fecundados, mas sem desenvolvimento) (modificado de Simoncini et al., 2019). A massa corporal dos embriões foi determinada nesta mesma ocasião por meio de indivíduos viáveis com a utilização de balança com precisão de 1g.

3.2.3. Análise morfológica de cartilagem e osso

Para análise do desenvolvimento do esqueleto e a ocorrência de malformações, 16 embriões de cada grupo experimental, selecionados aleatoriamente, foram submetidos à diafanização por hidróxido de potássio (KOH), seguido por coloração de osso e cartilagem com Alizarina red S e Alcian blue, respectivamente (Davis e Gore, 1936; Dingerkus e Uhler, 1977). A terminologia adotada foi de acordo com Franz-Odenaal (2020) para os ossículos esclerais, e Vieira (2008) para as estruturas esqueléticas.

O desenvolvimento do esqueleto após a diafanização foi avaliado por meio dos parâmetros descritos por Lorke (1977), adaptados para Testudines, que consistem em investigar as seguintes malformações: ausência de ossos ou partes deles; encurtamento, flexões, torções e ondulação óssea; fendas ou formação de estruturas extras; e alterações no anel ossicular, como ausência, formato irregular, ossículo rudimentar e fusão dos ossículos (Figura 3-1). Adicionalmente, quanto ao atraso no processo de ossificação, analisou-se: ausência de centros de ossificação em elementos do esqueleto; formato e tamanho dos ossos

que correspondem a um estágio anterior de desenvolvimento; e a presença de fontanelas mais extensas e incompletas dos ossos do crânio, carapaça e plastrão.

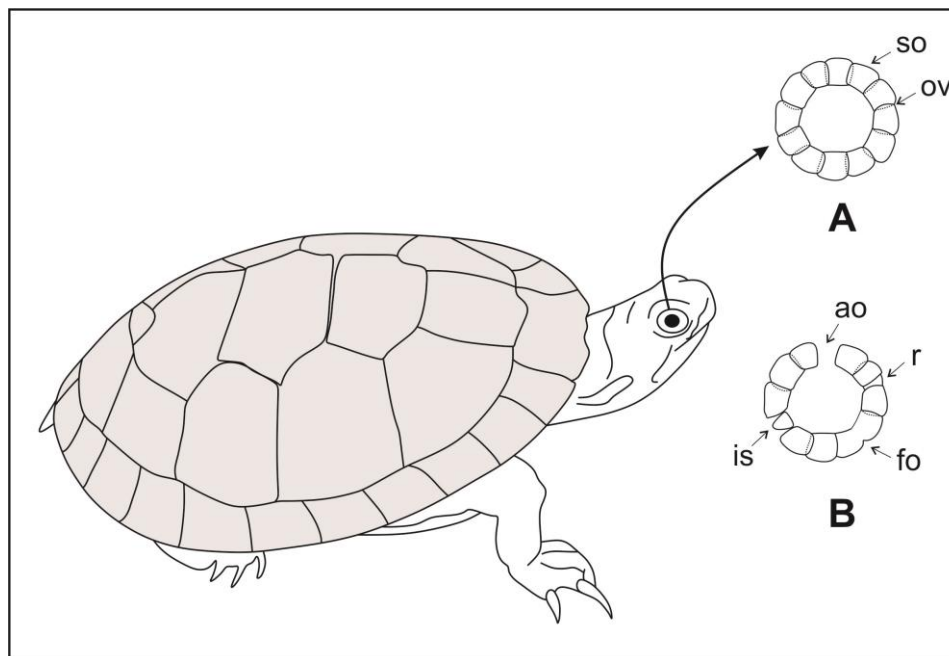


Figura 3-1: Imagem esquemática do anel ossicular escleral de Testudines: A) Anel ossicular escleral formado por vários ossículos da esclera (so) com suas bordas sobrepostas (ov) aos ossículos adjacentes. B) Anel ossicular com presença de malformações de ausência de ossículo (ao), formato irregular (is), fusão de ossículos (fo) e ossículo rudimentar (r).

3.2.4. Técnica histológica

Os ossículos da esclera foram coletados e fixados em formaldeído 10% tamponado com fosfato (0,1M, pH 7,2) por 24 h, seguido da adição em álcool 70%, após o que foram submetidos ao processo de inclusão em parafina. A seguir, os blocos foram cortados frontalmente (5µm de espessura), depositados em lâminas microscópicas e corados com hematoxilina e eosina para avaliação de possíveis alterações ósseas, seguindo o protocolo descrito por Behmer et al. (1976). Os cortes foram analisados em microscopia óptica e fotografados com o auxílio do software Leica Las EZ (versão n. 3.4.0).

3.2.5. Análise estatística

A viabilidade dos ovos foi analisada por meio da proporção esperada observada no grupo controle pelo teste binomial para duas proporções, utilizando o software Bioestat 5.3 (Ayres et al., 2007). A comparação entre as biomassas corpóreas e frequência média de malformações nos ossículos da esclera dos diferentes grupos foram realizadas utilizando o teste Kolmogorov-Smirnov para analisar a normalidade dos dados, em sequência o teste não

paramétrico de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn, por meio do software SYSTAT 10.2 (Wilkinson, 1990). Para todas as análises, as diferenças foram consideradas significativas ao nível de 5% de significância. A confecção das figuras foi realizada por meio do software CorelDraw 2018 (64-Bit) e os gráficos foram traçados no Microsoft Excel 2013.

3.3. Resultados e Discussão

3.3.1. Impacto do fipronil e glifosato na viabilidade dos ovos e biomassa corpórea dos indivíduos de *P. expansa*.

3.3.1.1. Viabilidade dos ovos

As primeiras eclosões de *P. expansa* ocorreram no grupo controle no 44º dia de incubação, sendo a duração da incubação um pouco menor que os 47 a 64 dias relatados para a espécie em ambiente natural (Gomes e Ferreira Júnior, 2011; Magalhães, 2017; Simoncini et al., 2019). Outros trabalhos relataram um período de incubação de 51 à 63 dias para ovos de *P. expansa* expostos a parationa metílica (35, 350 e 3500µg/L- Valdes et al. 2015), atrazina (2 e 20µg/L- Carneiro et al. 2019), e glifosato, atrazina e fipronil (65 e 6500µg/L; 2 e 200µg/L; 4 e 400µg/L, respectivamente- De-Oliveira et al. 2020). Essa variação provavelmente reflete diferenças na temperatura de incubação entre os diferentes estudos, uma vez que o desenvolvimento embrionário em répteis é altamente influenciado pela temperatura (Deeming e Ferguson, 1988; Carneiro 2012). Neste estudo, todos os ovos foram coletados no dia da postura nas praias de desova. Além disso, a temperatura de todos os tratamentos foi verificada diariamente e permaneceu em média $30 \pm 0,06^{\circ}\text{C}$ (média $\pm$ erro padrão da média).

A média de ovos viáveis por tratamento foi de $86 \pm 0,03\%$ (média $\pm$ erro padrão da média), com variação de 100% para G1 a 69,6% em relação ao grupo F2 (Figura 3-2). Não houve diferença estatística entre os grupos tratados (mid-p-value = 0,37), portanto a exposição aos agrotóxicos não afetou o número de embriões desenvolvidos. Apesar do experimento ter sido realizado com os embriões, acredita-se que a média de ovos viáveis seria similar a taxa de eclosão caso esta acontecesse. Sendo assim, nossos resultados seriam intermediários aos encontrados por Alves-Júnior et al. (2012) e Ribeiro e Navarro (2020) em que verificaram uma média de eclosão de 94,63% e 73,98% para *P. expansa* em ninhos naturais e transplantados, respectivamente.

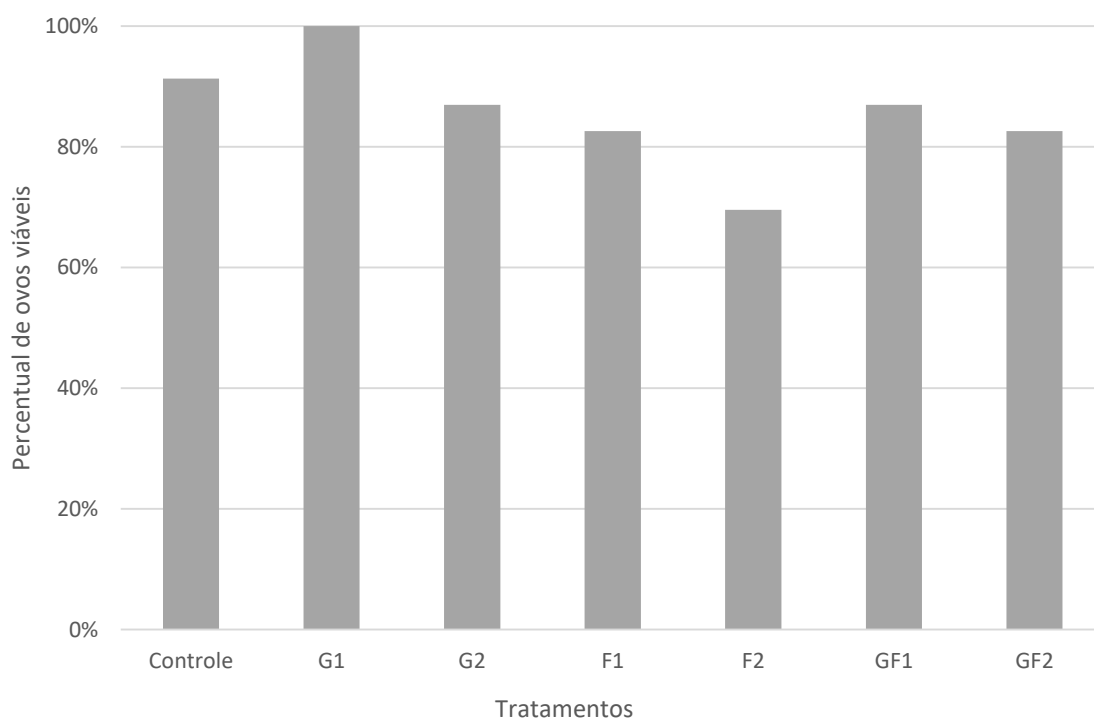


Figura 3-2: Viabilidade de ovos de *Podocnemis expansa* expostos ou não ao glifosato e fipronil (isoladamente ou em combinação) em incubação artificial. Os tratamentos não diferem significativamente ao nível de 0,05 pelo Teste Binomial: duas proporções. Tratamentos: G1- glifosato 65µg/L; G2- glifosato 6500µg/L; F1- fipronil 4µg/L; F2- fipronil 400µg/L; GF1- glifosato 65µg/L associado ao fipronil 4µg/L; GF2- glifosato 6500µg/L associado ao fipronil 400µg/L.

3.3.1.2. Biomassa corpórea

A exposição aos agrotóxicos foi acompanhada por ausência no ganho de biomassa corporal dos embriões em comparação ao grupo controle ($H = 61.602$, $p \leq 0,001$, Figura 3-3). A biomassa corporal apresentou os menores valores para o tratamento G2, F1 e GF1 (35,10%, 33,12% e 31,91% menor que o observado no grupo controle, respectivamente).

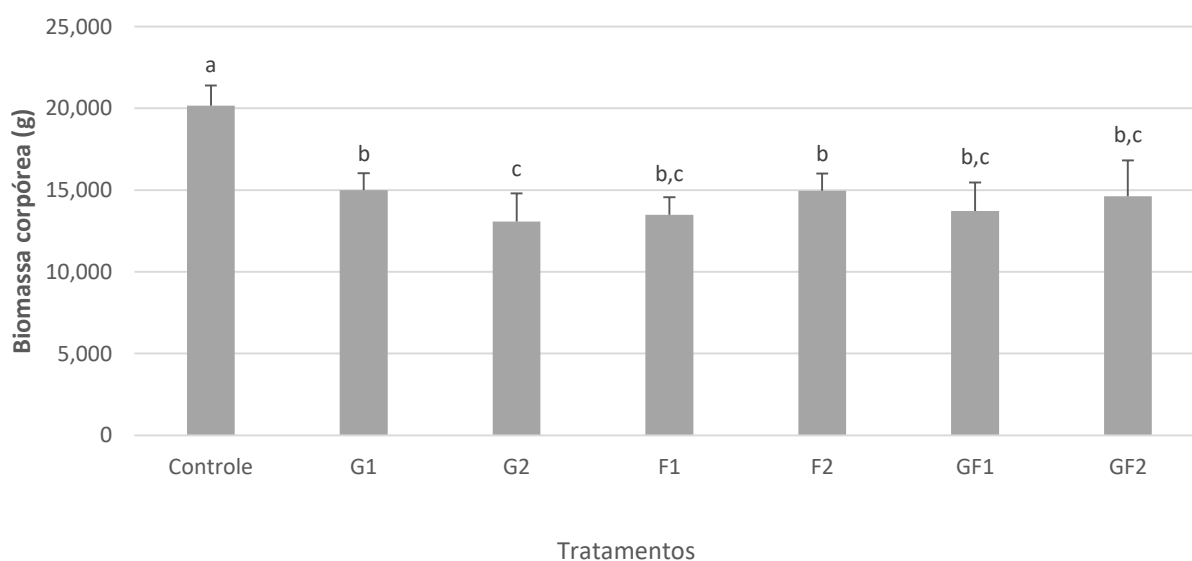


Figura 3-3: Biomassa corporal, em gramas (g), de embriões de *Podocnemis expansa* expostos ou não ao glifosato e fipronil (isoladamente ou em combinação) em incubação artificial. Os tratamentos com letras distintas diferem significativamente a 0,05 pelos testes de Kruskal-Wallis e Dunn. Tratamentos: G1- glifosato 65µg/L; G2- glifosato 6500µg/L; F1- fipronil 4µg/L; F2- fipronil 400µg/L; GF1- glifosato 65µg/L associado ao fipronil 4µg/L; GF2- glifosato 6500µg/L associado ao fipronil 400µg/L.

A biomassa corporal estatisticamente inferior nos grupos tratados também é evidenciada pela técnica de diafanização de ossos e cartilagem, a qual revela atraso no desenvolvimento desses embriões. Essa menor biomassa pode estar associada à menor incorporação de água pelo embrião devido às mudanças na composição química da casca causadas pela sorção dos agrotóxicos, visto que ambos os poluentes apresentam elevada capacidade de adsorção em solo arenoso (coeficiente de adsorção de 884mL/g e 1150mL/g para o glifosato e fipronil, respectivamente) (USEPA, 2005; EFSA 2015). Essa hipótese é corroborada por Valdes et al. (2015) que encontraram alterações no nível de fósforo e gordura total na casca de ovos de *P. expansa* expostos ao produto técnico parationa metúlica (35, 350 e 3500µg/L) em dose única no início da incubação. De acordo com Packard et al. (1980), o aumento da gordura total reduz o transporte de água pela casca, e essa menor absorção pode afetar o desenvolvimento do embrião.

3.3.2. Efeitos dos agrotóxicos nas alterações ósseas dos indivíduos de *P. expansa*.

3.3.2.1. Esqueleto axial e apendicular

A ossificação no grupo controle mostrou um progresso considerável em comparação com todos os demais grupos experimentais. Os grupos tratados individualmente ou em associação de agrotóxicos, apresentaram fontanelas cranial (Fcr), caudal (Fca) em estágio inferior de desenvolvimento, ossos costais (Co) e neurais (Ne) ainda não fundidos e centros de ossificação dos ossos nugal (Nu) e periféricos (Pr) retardatários, se comparados com o grupo controle (Figura 3-4). É possível verificar ainda nos grupos expostos, a presença de fontanela nos ossos do crânio, bem como membros torácicos e pelvins com ossos do carpo e tarso em início de desenvolvimento e/ou ausentes (Figura 3-5). Não foi observado outras malformações como formação de estruturas extras, encurtamento, flexões, torções e ondulação óssea.

Os embriões não expostos a pesticidas foram enquadrados no estágio 26 de desenvolvimento, enquanto que todos os embriões desenvolvidos em substrato contendo os agrotóxicos foram enquadrados no estágio 21 (Vieira 2008). Tendo em vista que a temperatura e a umidade da incubadora permaneceram iguais para todos os tratamentos,

infe-re-se que essa diferença observada no desenvolvimento ósseo se deve aos agrotóxicos testados.

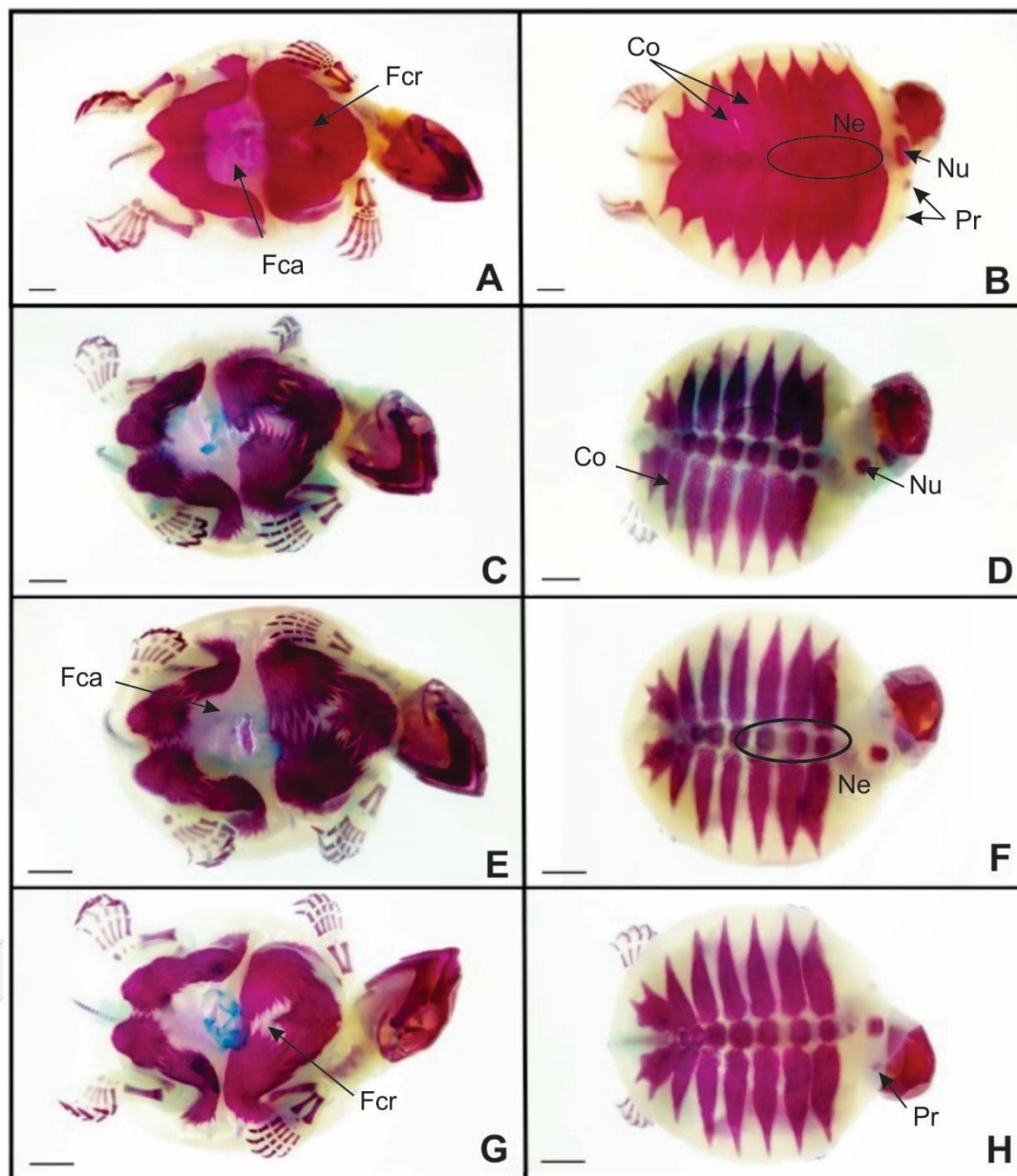


Figura 3-4: Embriões de *Podocnemis expansa* expostos ao glifosato e fipronil durante a incubação artificial, diafanizados por KOH e corados de vermelho de alizarina (ossos). (A) e (B) Grupo controle, indivíduo em estágio 26; (C) e (D) Grupo glifosato 6500 µg/L; (E) e (F) Grupo fipronil 400 µg/L e (G) e (H) Grupo glifosato 6500 µg/L associado ao fipronil 400 µg/L. (C-H) Indivíduos em estágio 21. Vista ventral e dorsal, respectivamente. Destaque para o retardo na ossificação das fontanelas cranial (Fcr) e caudal (Fca) dos grupos expostos aos agrotóxicos (C, E, G) em comparação com indivíduo do grupo controle (A). Fusão dos ossos costais (Co) e neurais (Ne) presentes no indivíduo do grupo controle (B) e ausentes nos demais indivíduos dos grupos tratados (D, F, H). Ossos nucais (Nu) e periféricos (Pr) desenvolvidos no indivíduo do grupo controle (B) e retardatários nos demais indivíduos dos grupos tratados (D, F, H). Escala 5mm.

O atraso no desenvolvimento ósseo em embriões de *P. expansa* expostos a contaminantes também pode causar danos locomotores, importantes para a sobrevivência da

espécie. Resultados semelhantes foram obtidos em estudos realizados com outros répteis, que também constataram que embriões de *Salvator merianae* expostos a glifosato 2% em incubação artificial apresentaram redução na taxa de crescimento (Mestre et al., 2019) e que indivíduos de *Podarcis muralis* expostos ao mesmo herbicida (360g/L em intervalos de 7 a 10 dias) apresentaram alterações em sua aptidão física, além de absorção dérmica e oral dos agrotóxicos com o aumento da exposição (Mingo et al., 2017). Com relação ao fipronil, o mesmo foi considerado um dos potenciais envolvidos no declínio e extinção de quatro espécies de répteis na ilha Christmas, no Oceano Índico, acarretando, além de redução de alimentos, morte por envenenamento pela ingestão direta do composto (Emery et al. 2021).

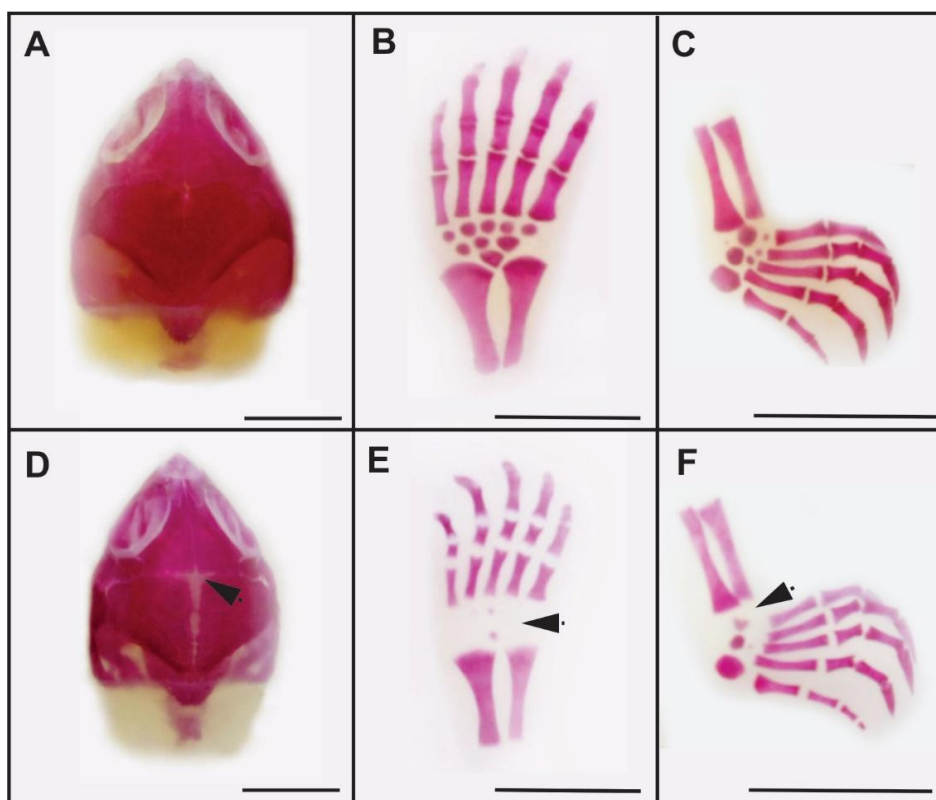


Figura 3-5: Retardo no desenvolvimento ósseo de *Podocnemis expansa* expostos ao glifosato e fipronil durante incubação artificial, diafanizados por KOH e corados de vermelho de alizarina (ossos). (A, B e C) Indivíduos Controle; (D, E e F) Indivíduos Tratados. (D) Ossificação nos ossos do crânio com a presença da fontanela (seta) no embrião do grupo tratado exposto ao glifosato 6500µg/L associado ao fipronil 400µg/L; (E) Membros torácicos esquerdos com destaque para os ossos do carpo ainda em início de desenvolvimento (seta) em grupo exposto ao fipronil 4µg/L. (F) Membros pelvicos direitos com destaque para os ossos do tarso em estágio retardatário de desenvolvimento (seta) em grupo exposto ao glifosato 6500µg/L associado ao fipronil 400µg/L. Escala 5mm.

O esqueleto, no caso dos répteis, é um importante bioindicador em estudos ecotoxicológicos, uma vez que o período de organogênese das estruturas esqueléticas é longo e com origens distintas do mesênquima (Noden, 1988). Por envolver várias etapas para a formação do molde cartilágneo, caracterizado por padrões temporais específicos e com

mudanças ocorrendo em períodos previsíveis, possíveis perturbações nesta série de acontecimentos, como fatores externos físicos ou químicos, resultam em defeitos ósseos (Wilkie et al., 2003).

No ambiente natural o atraso no desenvolvimento ósseo pode causar danos significativos à espécie, visto que os ovos de *P. expansa* eclodem, comumente, em novembro e dezembro, justamente antes da cheia do rio e, conseqüentemente, do alagamento das praias (Simoncini et al., 2019). Com o retardo no desenvolvimento dos embriões, sua eclosão poderia coincidir com o aumento do volume dos rios e conseqüentemente com a inundação das praias, ocasionando a morte dos filhotes por afogamento dentro das câmaras dos ninhos (Eisemberg et al., 2016; Norris et al., 2020). Outro possível agravante é que esse retardo no desenvolvimento resultaria em um maior tempo de exposição a produtos químicos, o que pode causar sérios prejuízos para a espécie, diminuir o número de indivíduos e aumentar o risco de extinção. De acordo com López González et al. (2017), filhotes menores têm menor chance de sobrevivência durante seus primeiros anos, afetando assim a dinâmica populacional da espécie. Portanto, compreender as consequências da exposição a pesticidas e os níveis causais de exposição durante os períodos críticos de desenvolvimento embrionário é de suma importância.

Assim como no presente estudo, a literatura relata que a contaminação *in ovo* aos agrotóxicos pode comprometer o desenvolvimento embrionário de répteis (Carneiro et al., 2019; Hirano et al., 2019; Mestre et al., 2019). No entanto, não se sabe se essa exposição pode ocasionar prejuízo na vida adulta desses animais. Além disso, outras alterações biológicas como efeitos neurotóxicos, hepatotóxicos, genotóxicos, mutagênicos, citotóxicos e reprodutivos foram relatados para a classe (Wang et al., 2016; Schaumburg et al., 2016; De-Oliveira et al. 2020), o que alerta para a necessidade de inclusão dos répteis para avaliação de risco de pesticidas, afim de realizar o seu uso responsável e melhorar as práticas de conservação.

3.3.2.2. Anel ossicular escleral

A exposição aos agrotóxicos afetou a ossificação dos ossículos da esclera, levando à conseqüente alteração do anel ossicular escleral com diferentes malformações. Os ossículos esclerais formam uma estrutura resistente que preserva a forma do globo ocular sob pressão externa e auxilia na acuidade visual (Carneiro et al., 2019). Os tipos de malformações encontrados nos ossículos esclerais foram ausência (ao), formato irregular (is), fusão (fo) e

ossículos rudimentares (r). A Tabela 3-1 mostra os valores totais, média, desvio padrão, erro padrão, p-valor e o valor do teste de Kruskal-Wallis (H-valor) da frequência de malformações.

Tabela 3-1. Total, média, desvio padrão (DP), erro padrão (EP), p-valor e o valor do teste de Kruskal-Wallis (H-valor) da frequência de malformação em ossículos esclerais de *Podocnemis expansa* expostos ou não - *in ovo* - ao glifosato e fipronil (isoladamente ou em combinação).

	ao	is	f	r	Total	Média	DP	EP	p-valor	H-valor
Controle	3	4	0	4	11	2,75	1,89	0,36	-	-
G1	4	12	4	14	34	8,5	5,26	0,99	0.0833	3.4054
G2	3	11	5	13	32	8	4,76	0,90	0.1124	2.5823
F1	19	16	5	9	49	12,25	6,40	1,21	0.0209*	5.3976
F2	4	16	8	13	41	10,25	5,32	1,00	0.0433*	4.2875
GF1	6	11	4	9	30	7,5	3,11	0,59	0.0433*	4.2875
GF2	3	13	6	11	33	8,25	4,57	0,86	0.1124	2.5823

*Médias com diferença estatística comparadas ao grupo controle, de acordo com o Teste de Kruskal-Wallis, com nível de significância de 5%.

ao- ausência de ossículo; is- formato irregular; fo- fusão de ossículos; r- ossículo rudimentar.

Tratamentos: G1- glifosato 65µg/L; G2- glifosato 6500µg/L; F1- fipronil 4µg/L; F2- fipronil 400µg/L; GF1- glifosato 65µg/L associado ao fipronil 4µg/L; GF2- glifosato 6500µg/L associado ao fipronil 400µg/L.

Houve diferença estatística entre a malformação dos ossículos da esclera encontrada nos embriões do grupo controle e os tratamentos F1 (H=5.3976; p=0.0209), F2 (H=4.2875; p=0.0433) e GF1 (H=4.2875; p=0.0433). De acordo com estes resultados, o fipronil apresentou maior toxicidade do que o glifosato e pode estar ocorrendo antagonismo entre esses dois agrotóxicos visto que a exposição ao glifosato e fipronil em sua maior concentração (GF2) não resultou em diferença significativa (Tabela 3-1). Não houve, portanto, sinergismo na associação de ambos os agrotóxicos em comparação com a exposição a cada um isoladamente. No entanto, todos os grupos tratados com glifosato, fipronil e sua associação, em menor ou maior dosagem, apresentaram alterações visíveis a nível do anel ossicular escleral (Figura 3-6).

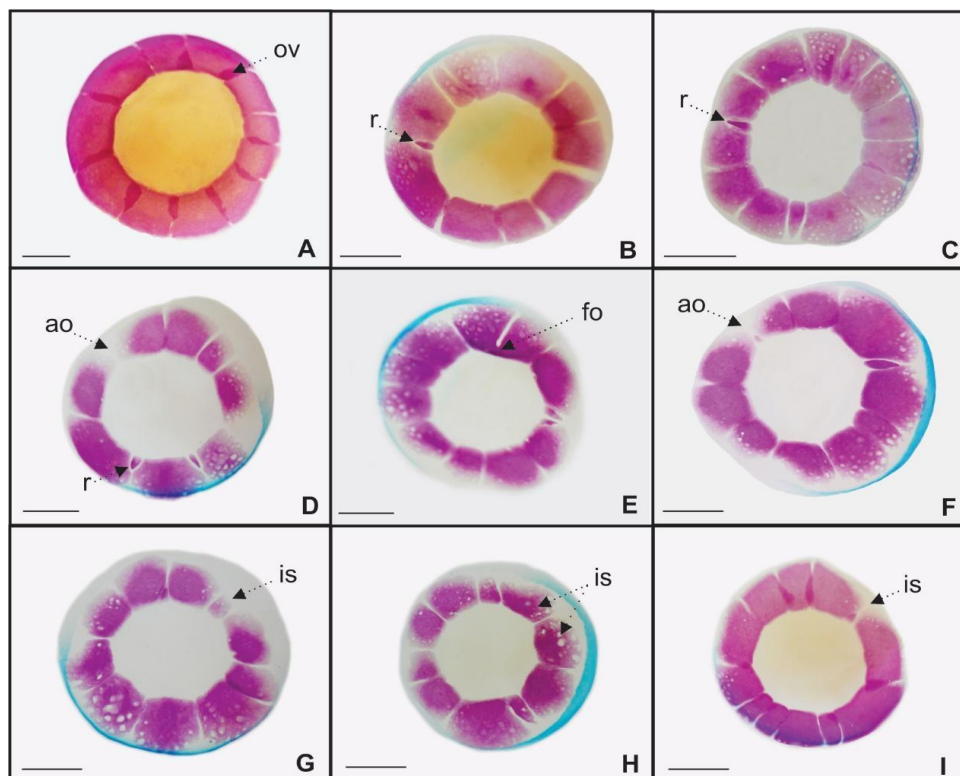


Figura 3-6: Ossículos esclerais de embriões de *Podocnemis expansa* expostos a agrotóxicos durante incubação artificial. Análise macroscópica. (A) Grupo controle; (B) e (C) Grupo glifosato 65µg/L e 6500µg/L, respectivamente; (D) Grupo fipronil 4µg/L; (E) e (F) Grupo fipronil 400µg/L; (G) e (H) Grupo glifosato 65µg/L associado ao fipronil 4µg/L; e (I) Grupo glifosato 6500µg/L associado ao fipronil 400µg/L. Observa-se a presença de: ov – sobreposição de ossículos (A); r - ossículos rudimentares (B, C, D); ao - ausência de ossificação (D e F); fo - fusão dos ossículos (E); is - formato irregular (G, H e I). Escala 1mm.

As análises histológicas da esclera de embriões de *P. expansa* corroboraram as alterações encontradas macroscopicamente (Figura 3-7), sendo encontradas malformações como ausência de ossificação (ao), ossículo rudimentar (r), fusão (fo), formato irregular (is) e sobreposição (ov) inclusive no grupo controle. Alterações semelhantes às do presente estudo também foram encontradas por Carneiro et al. (2019), os quais avaliaram os efeitos da atrazina (2, 20 ou 200µg/L em contaminação única) durante o desenvolvimento dos ossículos da esclera em *P. expansa*. Além disso, a exposição ao glifosato e/ou atrazina (65 ou 6500µg/L e/ou 2 ou 200µg/L, respectivamente) em dias alternados em ovos incubados artificialmente resultou em malformações significativas no anel ossicular escleral em *P. unifilis* (Hirano et al., 2019).

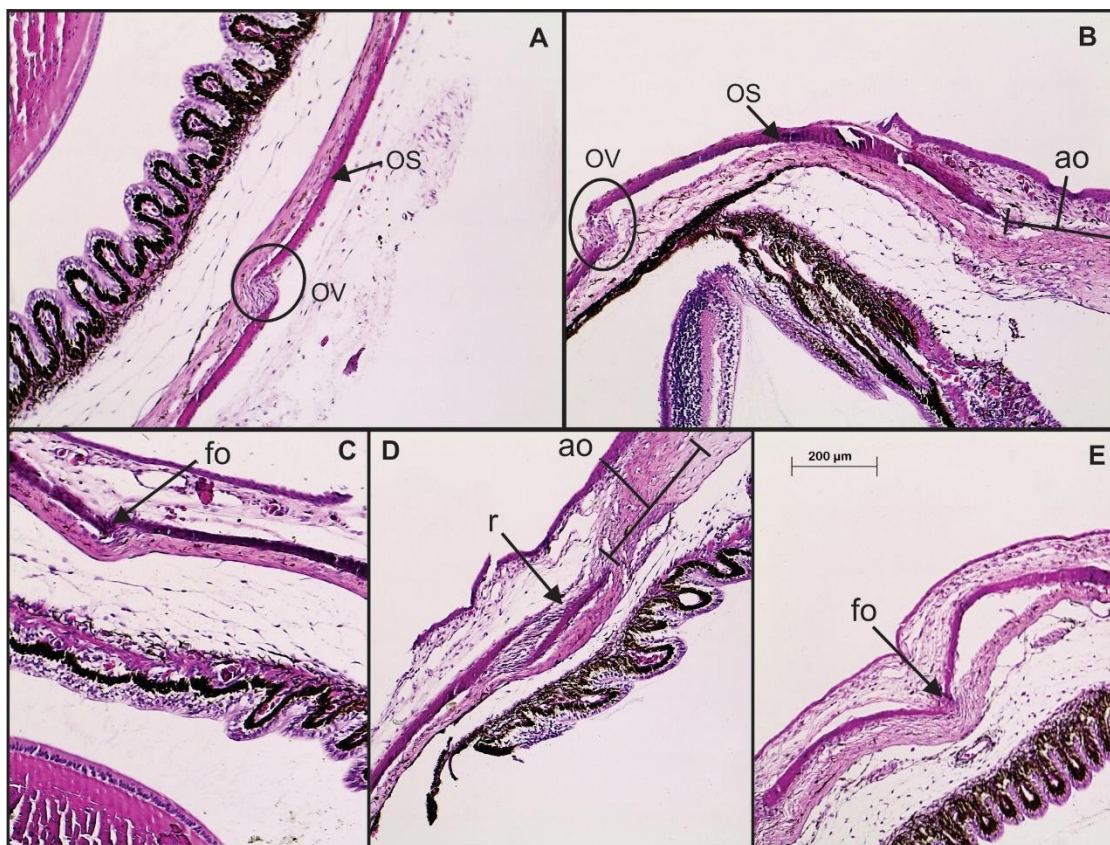


Figura 3-7: Cortes histológicos da esclera de embriões de *Podocnemis expansa* expostos a agrotóxicos durante incubação. (A) Grupo controle; (B) Grupo glifosato 65µg/L; (C) Grupo glifosato 6500µg/L (D) Grupo fipronil 4µg/L; (E) Grupo fipronil 400µg/L. As setas apontam para malformações. Observa-se a presença de: os – ossículos (A e B), ov - sobreposição de ossículos (A e B), ao – ausência de ossificação (B e D), fo- fusão dos ossículos (C e E), r- ossículo rudimentar (D). Coloração realizada por Hematoxilina e Eosina. Escala de 200µm.

A alta incidência de malformações no anel ossicular escleral pode estar relacionada à natureza de sua origem. Todos os tecidos ósseos se desenvolvem a partir de células mesenquimais. No entanto, a base do mesênquima é o produto de células de diferentes linhagens embrionárias. Os ossículos, por exemplo, se originam das células da linhagem da crista neural craniana, assim como todo o esqueleto craniofacial (Franz-Odenaal e Vickaryous, 2006). No entanto, a partir de sinais indutivos do mesênquima, cada placódio sofre modificações morfológicas para formar as papilas conjuntivais no limbo escleral da córnea, que induzem a formação de ossículos esclerais (Drake et al., 2020). Assim, as papilas são necessárias para a indução do anel ossicular escleral nos répteis e seu número corresponderá ao número de ossículos do anel (Hall, 2015).

Embora esse desenvolvimento seja pouco compreendido em répteis, estudo evidenciou que o glifosato (20µl de diluições de 1/500 injetado intra-ovo) causou um aumento na atividade do ácido retinóico endógeno, resultando na supressão do gene *Otx2* e na interrupção do desenvolvimento da crista neural (Paganelli et al., 2010). Outros contaminantes, como a

atrazina, são conhecidos por afetar os níveis de metaloproteinase, que também podem desempenhar papéis importantes na formação do anel ossicular escleral (Lenkowski e Mclaughlin, 2010). Durante a longa formação dos ossículos ocorrem várias cascatas de eventos moleculares, desde a pré-padronização epitelial até a formação do anel ossicular (Drake et al., 2020; Franz-Odenaal, 2020; Jourdeuil e Franz-Odenaal, 2016) o que favorece os danos causados por meio de agentes químicos, como os agrotóxicos. Assim, a maior suscetibilidade do anel ossicular escleral aos efeitos de substâncias químicas, em relação a outras estruturas ósseas, pode ser decorrente de diferenças em sua formação e período de desenvolvimento embrionário (Hirano et al. 2019).

Os ossículos esclerais fornecem suporte para a fixação dos músculos oculares que auxiliam na acomodação visual para focar imagens em diferentes distâncias. As espécies aquáticas, em particular, dependem do movimento ou contração lenticular, e qualquer alteração no funcionamento dessas estruturas pode comprometer a capacidade visual dos indivíduos (Franz-Odenaal, 2020; Lima et al. 2009). Portanto, os danos relatados no anel ossicular dos filhotes de *P. expansa* podem ser irreversíveis e causar consequências significativas para o seu desenvolvimento e sobrevivência, conforme relatado anteriormente por Hirano et al. (2019).

Nos resultados obtidos não foi observado sinergismo na associação dos agrotóxicos, apenas antagonismo com relação a frequência de malformação em ossículos esclerais. Neste caso, a toxicidade da exposição simultânea ao glifosato e fipronil foi dependente da concentração utilizada, ocorrendo antagonismo em GF2 se comparado as concentrações de G1, G2 e GF1. Nossos resultados contrastam com o encontrado por Hirano et al (2019) em estudo com Testudines, onde os autores verificaram que a exposição simultânea de herbicidas (glifosato 65 ou 6500µg/L e/ou atrazina 2 ou 200µg/L, respectivamente) em incubação artificial, ocasionou taxas mais altas de anormalidades embrionárias em *P. unifilis* em comparação com a falta de exposição ou exposição apenas à atrazina. De acordo com alguns estudos, o antagonismo pode ser explicado por uma indução da atividade de enzimas do citocromo *P450* causada pelo herbicida e o consequente aumento da biotransformação do inseticida (Fu et al., 2013; Cedergreen, 2014; Mansano, 2020). Além disso, Farré et al. (2002) relatou que o efeitos antagônicos em misturas de pesticidas podem ser causados pela associação entre as moléculas do composto, o que diminuiu sua biodisponibilidade.

Os mecanismos detalhados da toxicidade do glifosato e fipronil em répteis ainda precisam ser esclarecidos, visto que esse táxon apresenta diferenças importantes em relação a ecologia, fisiologia, crescimento, desenvolvimento e reprodução quando comparados com

outros grupos de animais (Mingo, 2018). A atividade biológica, por exemplo, geralmente aumenta com temperaturas mais altas, alterando assim a taxa de ingestão de alimentos, o que irá influenciar a exposição oral através de presas contaminadas (EFSA, 2017; Mingo, 2018). Com relação ao metabolismo, como o seu aumento só pode ser guiado por temoregulação acelerando processos fisiológicos, o metabolismo tóxico tem um custo adicional de energia que pode comprometer outras funções biológicas, como o crescimento, desenvolvimento, imunidade ou reprodução (Talent 2005; Gardner e Oberdörster 2006; Mingo, 2018).

A contaminação periódica com os produtos formulados Glifosato Atar 48® e Fipronil Regent® 800WG evidenciou menor biomassa corpórea, atrasos no desenvolvimento e alterações ósseas nos ossículos esclerais de *P. expansa*. No entanto, não se pode afirmar que essa exposição também não tenha alterado outros padrões como fisiológicos, genotóxicos ou comportamentais dos indivíduos avaliados, conforme observado e discutido por outros autores (Latorre et al., 2013; López-González et al., 2013; Mestre et al., 2019; De-Oliveira et al., 2020). Portanto, faz-se necessário a realização de mais estudos sobre os impactos dos agrotóxicos na fauna silvestre para subsidiar a revisão da legislação brasileira vigente e evitar maiores danos à biodiversidade.

3.4. Conclusões

O presente estudo confirma a hipótese de que a incubação dos ovos em substrato poluído com glifosato e fipronil interfere no crescimento embrionário de *P. expansa* (inferido pela menor biomassa corpórea e retardo no desenvolvimento), bem como induz malformações ósseas, mesmo em concentrações permitidas pela legislação vigente. Tendo em vista o potencial risco ecotoxicológico dos agrotóxicos sobre a biologia da espécie estudada, investigações futuras serão importantes para se aprofundar sobre o impacto dos agrotóxicos na fauna silvestre, especialmente em Testudines.

Apoio financeiro

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) e ao Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Répteis e

Anfíbios (RAN) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) por permitir a realização deste estudo.

3.5. Referências

- Alves-Júnior, J.R.F., Lustosa, A.P.G., Bosso, A.C.S., Balestra, R.A.M., Bastos, L.F., Miranda, L.B., Santos, A.L.Q. 2012. Reproductive indices in natural nests of giant Amazon river turtles *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) (Testudines, Podocnemididae) in the Environmental Protection Area Meanders of the Araguaia river. *Brazilian Journal of Biology*. 72 (1) ,199-203.
- Ayres, M., Ayres JR. M., Ayres, D.L., Santos, A.S. 2007. Biostat 5.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Sociedade Civil Mamirauá - Belém, MCT-CNPq – Brasília. 364p.
- Beckie, H.J., Flower, K.C., Ashworth, M.B. 2020. Farming without Glyphosate? *Plants*. 9 (96), 1-15.
- Behmer, O.A., Tolosa, E.M.C., Freitas Neto, A.G. 1976. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. São Paulo: EDART.
- Bell, B.A., Spotila, J.R., Paladino, F.V., Reina, R.D. 2003. Low reproductive success of leatherback turtles, *Dermochelys coriacea*, is due to high embryonic mortality. *Biological Conservation*. 115, 131–138.
- Bonfanti, P., Saibene, M., Bacchetta, R., Mantecchia, P., Colombo, A.A. 2018. Glyphosate micro-emulsion formulation displays teratogenicity in *Xenopus laevis*. *Aquatic Toxicology*. 195, 103–113.
- Bridi, D., Altenhofen, S., Gonzalez, J.B., Reolon, G.K., Bonan, C.D. 2017. Glyphosate and Roundup® alter morphology and behavior in zebrafish. *Toxicology*. 392, 32-39.
- Carneiro, C. C. 2012. Influência do ambiente de nidificação sobre a taxa de eclosão, a duração da incubação e a determinação sexual em *Podocnemis* (Reptilia, Podocnemididae) no Tabuleiro do Embaubal Rio Xingu, Pará. 54p. Dissertação de mestrado em Ecologia Aquática e Pesca - Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aquática e Pesca, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará.
- Carneiro, I.V., Vieira, L.G.; Mendonça, J.M., Hirano, L.Q.L., Valdes, S.A.C., Menezes - Reis, L.T., Santos, A.Q. 2019. Development of scleral ossicles in *Podocnemis expansa* (Testudines: Podocnemididae) embryos exposed to atrazine. *Drug and Chemical Toxicology*. 14, 1-6.
- Cedergreen, N., 2014. Quantifying synergy: a systematic review of mixture toxicity studies within environmental toxicology. *PloS One* 9 (5), e96580.
- Chambers, J.E, Carr, R. L. 1995. Biochemical mechanisms contributing to species differences in insecticidal toxicity. *Toxicology*. 105, 291-304.

CONCEA - Controle de Experimentação Animal, 2018. Resolução normativa nº 37, de 15 de fevereiro de 2018. Baixa a Diretriz da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA. Diário Oficial da União 1, 5.

Davis, D.D., Gore, U.R. 1936. Clearing and staining skeleton of small vertebrates. Field Museum of Natural History. 4, 3-15.

Deeming, D.C., Ferguson, M.W. 1988. Environmental regulation of sex determination in reptiles. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 322, 19-39.

De-Oliveira, J.S.P., Vieira, L.G., Carvalho, W.F., de Souza, M.B., de Lima Rodrigues, A.S., Simões, K., De Silva, D.M., Mendonça, J.S., Hirano, L.Q.L., Santos, A.L.Q., Malafaia, G. 2020 Mutagenic, genotoxic and morphotoxic potential of different pesticides in the erythrocytes of *Podocnemis expansa* neonates. Science of The Total Environment, 737, 140304.

Diário Oficial Da União - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Secretaria de Defesa Agropecuária/Departamento de Sanidade Vegetal e Insumos Agrícolas/Coordenação-Geral de Agrotóxicos e Afins. 2021. ATO Nº 70, de 23 de dezembro de 2020. Publicado em: 11/01/2021, Edição: 6, Seção: 1, Página: 7.

Diário Oficial Da União - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Secretaria de Defesa Agropecuária/Departamento de Sanidade Vegetal e Insumos Agrícolas/Coordenação-Geral de Agrotóxicos e Afins. 2019. ATO Nº 91, de 26 de dezembro de 2019. Publicado em: 27/12/2019, Edição: 250, Seção: 1, Página: 3.

Dingerkus, G., Uhler, L. 1977. Differential staining of bone and cartilage in cleared and stained fish using alcian blue to stain cartilage and enzymes for clearing fish. Stain Technology, Baltimore. 52, 229 - 232.

Drake, P.M., Jourdeuil, K., Franz-Odenaal, T.A. 2020. An overlooked placode: Recharacterizing the papillae in the embryonic eye of reptilia. Developmental Dynamics. 249, 164–172.

EFSA - European Food Safety Authority. 2017. Scientific Opinion on the state of the science on pesticide risk assessment for amphibians and reptiles. EFSA Journal.

EFSA - European Food Safety Authority. 2015. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. EFSA J. 13 (11), 4302.

Eisemberg, C.C., Machado, B.R.A., Famelli, S., Pereira, F.F., Diniz, B.V.C., Carl V,R. 2016. Vulnerability of giant South American turtle (*Podocnemis expansa*) nesting habitat to climate-change-induced alterations to fluvial cycles. Tropical Conservation Science. 9, 1-12.

Emery, J.P., Mitchell, N.J., Cogger, H., Agius, J., Andrew, P., Arnall, S., Detto, T., Driscoll, D. A., Flakus, S., Green, P., Harlow, P., McFadden, M., Pink, C., Retallick, K., Rose, K., Sleeth, M., Tiernan, B., Valentine, L. E., Woinarski, J. Z. 2021. The lost lizards of Christmas Island: A retrospective assessment of factors driving the collapse of a native reptile community. Conservation Science and Practice, 3 (2) 1-20.

Faber, D. 2020. Poisoning the World for Profit: Petro-Chemical Capital and the Global Pesticide Crisis, Capitalism Nature Socialism, 31(4), 1–17.

- Farré, M., Gonçalves, C., Lacorte, S., Barceló, D., Alpendurada, M., 2002. Pesticide toxicity assessment using an electrochemical biosensor with *Pseudomonas putida* and a bioluminescence inhibition assay with *Vibrio fischeri*. *Anal. Bioanal. Chem.* 373 (8), 696–703.
- Fernandes, C.L.F., Volcão, L.M., Ramires, P.F., Moura, R.R., Da Silva Júnior, F.M.R. 2020. Distribution of pesticides in agricultural and urban soils of Brazil: a critical review. *Environ Sci Process Impacts.* 26; 22(2), 256-270.
- Franz-Odendaal, T.A. 2020. Skeletons of the Eye: An Evolutionary and Developmental Perspective. *The anatomical record.* 303, 100–109.
- Franz-Odendaal, T.A., Vickaryous, M.K. 2006. Skeletal elements in the vertebrate eye and adnexa: morphological and developmental perspectives. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists.* 235, 1244-1255.
- Fu, Y., Li, M., Liu, C., Qu, J.P., Zhu, W.J., Xing, H.J., Xu, S.W., Li, S., 2013. Effect of atrazine and chlorpyrifos exposure on cytochrome P450 contents and enzyme activities in common carp gills. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 94, 28–36.
- Gardner, S.C., Oberdörster, E., 2006. *Toxicology of reptiles: New perspectives.* Taylor & Francis, Boca Raton. CRC Press, p.328.
- Gomes, A.S., Ferreira Junior, P.D. 2011. Management and relocation of nests of *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) (Testudines, Podocnemididae) on the Crixás-Açu River broad-snouted. Brazil. *Brazilian Journal of Biology.* 71, 975-982.
- López González, E.C., Larriera, A., Siroski, P.A., Poletta, G.L. 2017. Micronuclei and other nuclear abnormalities on *Caiman latirostris* (Broad-snouted caiman) hatchlings after embryonic exposure to different pesticide formulations. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 136, 84-91.
- Hall, B.K. 2015. *Bones and cartilage: developmental and evolutionary skeletal biology*, second edition. Elsevier.
- Héritier, L., Duval, D., Galinier, R., Meistertzheim, A.L., Verneau, O. 2017. Oxidative stress induced by glyphosate-based herbicide on freshwater turtles. *Environ. Toxicol. Chem.* 36, 3343–3350.
- Hirano, L.Q.L., Alves, L.S., Menezes-Reis, L.T., Mendonça, J.S., Simões, K., Santos, A.L.Q., Vieira, L.G. 2019. Effects of egg exposure to atrazine and/or glyphosate on bone development in *Podocnemis unifilis* (Testudines, Podocnemididae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 182, 109400.
- IUCN - International Union For Conservation Of Nature And Natural Resources. 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Disponível em: <<http://www.redlist.org>> Acesso em 22 de junho de 2021.
- Ji, Q., Lee, J., Lin, Y.H., Jing, G., Tsai, L.J., Chen, A., Hetrick, L., Jocoy, D., Liu, J. 2016. Atrazine and malathion shorten the maturation process of *Xenopus laevis* oocytes and have an adverse effect on early embryo development. *Toxicol. Vit.* 32, 63–69.

- Jourdeuil K., Franz-Odenaal T.A. 2016. Gene expression analysis during the induction and patterning of the conjunctival papillae in the chick embryonic eye. *Gene Expr Patterns*. 22, 30-36.
- Latorre, M.A., González, E.C.L., Larriera, A., Poletta, G.L., Siroski, P.A. 2013. Effects of *in vivo* exposure to Roundup® on immune system of *Caiman latirostris*. *J Immunotoxicol*. 10, 349-354.
- Le Mer, C., Roy, R.L., Pellerin, J., Couillard, C.M., Maltais, D. 2013. Effects of chronic exposures to the herbicides atrazine and glyphosate to larvae of the threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 89, 174–181
- Lenkowski, J.R., McLaughlin, K.A. 2010. Acute atrazine exposure disrupts matrix metalloproteinases and retinoid signaling during organ morphogenesis in *Xenopus laevis*. *J. Appl. Toxicol.* 30, 582–589.
- Lima, F.C., Vieira, L.G., Santos, A.L.Q., Desimone, S.B.S., Hirano, L.Q.L., Silva, J.M.M., Romão, M.F. 2009. Anatomy of the scleral ossicles in Brazilian birds. *Braz J Morphol Sci*. 26, 165–169.
- Lima, J.A.M.C., Labanowski, J., Bastos, M.C., Zanella, R., Prestes, O. D., De Vargas, J. P. R., L., Granado, E., Tiecher, T., Zafar, M., Troian, M., Le Guet, T., Dos Santos, D. R. 2019. “Modern agriculture” transfers many pesticides to watercourses: a case study of a representative rural catchment of southern Brazil. *Environmental Science and Pollution Research*. 26, 6234–6243.
- Lind, P. M., Milnes, M. R., Lundberg, R., Bermudez, D., Örberg, J., Guillette, L. J. Jr. 2004. Abnormal Bone Composition in Female Juvenile American Alligators from a Pesticide-Polluted Lake (Lake Apopka, Florida). *Environmental Health Perspectives*, 112 (3), 359-362.
- López-González, E.C., Latorre, M.A., Larriera, A., Siroski, P.A., Poletta, G.L. 2013. Induction of micronuclei in broad snouted caiman (*Caiman latirostris*) hatchlings exposed *in vivo* to Roundup_ (glyphosate) concentrations used in agriculture. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 105, 131–134.
- Lorke D. 1977. Evaluation of skeleton, in: Neubert D., Merker H-J., Kwasigroch T.E. (Eds.), *Methods in prenatal toxicology*. Georg Thieme Publisher., Stuttgart, 145–152.
- Magalhães, M.S. Desenvolvimento embrionário de *Podocnemis expansa* (Testudines: Podocnemididae): descrição do pronefro e mesonefro e diferenciação gonadal em ambiente natural, Balbina, Amazonas. 2017. 162p. Tese de doutorado em Biologia de Água Doce e Pesca Interior - Programa de Pós-Graduação do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas.
- Mansano, A.S., Moreira, R.A., Dornfeld, H.C., Freitas, E.C., Vieira, E.M., Daam, M.A., Rocha, O., Selegim, M.H.R. 2020. Individual and mixture toxicity of carbofuran and diuron to the protozoan *Paramecium caudatum* and the cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 201, 110829.
- Marco, A., Diaz-Paniagua, C., Hidalgo-Vila, J., 2004. Influence of egg aggregation and soil moisture on incubation of flexible-shelled lacertid lizard eggs. *Can. J. Zool.* 82, 60–65.

- Mestre, A.P., Amavet, P.S., Vanzetti, A.I., Moleon, M.S., Parachú Marc o, M.V., Poletta, G.L., Siroski, P.A., 2019. Effects of cypermethrin (pyrethroid), glyphosate and chlorpyrifos (organophosphorus) on the endocrine and immune system of *Salvator merianae* (Argentine tegu). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 169, 61e67.
- Mingo, V. 2018. The use of plant protection products and its impact on reptiles. 276p. Vom Fachbereich VI (Raum- und Umweltwissenschaften) der Universität Trier zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte, Dissertation. Trier.
- Mingo, V., Lötters, S., Wagner, N. 2017. The impact of land use intensity and associated pesticide applications on fitness and enzymatic activity in reptiles - A field study. *Environment International*. 124, 284-293.
- Muturi, E.J., Donthu, R. K., Fields, C.J., Moise, I.K., Kim, C.H., 2017. Effect of pesticides on microbial communities in container aquatic habitats. *Sci. Rep.* 7, 44565.
- Noden, D.M. 1988. Interactions and fates of avian craniofacial mesenchyme. *Development Supplement*. 103, 121-140.
- Norris, D., Michalski, F., Gibbs, J.P. 2020. Community based actions save Yellow-spotted river turtle (*Podocnemis unifilis*) eggs and hatchlings flooded by rapid river level rises. *PeerJ*. 8, e9921.
- Packard, M.J. 1980. Ultrastructural morphology of the shell and shell membrane of eggs of common snapping turtles (*Chelydra serpentina*). *J Morphol.* 165, 197–204.
- Packard, G.C., Packard, M.J., Birchard, G.F. 2000. Availability of water affects organ growth in prenatal and neonatal snapping turtles (*Chelydra serpentina*). *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*. 170, 69-74.
- Paganelli, A., Gnazzo, V., Acosta, H., López, S.L., Carrasco, A.E. 2010. Glyphosate-based herbicides produce teratogenic effects on vertebrates by impairing retinoic acid signaling. *Chem. Res. Toxicol.* 23, 1586–1595.
- Park, H., Lee, J.Y., Park, S., Song, G., Lim, W. 2020. Developmental toxicity of fipronil in early development of zebrafish (*Danio rerio*) larvae: disrupted vascular formation with angiogenic failure and inhibited neurogenesis. *Journal of Hazardous Materials*. 385, 121531.
- Peveling, R., Demba, S.A. 2003 Toxicity and pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* var. *Acridum* (Deuteromycotina, Hyphomycetes) and fipronil to the fringe-toed lizard *Acanthodactylus Dumerili* (Squamata: Lacertidae). *Environmental Toxicology and Chemistry*. 22 (7), 1437–1447.
- Ribeiro, T.N.L.; Navarro, R.D. 2020. Transplantation of nest of Amazonian turtle *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812). *Bioscience Journal*. 36 (6), 2255-2265.
- Rich, C.N., Talent, L.G., 2009. Soil ingestion may be an important route for the uptake of contaminants by some reptiles. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 311–315.

- Saka, M., Tada, N. 2021. Acute and chronic toxicity tests of systemic insecticides, four neonicotinoids and fipronil, using the tadpoles of the western clawed frog *Silurana tropicalis*. *Chemosphere*. 270, 129418.
- Santos, A.T., Valverde, B.S.L., De Oliveira, C., Franco-Belussi, L. 2021. Genotoxic and melanin alterations in *Lithobates catesbeianus* (anura) tadpoles exposed to fipronil insecticide. *Environmental Science And Pollution Research*. 28 (16), 20072-20081.
- Schaumburg, L.G., Siroski, P.A., Poletta, G.L., Mudry, M.D. 2016. Genotoxicity induced by Roundup® (Glyphosate) in tegu lizard (*Salvator merianae*) embryos. *Pesticide biochemistry and physiology*. 130, 71-78.
- Simoncini, M.S., Portelinha, T.C.G., Montelo, K.M., Falcon, G.B., Collicchio, E., Balestra, R. A.M., Luz, V.L.F., Malvasio, A. 2019. Avaliação da influência dos fatores ambientais sazonais na reprodução da tartaruga-da-amazônia (*Podocnemis expansa*): um estudo de caso no Tocantins. In: Lacava, R. V., Balestra, R. A. M. (Ed.). Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Quelônios Amazônicos, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Ibama, Brasília. 192p.
- Simon-Delso, N., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L.P., Bonmatin, J.M., Chagnon, M., Downs, C., Furlan, L., Gibbons, D.W., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreutzweiser, D.P., Krupke, C.H., Liess, M., Long, E., McField, M., Mineau, P., Mitchell, E.A.D., Morrissey, C.A., Noome, D.A., Pisa, L., Settele, J., Stark, J. D., Tapparo, A., Van Dyck, H., Van Praagh, J., Van der Sluijs, J.P., Whitehorn P.R., Wiemers M. 2015. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environ Sci Pollut Res Int*. 22(1), 5-34.
- Talent, L.G. 2005. Effect of temperature on toxicity of a natural pyrethrin pesticide to green anole lizards (*Anolis carolinensis*). *Environmental Toxicology and Chemistry*. 24 (12), 3113-3116.
- USEPA - U.S. Environmental Protection Agency, 2005. Fipronil: Environmental Fate and Ecological Effects Assessment and Characterization for Section 18 Registration of In-Furrow Applications to Rutabaga and Turnips. PC Code: 129121. DP Barcode: D356402.
- Valdes, S.A.C., Vieira, L.G., Ferreira, C. H., Mendonça, J. S., Ribeiro, P. R. Q., Fernandes, E. A., Santos, A. L.Q. 2015. Effects of Exposure to Methyl Parathion on Egg Hatchability and Eggshell Chemical Composition in *Podocnemis expansa* (Testudines, Podocnemididae). *Zoological Science*. 32, 135-140.
- Vieira, L.G. Ontogenia dos ossos do esqueleto da tartaruga-da-amazônia *Podocnemis expansa* Schweigger, 1812 (Testudines, Podocnemididae). 2008. 164p. Dissertação de mestrado em Saúde Animal - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais.
- Vogt, R.C.; Fagundes, C.K.; Bataus, Y.S.L.; Balestra, R.A.M.; Batista, F.R.W.; Uhlig, V.M.; Silveira, A.L.; Bager, A.; Batistella, A.M.; Souza, F.L.; Drummond, G.M.; Reis, I.J.; Bernhard, R.; Mendonça, S.H.S.T.; Luz, V.L.F. 2015. Avaliação do Risco de Extinção de *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) no Brasil. Processo de avaliação do risco de extinção da fauna brasileira. ICMBio. Ministério Do Meio Ambiente. Brasília.

Wang X., Martínez M.A., Wu Q., Ares I., Martínez-Larrañaga M.R., Anadón A., Yuan Z. 2016. Fipronil insecticide toxicology: oxidative stress and metabolism. *Crit Rev Toxicol.* 46, 876–899.

Wilkie, A.O. 2003. Why study human limb malformations?. *Journal of anatomy.* 202, 27-35.

Wilkinson, L. 1990. Systat: The system for statistics. 1990. Systat Inc., Evanston. 1, 822.

Zhang, W. 2018. Global pesticide use: Profile, trend, cost/benefit and more. *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences*, 8(1): 1-27.

Zhang, W., Jiang, F., Ou, J. 2011. Global pesticide consumption and pollution: with China as a focus. *Proc Int Acad Ecol Environ Sci* 1(2):125–144.

Capítulo 4 - Redução da umidade, proteína bruta e aumento do extrato etéreo da casca de ovos de *Podocnemis expansa* em exposição às formulações comerciais de glifosato e fipronil

Resumo

A casca dos ovos de Testudines apresenta extrema importância para o desenvolvimento e proteção do embrião. Sua avaliação pode servir como biondicador para investigar os efeitos de substâncias lançadas no ambiente, que podem alterar sua forma, tamanho, estrutura e/ou composição química. No entanto, informações a respeito dos impactos de contaminantes ambientais em répteis são escassos e não se sabe os reais efeitos destes nas cascas de ovos durante o período embrionário. Desse modo, objetivou-se testar a hipótese de que a incubação de ovos de *Podocnemis expansa* em substrato contendo glifosato e fipronil altera a composição química de matéria mineral e seca, proteína bruta, nitrogênio e extrato etéreo. Para tal fim, ovos foram coletados em área de reprodução natural da espécie e incubados artificialmente em areia umedecida, com água contaminada com glifosato Atar 48 nas concentrações de 65 ou 6500µg/L, fipronil Regent 800WG nas concentrações de 4 ou 400µg/L, ou sua associação. A exposição combinada se deu a partir de 65µg/L de glifosato e 4µg/L de fipronil e 6500µg/L de glifosato com 400µg/L de fipronil. As coletas das cascas ocorreram no 44º dia de incubação, quando iniciou a eclosão do grupo controle. O material foi colocado em estufa para secagem, posteriormente foi triturado e preparado para os procedimentos conforme o Compêndio Brasileiro de Nutrição Animal. Os resultados do presente estudo demonstram que a exposição aos agrotóxicos testados, isoladamente ou em associação, alterou a composição química da casca de *P. expansa*, reduzindo o teor de umidade e proteína bruta da casca dos ovos e elevou níveis de extrato etéreo.

Palavras-Chave: Agrotóxicos, Bromatologia, Ecotoxicologia, Répteis, Tartaruga-da-Amazônia.

4.1. Introdução

A casca dos ovos de répteis realiza um papel fundamental ao oferecer uma barreira de proteção à infecção microbiana e à perturbação física, controle da troca de água e de gases pelos poros, e por constituir uma importante reserva de minerais para o embrião durante o desenvolvimento (Kusuda et al., 2013; Ferreira et al., 2016; D'Alba et al., 2021). A determinação dos constituintes químicos dessa estrutura oferece informações sobre as

condições adequadas dos ovos e dos ninhos, bem como as substâncias nutritivas disponíveis para o embrião (Sahoo et al., 1998; Ferreira et al., 2016).

Na maioria dos ovos de répteis, a estrutura da casca é organizada em camadas. A estratificação mais interna é a orgânica, formada por tecido conjuntivo fibroso, e a mais externa é a calcária, composta por vários tipos de minerais (Kitimasak et al., 2003). A casca é composta principalmente por cálcio, magnésio, fósforo, oxigênio, extrato etéreo (gordura bruta), proteínas e nitrogênio, que se organizam de acordo com a espécie (Kitimasak et al., 2003, Cusack et al., 2003). Além disso, fatores como disfunção fisiológica ou nutricional das fêmeas, presença de substâncias nocivas no local do ninho, umidade ambiente inadequada, abrasão por partículas do solo, degradação microbiana extrínseca e até mesmo atividades intrínsecas podem produzir modificações na composição química e estrutura da casca de ovos (Van Der Oost et al., 2003; Ferreira et al., 2016).

O estudo das cascas dos ovos de répteis chama atenção de pesquisadores devido as suas particularidades. Packard et al. (1982) e Booth, e Yu (2009) verificaram a influência da umidade ambiente na troca de água entre ambiente externo e interno dos ovos; Wink e Elsey (1994) estudaram a morfologia de cascas de ovos viáveis e não viáveis do *Alligator sinensis* e Campos-Casal et al. (2020) avaliaram a composição química e microestrutura de cascas de ovos recentemente ovipositados de *Salvator merianae*. Em Testudines, Kusuda et al. (2013) classificaram as cascas dos ovos a partir de sua camada calcária, e Deeming (2018) constatou que o local de nidificação pode alterar as características da casca de ovos desses animais. Já D’Alba et al. (2021) verificaram que a morfologia da casca do ovo de répteis evoluiu para proteger as cascas de danos físicos e dessecação, encontrando uma relação positiva entre espessura e precipitação, e uma relação negativa entre porosidade e temperatura.

Com relação aos impactos de contaminantes ambientais na composição química das cascas de ovos de Testudines, há escassas informações a respeito na literatura. No entanto, sabe-se que a avaliação dessas estruturas pode servir como biondicador dos efeitos nocivos dos agrotóxicos, assim como prever efeitos deletérios nos animais ovíparos (Oost et al., 2003). A exposição única a altas concentrações de glifosato (68 a 11,206µg/L) e parationa metílica (35, 350 e 3500µg/L) diminuiu as taxas de eclosão de *Trachemys scripta elegans* e *Podocnemis expansa*, (Sparling et al., 2006; Valdes et al., 2015), sendo que a parationa metílica reduziu ainda os níveis de gordura total das cascas durante a incubação.

Representante dos Testudines, a espécie *Podocnemis expansa*, popularmente conhecida como tartaruga-da-Amazônia, é um animal ovíparo aquático que nidifica em ambientes terrestres próximos a corpos d’água, como praias fluviais ou costeiras, solo barroso

ou areno-argiloso (Dupre et al., 2007). Sua eficiência reprodutiva pode ser afetada por fatores ambientais como modificações na temperatura e umidade do substrato do ninho, bem como ações antrópicas, como a presença de produtos químicos na água (Alves-Júnior et al., 2012).

Os impactos que os agrotóxicos podem causar tornaram-se um relevante problema ambiental e de saúde pública diante do uso intenso e difuso destes produtos no Brasil e em todo o mundo (Ministério Da Saúde, 2018). Dentre os agrotóxicos mais comercializados no país, destacam-se o herbicida glifosato e o inseticida fipronil (Beckie et al., 2020). O primeiro, de aplicação pós-emergencial nas plantas invasoras de diversas culturas, vem aumentando sua utilização no Brasil, devido principalmente à expansão do cultivo da soja transgênica e à resistência adquirida por plantas daninhas (ABRASCO, 2015). O fipronil, é largamente utilizado em diversas culturas e pode deixar resíduos no ambiente quando utilizado em grande quantidade, principalmente nos recursos hídricos próximos às áreas de aplicação (Chaulet et al, 2019; Gupta e Anado', 2018).

Tendo em vista a ampla distribuição e abundância de *P. expansa* em habitats que possam estar contaminados por agrotóxicos e a importância da casca dos ovos para seu sucesso reprodutivo, objetivou-se identificar possíveis alterações na matéria seca (MS) e mineral (MM), proteína bruta (PB), nitrogênio (N) e extrato etéreo (EE) das cascas dos ovos de *P. expansa* incubados em substrato expostos a diferentes concentrações de glifosato e fipronil. Supõe-se que tais agrotóxicos, individualmente e/ou em associação, alterem a composição química das cascas de ovos, causando prejuízo para a espécie.

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Coleta das cascas e análise da composição química

O dia de colocação dos ovos nas caixas de incubação foi considerado dia 0 (zero). As coletas foram realizadas no 44º dia de incubação, quando iniciou a eclosão do grupo controle. Os embriões foram eutanasiados de forma humanitária, conforme determinação Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV, 2012). As carcaças foram utilizadas em outro estudo de análise de desenvolvimento embrionário (Mendonça et al. 2021, não publicado).

Após a retirada dos embriões por meio de uma abertura feita com tesoura cirúrgica, 10 cascas dos ovos de cada tratamento foram limpas manualmente sob água corrente para remoção de resíduos, tais como restos de membrana corioalantoide e substrato de incubação, armazenadas em pequenos sacos plásticos identificados por cada tratamento e congeladas a -10°C. Posteriormente, após descongelamento foi realizada a secagem do material em estufa a

80° C por 24 horas, trituração manual das cascas de ovos e pesagem das mesmas, gerando três amostras (repetições) para cada tratamento. Foram realizadas as análises de matéria seca (MS) e mineral (MM), proteína bruta (PB) pelo método de Kejdhal e extrato etéreo (EE) através do Extrator Soxhlet seguindo metodologia referenciada pelo Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal (2009) e conduzidas no Laboratório de Nutrição Animal (LAMRA/UFU).

4.2.2. Análise estatística

A comparação da composição química das cascas entre os diferentes grupos foi realizada utilizando o teste Kolmogorov-Smirnov para analisar a normalidade dos dados. Em sequência foi utilizado o teste de Análise de Variância (ANOVA) ou o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com post-hoc de Tukey ou de Dunn, respectivamente, por meio do software SYSTAT 10.2 (Wilkinson, 1990). Para todas as análises, as diferenças foram consideradas significativas ao nível de 5% de significância.

4.3. Resultados e Discussão

Os resultados de análises bromatológicas estão descritos na Tabela 4-1. Destaca-se que o grupo controle, onde os ovos foram incubados em um ambiente sem contaminação de glifosato e ou fipronil, o teor de matéria seca e matéria mineral foram significativamente menores do que as cascas dos ovos nos demais tratamentos. Apesar dos tratamentos G1 e G2 apresentarem ainda semelhança de resultado com o controle, é possível inferir que os agrotóxicos foram responsáveis por reduzir o teor de água das cascas.

Tabela 4-1. Média e desvio padrão, em porcentagem, da composição química de cascas de ovos de *Podocnemis expansa* expostos aos agrotóxicos glifosato, fipronil, isolados ou em associação, durante a incubação artificial.

	MM	MS	PB	N	EE
C	43,31 ± 6,50 ^a	94,23 ± 0,73 ^a	54,07 ± 10,03 ^a	8,65 ± 1,65 ^a	0,17 ± 0,03 ^a
G1	52,96 ± 9,05 ^{a,b}	95,20 ± 0,92 ^{a,b}	41,35 ± 0,48 ^{a,b}	6,59 ± 0,11 ^{a,b}	0,71 ± 0,05 ^b
G2	58,25 ± 4,77 ^{a,b}	95,89 ± 0,26 ^{b,c}	40,88 ± 3,32 ^{a,b}	6,54 ± 0,53 ^b	0,26 ± 0,009 ^{a,c}
F1	59,20 ± 3,43 ^b	96,43 ± 0,41 ^{b,c}	33,65 ± 6,38 ^b	5,38 ± 1,02 ^b	2,01 ± 0,09 ^d
F2	63,02 ± 4,26 ^b	96,63 ± 0,52 ^{b,c}	29,99 ± 4,47 ^b	4,79 ± 0,71 ^b	2,02 ± 0,07 ^d
GF1	59,65 ± 4,74 ^b	96,55 ± 0,10 ^{b,c}	36,11 ± 9,03 ^b	5,78 ± 1,44 ^b	0,45 ± 0,13 ^c
GF2	65,96 ± 1,76 ^b	96,82 ± 0,28 ^c	32,61 ± 11,64 ^b	5,21 ± 1,86 ^b	0,09 ± 0,0002 ^a

^{a,b,c,d}Tratamentos com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente a nível de 0,05 pelo teste de Tukey ou de Dunn.

(EE) extrato etéreo; F1: fipronil 4µg/L; F2: fipronil 400µg/L; G1: glifosato 65µg/L; G2: glifosato 6500µg/L; GF1: G1 associado a F1; GF2: G2 associado a F2; (MM) matéria mineral; (MS) matéria seca; (N) nitrogênio; (PB) proteína bruta.

Tanto a matéria seca quanto a matéria mineral dos grupos tratados apresentaram taxas superiores se comparadas ao grupo controle, o que indica diminuição na taxa de umidade dos grupos expostos aos contaminantes. Na natureza, o sucesso de eclosão de *P. expansa* depende diretamente da disponibilidade de água do ambiente para o embrião e em condições com escassez de umidade, os ambientes podem ser impróprios para a incubação, o que pode ocasionar mortes e possíveis defeitos embrionários (Webb et al., 2006; Ferreira et al., 2016). Neste experimento, no entanto, a perda de água, entre um e dois por cento, parece estar associada exclusivamente aos tratamentos com contaminações e não ao desenvolvimento embrionário. De acordo com os resultados obtidos com as análises de desenvolvimento das carcaças advindas do presente estudo (Mendonça et al., 2021, não publicado) e corroborando estudos de Ferguson (1981), é possível ainda inferir que o aumento da matéria seca nos grupos contaminados pelos agrotóxicos reflete a deficiência da mobilização de macro e microelementos para embrião, nutrientes estes essenciais para o seu desenvolvimento.

No presente trabalho, a coleta das cascas para análise ocorreu no dia 44 de incubação, o que pode explicar resultados diferentes dos encontrados por outros autores que analisaram as cascas dos ovos da mesma espécie após o término do período de incubação artificial. De acordo com Ferreira et al. (2016), a média da taxa de matéria mineral em ovos de *P. expansa* advindos de dois ninhos diferentes e incubados artificialmente sem adição de contaminantes foi de 20,34%, com a eclosão ocorrendo entre 50 à 60 dias. Já Souza (2015) verificaram valores bem discrepantes para outra espécie, *P. unifilis*, sendo a porcentagem de matéria mineral 87,47% no período pré-eclosão e 70,21% no pós-eclosão, respectivamente. Vale ressaltar que apesar de serem espécies do mesmo gênero elas apresentam ovos com características bastante distintas em relação ao tamanho, formato, espessura, textura, porosidade e possivelmente, composição química.

Na proteína bruta (Tabela 4-1) verifica-se que a sua presença é ainda maior que a matéria mineral (MM), constituindo cerca de 57% da matéria seca da casca do grupo controle. Muito embora os tratamentos G1 e G2 mostrem semelhança aos resultados do grupo controle (C), são também semelhantes aos demais tratamentos contaminados com fipronil e suas associações com glifosato. Desta forma sugere que a contaminação do meio ambiente da incubação artificial reduziu significativamente a concentração de proteína bruta da casca. Como esta proteína é determinada a partir da concentração de nitrogênio e o comportamento

deste, como esperado, também acompanhou a mesma redução significativa, sugere-se que a presença destes contaminantes lixiviou parte desta proteína bruta ou mesmo parte deste nitrogênio, uma vez que não fora determinada a concentração de nitrogênio proteico e não proteico.

Níveis inferiores de proteínas presentes na casca dos ovos podem causar deficiência para o embrião, ocasionando um desenvolvimento lento e comprometendo funções importantes no metabolismo. Em análise das carcaças advindas do presente estudo (Mendonça et al., 2021, não publicado), verificou-se menor biomassa corpórea, retardo no desenvolvimento e malformações ósseas em todos os embriões expostos ao glifosato, fipronil e suas associações. Os resultados do presente estudo são corroborados ainda por Ferreira et al. (2016) com concentrações semelhantes ao do grupo controle em análises de casca de ovos de *P. expansa* em incubação livre de contaminantes (49,90%). De acordo com Cox et al. (1984), alterações nas taxas de proteína das cascas de ovos causam modificações no cálcio associado, o que pode comprometer desde a estrutura e conformidade dos ovos como a formação óssea dos embriões.

Com relação à concentração de extrato etéreo, no grupo Controle observou-se níveis muito baixos, cerca de $0,17 \pm 0,03$, ou seja uma amplitude de 0,14 a 0,20%, o que pode ser considerado como uma fração sem importância na composição da casca ou até mesmo uma pequena translocação de lipídio do conteúdo interno do ovo. Com relação aos demais tratamentos, as concentrações lipídicas encontradas não permitem estabelecer uma relação entre os contaminantes e suas concentrações testadas. A exposição ao fipronil alterou os níveis de extrato etéreo na casca dos ovos de *P. expansa* ao longo da incubação, produzindo aumento de 1.176% no teor deste componente, independentemente da concentração de exposição. Já o glifosato apresentou um aumento de lipídio de 418% no tratamento G1 e de 153% no tratamento G2, em relação à concentração na casca dos ovos do Controle.

Nossos resultados diferem de Valdes et al., (2015), ao concluírem que o inseticida parationa metílica reduz os níveis de gordura total das cascas durante a incubação. Por outro lado, como o embrião se encontra em desenvolvimento no conteúdo interno, em especial no saco vitelínico, e é nesse local que há grande presença de lipídeos, infere-se que a presença destes contaminantes na casca poderiam atrair gordura a partir do conteúdo interno do ovo. Em trabalho de Ferreira et al. (2016), os autores encontraram concentração de 0,07% de extrato etéreo no grupo controle em análises de casca de ovos de *P. expansa* em incubação livre de contaminantes, reforçando a hipótese de uma fração sem importância ou mesmo advinda do conteúdo interno do ovo.

Trabalhos semelhantes sobre avaliação da composição química de ovos de *P. expansa* em incubação artificial com exposição aos agrotóxicos atrazina (2, 20 e 200µg/L) e parationa metílica (35, 350 e 3500µg/L), também apresentaram diferença entre teores de extrato etéreo (Souza, 2013; Valdes et al., 2015). Em ambos os trabalhos houve contaminação do substrato apenas no primeiro dia de incubação, mas De Solla e Martin, (2011) demonstraram que a absorção de pesticidas nos ovos durante a incubação aumenta com a magnitude e duração da exposição, o que pode justificar o maior impacto na composição das cascas do presente estudo.

A exposição ao fipronil alterou os níveis de extrato etéreo na casca dos ovos de *P. expansa* ao longo da incubação, sendo mais tóxico e produzindo aumento significativo no teor deste componente, independentemente da concentração de exposição. Sabe-se que a casca desempenha a importante função de transporte de gases e líquidos durante a incubação (Andréa, 2008; Ferreira et al., 2016). Deste modo infere-se que um aumento no extrato etéreo afetará os mecanismos e/ou taxas de transporte, podendo interferir no desenvolvimento embrionário, verificado nas análises dos embriões advindos dos ovos expostos no presente estudo (Mendonça et al. 2021, não publicado). Répteis com ovos de casca flexível, como *P. expansa*, são mais sensíveis à variação hídrica no ambiente, e o metabolismo embrionário é diretamente afetado pela disponibilidade de água (Packard et al., 1982). Com o aumento da gordura total, o transporte da água através da casca pode ser minimizado (Packard et al., 1980), corroborando os resultados da análise de matéria mineral e matéria seca deste estudo.

Variações na quantidade de lipídios em um organismo podem servir como biomarcadores para avaliação de respostas biológicas que indiquem exposição a agrotóxicos (Andréa, 2008). De forma paralela, maiores investigações podem determinar valores esperados de extrato etéreo em cascas de ovos de répteis e identificar padrões de alterações provocados por agrotóxicos, permitindo sua utilização como biomarcador de contaminação ambiental (Andréa, 2008, Ferreira et al., 2016).

Em estudo referente a composição química dos ovos de Testudines verificou-se que a casca confere tão bem o isolamento do embrião a partir do ambiente que nem mesmo a umidade externa pode influenciar no desenvolvimento dos filhotes, a não ser em condições extremas (Lesem e Dmi'el, 1986). No entanto, apesar de ser uma importante barreira de proteção para o embrião contra agrotóxicos, em relação à formação do esqueleto axial e genotoxicidade, estudos demonstram que a casca não impediu que os agrotóxicos alcançassem o conteúdo interno do ovo e promovessem alterações em ossículos esclerais e nas hemácias de embriões de *P. expansa* expostos a diferentes agrotóxicos (Carneiro et al.,

2019; De OLiveira et al., 2020; Mendonça et al., 2021, não publicado). Esses últimos achados ressaltam a importância de avaliação dos efeitos dessas substâncias na capacidade de proteção das cascas, ao alterar sua composição química.

De modo geral, as alterações evidenciadas na constituição química da casca de ovos de *P. expansa* submetidas aos contaminantes sugerem que os agrotóxicos comerciais Glifosato Atar 48® e Fipronil Regent® 800WG interferiram na dinâmica destes constituintes ao longo da incubação, não havendo sinergismo na associação de ambos os agrotóxicos em comparação com a exposição a cada um isoladamente. Os resultados corroboram Kalipci et al. (2010) que afirmam que entre os fatores que podem influenciar as alterações nos constituintes das cascas dos ovos está a contaminação dos ninhos com substâncias agrotóxicas, apesar de estudo da reconstrução do estado ancestral da casca de Testudines ter demonstrado que os ovos se tornaram menos finos e porosos ao longo do tempo evolutivo (D' Alba et al., 2021) o que poderia amenizar efeitos dos contaminantes nos embriões. Todavia, não são bem conhecidos os possíveis efeitos ecológicos dos agrotóxicos e tampouco sua interferência nas cascas dos ovos de *P. expansa* ou em outros répteis, sendo assim, de fundamental importância investigações sobre os riscos ambientais e ecológicos em razão do uso destes contaminantes na agricultura.

4.4. Conclusão

A exposição continuada de ovos férteis da espécie *Podocnemis expansa* aos agrotóxicos comerciais glifosato, fipronil e associação, durante 44 dias de incubação artificial, interferiu acarretando redução no teor de umidade, proteína bruta e aumento do extrato etéreo na casca dos ovos. Tendo em vista a importância dessa estrutura para o desenvolvimento e sucesso reprodutivo da espécie, sugere-se mais estudos a respeito dos verdadeiros impactos desses contaminantes em organismos não-alvo afim de evitar maiores danos à biodiversidade.

Apoio financeiro

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) e ao Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Répteis e

Anfíbios (RAN) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) por permitir a realização deste estudo.

4.5. Referências

ABRASCO - Associação Brasileira De Saúde Coletiva. 2015. Dossiê Abrasco: Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Rio de Janeiro / São Paulo: ABRASCO. Disponível em: < http://www.abrasco.org.br/dossieagrototoxicos/wp-content/uploads/2013/10/DossieAbrasco_2015_web.pdf. Acesso em: 14 de julho de 2021.

Alves-Júnior, J.R.F., Lustosa, A.P.G., Bosso, A.C.S., Balestra, R.A.M., Bastos, L.F., Miranda, L.B., Santos, A.L.Q. 2012. Reproductive indices in natural nests of giant Amazon river turtles *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) (Testudines, Podocnemididae) in the Environmental Protection Area Meanders of the Araguaia river. Braz J Biol. 72, 199–203.

Andréa, M.M. 2008. Bioindicadores ecotoxicológicos de agrotóxicos. Infobibos. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2008_4/Bioindicadores/index.htm>. Acesso em: 12 de julho de 2021.

Beckie, H.J., Flower, K.C., Ashworth, M.B. 2020. Farming without Glyphosate? Plants. 9 (96), 1-15.

Booth, D.T., Yu, C.Y. 2009. Influence of the Hydric Environment on Water Exchange and Hatchlings of Rigid-Shelled Turtle Eggs. Physiol Biochem. Zool. 82 (4), 382-387.

Campos-Casal, F.H., Cortez, F.A., Gomez, E.I., Chamut, S.N. 2020. Chemical composition and microstructure of recently oviposited eggshells of *Salvator merianae* (Squamata: Teiidae). Herpetological Conservation and Biology. 15(1):25–40.

Carneiro, I.V., Vieira, L.G.; Mendonça, J.M., Hirano, L.Q.L., Valdes, S.A.C., Menezes - Reis, L.T., Santos, A.Q. 2019. Development of scleral ossicles in *Podocnemis expansa* (Testudines: Podocnemididae) embryos exposed to atrazine. Drug and Chemical Toxicology. 14, 1-6.

CFMV - Conselho Federal De Medicina Veterinária. 2012. Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais e dá outras providências. Resolução Nº 1000, de 11 de maio de 2012.

Chaulet, F.C., Barcellos, H.H.A., Fior, D.; Pompermaier, A., Koakoski, G., Rosa, J.G.S., Fagundes, M., Barcellos, L.J.G. 2019. glyphosate- and fipronil-based agrochemicals and their mixtures change zebrafish behavior. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 77 (3), 443-451.

Compêndio Brasileiro de alimentação animal. 2009. Métodos analíticos. Brasília. Ministério da agricultura e dos Abastecimentos.

Cox, D.L., Koob, T.J., Mecham, R.P., Sexton, O.J. 1984. External incubation alters the composition of squamate eggshells. Comparative Biochemistry and Physiology. 79(3), 481-487.

Cusack, M., Fraser, A.C., Stachel, T. 2003. Magnesium and phosphorus distribution in the avian eggshell. *Comp Biochem Physiol Part B* 134: 63–69.

D'Alba, L., Goldenberg, J., Nallapaneni, A., Parkinson, D.Y., Zhu, C., Vanthournout, B., Shawkey, M. D. 2021. Evolution of eggshell structure in relation to nesting ecology in non-avian reptiles. *Developmental Morphology and Evolution of Amniote Eggs and Embryos*. 282 (7), 1066-1079.

De Oliveira, J.S.P., Vieira, L.G., Carvalho, W.F., De Souza, M.B., Rodrigues, A.S. L., Simões, K., Silva, D.M., Mendonça, J.S., Hirano, L.Q.L., Santos, A.L.Q., Malafaia, G. 2020. Mutagenic, genotoxic and morphotoxic potential of different pesticides in the erythrocytes of *Podocnemis expansa* neonates. *Science of the Total Environment*. 737,140304.

Deeming, D.C. 2018. Nesting environment may drive variation in eggshell structure and egg characteristics in the Testudinata. *J. Exp. Zool.* 329, 331–342.

De Solla, S.R., Martin, P.A. 2011. Absorption of current use pesticides by snapping turtle (*Chelydra serpentina*) eggs in treated soil. *Chemosphere*. 85 (5), 820-825.

Dupre, A., Devaux, B., Bonin, F. 2007 *Turtles of the World*. A & C Black Publishers Ltd, London, 416 p.

Ferguson. M.W.J. 1981. Extrinsic Microbial Degradation of the Alligator Eggshell. *Science*, 214.

Ferreira, C.H., Vieira, L.G., Valdes, S.A.C. Mendonça, J.S., Fernandes, E.A., Santos, A.L.Q. 2016. Chemical characteristics and thickness of *Podocnemis expansa* posthatching eggshells (Testudines, Podocnemididae). *Acta Scientiarum. Biological Science*, 38 (2), 195-200.

Gupta, R.C., Anado´ A. 2018. Chapter 42 – Fipronil. *Veterinary Toxicology (Third Edition). Basic and Clinical Principles*. 533-538.

Kalipci E, Ozdemir C, Ozta F, Sahinkaya S. 2010. Ecotoxicological effects of methyl parathion on living things and environment. *Afr J Agric Res*. 5, 712-718.

Kitimasak, W., Thirakhupt, K., Moll, D.L. 2003. Eggshell structure of the siamese narrow-headed softshell turtle *Chitra chitra* Nutphand, 1986 (Testudines: Trionychidae). *Sciences Asia*. 29, 95-98.

Kusuda, S., Yasukawa, Y., Shibata, H., Saito, T., Doi, O., Ohya, Y., Yoshizaki, N. 2013. Diversity in the matrix structure of eggshells in the Testudines (Reptilia). *Zoological Science*. 30(5), 366-374.

Lesem, A., Dmi'el, R. 1986. Water loss from *Trionyx triunguis* eggs incubating in natural nests. *Herpetol. J.* 1, 115-117.

Mendonça, J.S., Hirano, L.Q.L., Santos, A.L.Q., Silva, D.M., Pereira, C.C., Costa, M.S., Lima, P.N., Malafaia, G., Andrade, D.V., Vieira, L.G. Exposição in ovo a formulações comerciais de glifosato e fipronil retarda o crescimento e altera o desenvolvimento ósseo de embriões de Tartarugas-da-Amazônia (*Podocnemis expansa*, Testudines, Podocnemididae). Não publicado.

- Ministério Da Saúde. 2018. Relatório Nacional de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/relatorio_nacional_vigilancia_populacoes_expostas_agrotoxicos.pdf. Acesso em: 02 de julho 2021.
- Oost, R.V., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol Pharmacol.* 13: 57–149.
- Packard, M. J., Packard, G. C., Boardman, T. J. 1982. Structure of eggshells and water relations of reptilian eggs. *Herpetologica* 38, 136–155.
- Packard, M. J. 1980. Ultrastructural morphology of the shell and shell membrane of eggs of common snapping turtles (*Chelydra serpentina*). *J Morphol.* 165, 197–204.
- Sahoo, G., Sahoo, R.K., Mohanty-Hejmadi, P. 1998. Calcium metabolism in olive ridley turtle eggs during embryonic development. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 121(1), 91-97.
- Souza, R.R. 2013. Efeitos da atrazina na composição química e morfologia de cascas de ovos de *Podocnemis expansa* (Testudines, Podocnemididae) incubados artificialmente. 53p. Dissertação de Mestrado em Saúde Animal - Programa de Pós-Graduação Ciências Veterinárias, Uberlândia, Minas Gerais.
- Souza, L.C.G.M. 2015. Análise da composição química de cascas de ovos de *Podocnemis unifilis* (Testudines, Podocnemididae) incubados artificialmente. 14p. Iniciação Científica- Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Uberlândia, Minas Gerais
- Sparling, D.W., Matson, C., Bickham, J., Doelling-Brown, P. 2006. Toxicity of glyphosate as glypro® and L1700 to red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*) embryos and early hatchlings. *Environ Toxicol Chem.* 25, 2768–2774.
- Webb, J. K., Shine, R.; Christian, K. A. 2006. The Adaptive Significance of Reptilian Viviparity in the Tropics: Testing the Maternal Manipulation Hypothesis. *Evolution*, 60(1), 115-122.
- Wink, C. S., Elsey, R. M. 1994. Morphology of shells from viable and nonviable eggs of the chinese alligator (*Alligator sinensis*). *Journal of Morphology*, 222(1), 103–110.
- Wilkinson, L. 1990. Systat: The system for statistics. Systat Inc., Evanston, Illinois, 822 p.
- Valdes, S.A.C., Vieira, L.G., Ferreira, C.H., Mendonça, J.S., Ribeiro, P.R.Q., Fernandes, E.A., Santos, A.L.Q. 2015. Effects of Exposure to Methyl Parathion on Egg Hatchability and Eggshell Chemical Composition in *Podocnemis expansa* (Testudines, Podocnemididae). *Zoological Science.* 32 (2), 135-140.
- Van Der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 13, p. 57-149.

Capítulo 5 - Mutagenicidade, hepatotoxicidade e neurotoxicidade dos pesticidas glifosato e fipronil em neonatos de Tartarugas-da-Amazônia (*Podocnemis expansa*)

Resumo:

Os agrotóxicos são considerados como um dos principais causadores de declínio populacional de répteis em todo o mundo. Dentre esses animais, as tartarugas de água doce são particularmente susceptíveis a contaminação aquática. Nesse contexto, objetivou-se investigar os potenciais efeitos mutagênico, hepatóxico e neurotóxico em neonatos de *P. expansa* expostos a substrato contaminado com diferentes concentrações de glifosato e/ou fipronil durante incubação artificial. Para isso, ovos coletados no ambiente natural foram incubados artificialmente em areia umedecida com água contendo glifosato Atar 48 nas concentrações de 65µg/L ou 6500µg/L e fipronil Regent 800WG a 4µg/L ou 400µg/L, ou sua associação. A exposição combinada se deu a partir de 65µg/L de glifosato e 4µg/L de fipronil e 6500µg/L de glifosato com 400µg/L de fipronil. Para análise de mutagenicidade foi avaliado a frequência de micronúcleo (MN) e demais anormalidades nucleares eritrocitárias (ENAs), enquanto que para avaliação de hepatotoxicidade e neurotoxicidade, foi analisado fígados e encéfalos de neonatos de *P. expansa* dos grupos experimentais. Os resultados do presente estudo demonstram que a exposição aos agrotóxicos testados, isoladamente ou em combinação, resultam em aumento na frequência de anomalias nucleares eritrocitárias, sendo o núcleo com brotamento, deslocado e entalhado, as anormalidades mais presentes. Em análises histopatológicas, as alterações foram evidenciadas sobretudo nos indivíduos expostos ao fipronil, sendo que o tecido hepático apresentou alterações estruturais de congestão e infiltrado inflamatório, e no encéfalo foram verificadas as alterações de congestão e necrose. Em conclusão, o presente estudo confirma a hipótese de que a incubação dos ovos em substrato poluído com glifosato e fipronil acarreta danos citogenéticos e histopatológicos nos neonatos de *P. expansa*, evidenciando a importância de se utilizar diferentes biomarcadores para avaliar os efeitos ecotoxicológicos destes pesticidas em Testudines.

Palavras-Chave: Anormalidades eritrocitárias, ecotoxicologia, histopatologia, micronúcleo, Testudines.

5.1. Introdução

A perda da biodiversidade global causada sobretudo pela poluição ambiental é uma ameaça iminente para muitos grupos taxonômicos de vertebrados, incluindo os répteis (Böhm

et al. 2013; Mingo 2017). De acordo com a União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN), estima-se que 15-32% da diversidade mundial de répteis esteja ameaçada (Cox e Temple 2009; Mingo 2019), sendo os agrotóxicos um dos principais causadores de declínio populacional desse táxon em todo o mundo, juntamente com perda e degradação de habitat, espécies invasoras introduzidas, doenças, uso insustentável e mudanças climáticas globais (Böhm et al. 2013; Mingo et. al., 2017; Mingo 2019). Frequentemente herbicidas à base de glifosato são utilizados para a dessecação de áreas para o cultivo de arroz, soja e milho, entre outras culturas, enquanto, o inseticida fipronil é usado para tratar as sementes das mesmas culturas (Chaulet et al, 2019).

Representando o táxon menos estudado entre os grupos de vertebrados, correspondendo a menos de 1% dos estudos de ecotoxicologia (Sparling et al., 2010; Mingo 2019), muitas espécies de répteis são caracterizadas pela fidelidade as suas pequenas áreas de vida, frequentemente apresentando baixas capacidades de dispersão com poucas habilidades para escapar da exposição a pesticidas (Southwood e Avens, 2009; Mingo et. al., 2017). Apesar de serem escassos os estudos sobre os efeitos toxicológicos de pesticidas em répteis, já foram observados efeitos potencialmente letais (Chang et al., 2016; Weir et al., 2014, Emery et al. 2021) bem como diversos efeitos subletais. Estes últimos integram uma série de implicações que vão desde respostas hormonais e enzimáticas, estresse oxidativo, reações fisiológicas e imunológicas, alterações morfológicas, prejuízos na fertilidade, desenvolvimento e desempenho locomotor (Hopkins e Winne, 2006; Amaral et al., 2012; Bicho et al., 2013; Carpenter et al., 2016; Schaumburg et al., 2016; Latorre et al., 2016; Mingo et. al., 2017; Hirano et al., 2019).

Sendo um importante modelo para estudos toxicológicos, as tartarugas de água doce desempenham papéis importantes nos ecossistemas por meio de sua grande biomassa, alta produtividade secundária e contribuição para o fluxo de energia dentro e entre os ecossistemas (Lovich et al., 2018; Forero-Medina et al., 2019). A espécie *Podocnemis expansa* em particular, conhecida popularmente como tartaruga-amazônica, consiste no maior Testudines de água doce da América do Sul, apresentando ampla distribuição pelos rios Orinoco e Amazonas em oito países (Vogt, 2008; Vogt et al., 2015; Santos e Fiori, 2020). Esta espécie é particularmente vulnerável, já que possui uma extensa história de exploração com a instalação humana ao longo desses rios e a comercialização de sua carne e ovos, o que resultou em populações esgotadas em toda a área de distribuição da espécie (Santos e Fiori, 2020).

Como os pesticidas podem causar efeitos adversos em diversos tipos de organismos, a análise morfológica de células sanguíneas, particularmente eritrócitos, tornou-se um

importante biomarcador de contaminação ambiental (López González, 2017; Lopes et al., 2021). A avaliação de micronúcleo (MN) é uma técnica amplamente utilizada para avaliar aberrações cromossômicas estruturais e numéricas induzidas por agentes clastogênicos e/ou aneugênicos (López González, 2017). Sendo um exemplo extremo de atipia nuclear, o MN consiste em uma estrutura nuclear isolada separada do núcleo principal (Kwon et al., 2020). Seu surgimento ocorre por meio de cromossomos atrasados ou fragmentados causados por erros mitóticos ou danos ao DNA (Fenech et al., 2011; Mesak et al., 2019). Complementar ao teste de MN, as análises de demais anormalidades nucleares eritrocitárias (ENAs) são incluídas nas avaliações de genotoxicidade, fornecendo evidências sobre os potenciais efeitos mutagênicos de agentes químicos, físicos e biológicos (Schaumburg et al., 2016; Russo e Degrassi, 2018; Lopes et al., 2021).

Análises histopatológicas de órgãos essenciais como o fígado e encéfalo também desempenham um papel vital para estudos ecotoxicológicos. O fígado em animais ectotérmicos apresenta tanto os hepatócitos quanto células melanomacrófagos que atuam na limpeza do organismo auxiliando nos processos inflamatórios, na remoção de eritrócitos velhos e na transformação de substâncias e/ou moléculas estranhas para sua excreção (Steinel e Bolnick, 2017; Lopes et al., 2021). Com relação ao encéfalo, muitas vezes ignorado em estudos de ecotoxicidade, a ocorrência de comportamentos neurotóxicos está intimamente relacionadas ao acúmulo de agrotóxicos no cérebro e o comprometimento deste tecido pode levar à redução de sua função, alterando fisiologia e o comportamento (Lakshmaiah, 2017).

Alterações genéticas e/ou histopatológicas hepáticas e cerebrais já foram evidenciadas em diversos estudos com répteis (López González et al. 2017; Mesak et al. 2019, Araújo et al., 2019; De-Oliveira et al., 2020, Verderame e Scudiero, 2019, Lopes et al. 2021), no entanto, pouco se sabe sobre os reais impactos biológicos advindos da exposição indireta de agrotóxicos e sua associação na saúde de répteis aquáticos. Sendo o glifosato e fipronil os agrotóxicos mais utilizados no Brasil e no mundo (Simon-Delso et al., 2015; Beckie et al., 2020) e frequentemente encontrados em corpos hídricos (Chaulet et al., 2019, Agostini et al., 2020), objetivou-se investigar os potenciais efeitos mutagênico, hepatóxico e neurotóxico em neonatos de *P. expansa* expostos a substrato contaminado com diferentes concentrações de glifosato e/ou fipronil durante incubação artificial.

5.2. Material e Métodos

5.2.1. Coleta de Materiais Biológicos

A incubação dos ovos durou 54 dias e, após o período de eclosão, os recém-eclodidos foram mantidos durante cinco dias dentro das incubadoras em bandejas com água. Os neonatos de *P. expansa* foram submetidos a contenção física e anestesiados seguindo os critérios propostos pela American Society of Ichthyologists and Herpetologists. Por meio de uma agulha de seringa esterilizadas (13x 0,30 comprimento - 30G ½ descartável), procedeu-se a coleta de 30µl de sangue periférico do seio venoso supraoccipital (Medeiros, 2012). Em seguida, foram realizados esfregaços sanguíneos em lâminas previamente higienizadas (três lâminas por animal – n=15/grupo) para análise de micronúcleos e demais anormalidades nucleares eritrocitárias.

A eutanásia foi realizada conforme previsto na resolução do Conselho Federal de Medicina Veterinária nº 1000/2012, mediante sobredose de tiopental sódico (Thiopentax®, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Itapira, SP, Brasil), administrado por via intracelomática (CONCEA, 2018). Imediatamente após a eutanásia, fígado e cérebro foram coletados para histopatologia.

5.2.1.1. Teste de micronúcleo e outras anormalidades nucleares eritrocitárias

A análise de eritrócitos circulantes periféricos maduros foi realizada em cinco neonatos de cada tratamento (n=5) para avaliação da mutagenicidade de indivíduos expostos as formulações comerciais de glifosato e/ou fipronil. Três esfregaços foram obtidos de cada amostra com 10µL de sangue por lâmina limpa. Após sua total secagem (24 horas), essas lâminas foram fixadas em álcool metílico absoluto, secas a temperatura ambiente (29° C) e coradas com Giemsa em tampão fosfato (pH 6,8) na proporção de 1:10, durante 3 minutos. Os critérios para identificação de um micronúcleo (MN) foram estabelecidos por Fenech (2000) e empregados por Lopes et al. (2021): (i) a intensidade de um MN deve ser semelhante à do núcleo principal, mas com o diâmetro de um terço desse núcleo; (ii) o MN deve ser redondo, com membrana nuclear, desconectado do núcleo principal e (iii) localizado dentro do citoplasma e não se sobrepõe ao núcleo principal. Além dos NMs, foi identificado um conjunto de anormalidades nucleares eritrocitárias (ENAs), seguindo Mesak et al. (2019): núcleos com brotamentos, eritrócitos binucleados, núcleos reniformes, constrictões simétricas e assimétricas, núcleos multilobados, núcleos deslocados e núcleos entalhados. Todas as lâminas foram analisadas em microscópio óptico com lente de imersão em um aumento de 100x por um único pesquisador. Foram analisados 6.000 eritrócitos circulantes por indivíduo (2.000/lâmina). As análises foram realizadas de maneira aleatória e não foram considerados eritrócitos sobrepostos.

5.2.1.2. Histopatologia hepática e cerebral

Para a análise histopatológica, fígados e encéfalos de cinco neonatos de *P. expansa* (n=5) foram extraídos de cada grupo experimental. Seguindo protocolo de Behmer et al. (1976), amostras deste material foram fixadas em formaldeído tamponado a 10% com fosfato (0,1M, pH 7,2) por 24 horas, seguido da adição em álcool 70% e submetidos ao processo de inclusão em parafina. Após inclusão, os órgãos foram cortados (5µm de espessura), depositados em lâminas microscópicas e corados com Hematoxilina-eosina para avaliação em microscopia óptica. As lâminas foram examinadas qualitativamente para a presença das seguintes alterações estruturais teciduais: esteatose, congestão, infiltrado inflamatório e necrose (Moura, 2009; Firmiano, 2013). De acordo com a sua presença no tecido, foi categorizado quatro estágios de alterações: tecidos sem alteração (1), alteração discreta (2), alteração moderada (3) e alteração acentuada (4).

5.2.2. Análise estatística

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para analisar a normalidade dos dados para todas as análises. Em sequência foi utilizado o teste de Análise de Variância (ANOVA) com post-hoc de Tukey ou o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com post-hoc de Dunn por meio do software SYSTAT 10.2 (Wilkinson, 1990). Para análise das anormalidades nucleares eritrocitárias foi empregado também o teste de Mann-Whitney para comparação entre duas amostras independentes. Para todas as análises, as diferenças foram consideradas significativas ao nível de 5% de significância. Os gráficos foram confeccionados no Microsoft Excel 2013. As imagens foram escaneadas com o auxílio do scanner de lâminas Scanscope AT Turbo, analisadas por meio do software Aperio ImageScope 12.4.3 e a confecção das figuras foi realizada por meio do software CorelDraw 2018 (64-Bit).

5.3. Resultados

5.3.1. Mutagenicidade

A frequência de eritrócitos normais foi significativamente diferente apenas entre o grupo controle e G1 (U=78.000; p= 0,034) (Tabela 5-1). Com relação a frequência de MNs, o grupo experimental F1 diferiu em comparação com controle (U=18.000; p=0,017). Dentre as demais ENAs, houve maior frequência de núcleos com brotamento em G1 (U=23.500; p=0,045) e deslocados em GF1 (U=10.000; p=0,004) quando comparados ao grupo controle,

sendo o núcleo com brotamento, deslocado e entalhado, as anormalidades mais presentes nas análises (Figura 5-1).

Tabela 5-1. Frequência (média $\pm$ erro padrão) de micronúcleos e outras anormalidades nucleares eritrocitárias evidenciadas em recém-eclodidos de *Podocnemis expansa* expostos ou não - *in ovo* - ao glifosato e fipronil (isoladamente ou em combinação).

Anormalidades nucleares	Controle	G1	G2	F1	F2	GF1	GF2
Eritrócito normal	90.79 $\pm$ 1.60	86.56 $\pm$ 1.52*	89.05 $\pm$ 2.45	89.04 $\pm$ 0.82	92.67 $\pm$ 0.82	88.45 $\pm$ 2.61	89.43 $\pm$ 0.96
Núcleo com brotamento	2.94 $\pm$ 0.51	4.65 $\pm$ 0.73*	3.61 $\pm$ 1.01	3.51 $\pm$ 0.62	2.32 $\pm$ 0.32	2.65 $\pm$ 0.54	2.83 $\pm$ 0.01
Eritrócito binucleado	0.02 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.01	0.03 $\pm$ 0.01	0.03 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.01
Núcleo reniforme	0.01 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.03
Constricção simétrica	0.02 $\pm$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.01	0.03 $\pm$ 0.01
Constricção assimétrica	0.03 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.03	0.03 $\pm$ 0.01	0.09 $\pm$ 0.03	0.03 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.03	0.03 $\pm$ 0.01
Núcleo multilobado	0.99 $\pm$ 0.19	1.08 $\pm$ 0.17	1.16 $\pm$ 0.33	1.18 $\pm$ 0.22	0.77 $\pm$ 0.15	1.10 $\pm$ 0.29	0.71 $\pm$ 0.14
Núcleo deslocado	1.20 $\pm$ 0.20	1.53 $\pm$ 0.19	0.95 $\pm$ 0.18	1.49 $\pm$ 0.25	0.91 $\pm$ 0.17	2.86 $\pm$ 0.54*	2.29 $\pm$ 0.54
Núcleo entalhado	3.93 $\pm$ 0.84	5.86 $\pm$ 0.77	5.32 $\pm$ 1.17	4.86 $\pm$ 0.50	3.09 $\pm$ 0.42	3.48 $\pm$ 1.04	4.47 $\pm$ 0.76
Eritrócito micronucleado	0.01 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.03	0.03 $\pm$ 0.01	0.09 $\pm$ 0.02*	0.08 $\pm$ 0.03	0.03 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.02

*Diferença estatística em relação ao grupo controle de acordo com o Teste de Kruskal-Wallis com comparações entre duas amostras utilizando o teste de Mann-Whitney, com nível de significância de 5%. Tratamentos: G1- glifosato 65 μ g/L; G2- glifosato 6500 μ g/L; F1- fipronil 4 μ g/L; F2- fipronil 400 μ g/L; GF1- glifosato 65 μ g/L associado ao fipronil 4 μ g/L; GF2- glifosato 6500 μ g/L associado ao fipronil 400 μ g/L.

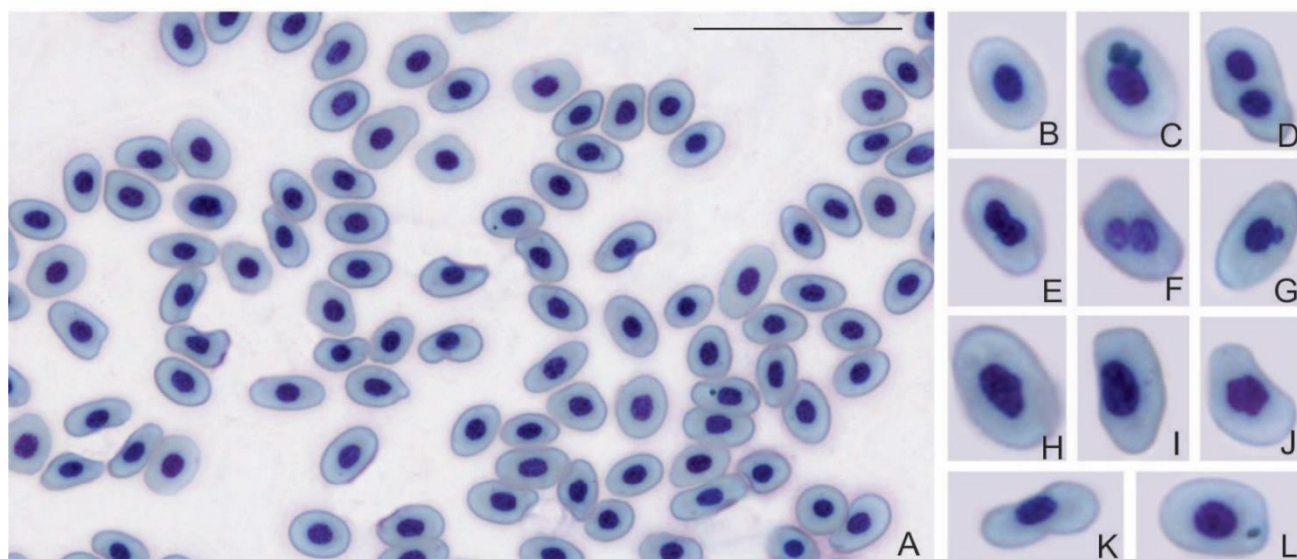


Figura 5-1: Anormalidades nucleares eritrocitárias identificadas em neonatos *P. expansa* expostos ou não ao glifosato e fipronil, isoladamente ou em combinação, em incubação artificial. A- Fotomicrografia representativa dos eritrócitos; B- Eritrócito normal; C- Núcleo com brotamento; D- Eritrócito binucleado; E- Núcleo reniforme; F- Constricção simétrica; G- Constricção assimétrica; H- Núcleo multilobado; I- Núcleo deslocado; J- Núcleo entalhado; K- Núcleo deslocado; L- Eritrócito micronucleado. Escala: 60 μ m.

A frequência total de ENAs diferiu significativamente no grupo experimental G1 com relação ao grupo controle (U=22.000; p=0,034) (Figura 5-2). Diferenças significativas

foram encontradas também entre G1 e F2 ($U=9.000$; $p=0,002$) e entre F1 e F2 ($U=77.500$; $p=0,008$).

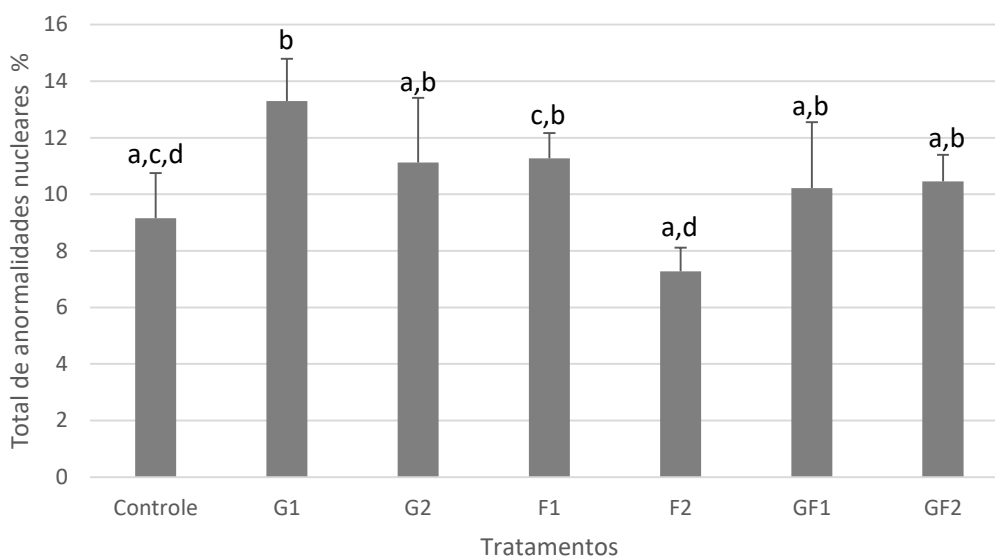


Figura 5-2: Frequência total de anormalidades nucleares eritrocitárias em neonatos de *Podocnemis expansa* expostos ou não ao glifosato e fipronil, isoladamente ou em combinação, em incubação artificial. As barras indicam a média + erro padrão. Os tratamentos com letras distintas diferem significativamente a nível de 5% pelo teste de Kruskal-Wallis com comparações entre duas amostras utilizando o teste de Mann-Whitney. Tratamentos: G1- glifosato 65µg/L; G2- glifosato 6500µg/L; F1- fipronil 4µg/L; F2- fipronil 400µg/L; GF1- glifosato 65µg/L associado ao fipronil 4µg/L; GF2- glifosato 6500µg/L associado ao fipronil 400µg/L.

5.3.2. Histopatologia hepática e cerebral

A estrutura do tecido hepático dos neonatos de *P. expansa* do grupo controle apresentaram alterações estruturais teciduais para congestão, infiltrado inflamatório e necrose classificadas como sem alteração (1) e alteração discreta (2) (Figura 5-3). Com relação a esteatose, a mesma foi considerada como acentuada, sendo estatisticamente semelhantes aos demais grupos tratados com agrotóxicos.

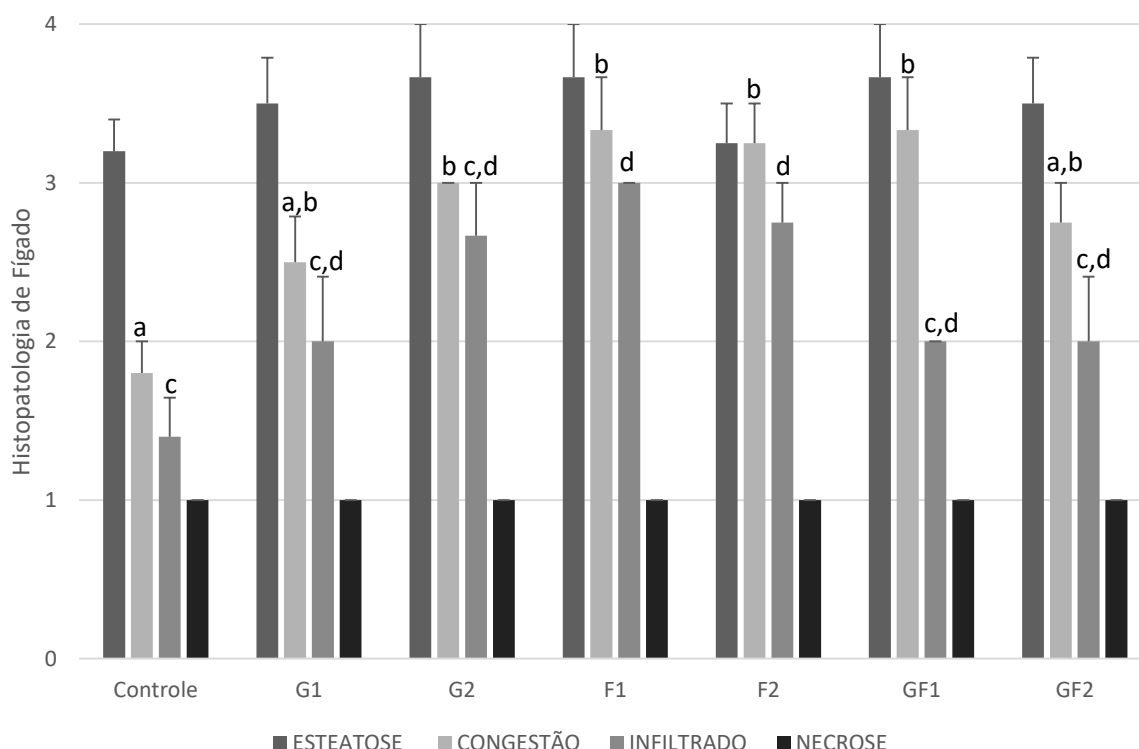


Figura 5-3: Alterações estruturais teciduais em fígado de neonatos de *Podocnemis expansa* expostos ou não ao glifosato e fipronil, isoladamente ou em combinação, em incubação artificial. De acordo com a histopatologia no tecido, foi categorizado quatro estágios de alterações: tecidos sem alteração (1), alteração discreta (2), alteração moderada (3) e alteração acentuada (4). As barras indicam a média + erro padrão. Os tratamentos com letras distintas diferem significativamente a 0,05 pelos testes de Kruskal-Wallis e Dunn. Tratamentos: G1- glifosato 65µg/L; G2- glifosato 6500µg/L; F1- fipronil 4µg/L; F2- fipronil 400µg/L; GF1- glifosato 65µg/L associado ao fipronil 4µg/L; GF2- glifosato 6500µg/L associado ao fipronil 400µg/L.

Análises histopatológicas do fígado revelaram diferença com relação as alterações estruturais de congestão entre o grupo controle e o contaminante fipronil exposto isoladamente nas duas concentrações (F1– $p=0.007$ e F2- $p= 0.005$), além de G2 ($p= 0.046$) e GF1 ($p= 0.007$). Com relação ao infiltrado inflamatório, o grupo controle diferiu apenas de F1 e F2 ($p= 0.021$ e $p= 0.039$, respectivamente) (Figura 5-4). Nenhum tratamento apresentou alterações de necrose no tecido hepático.

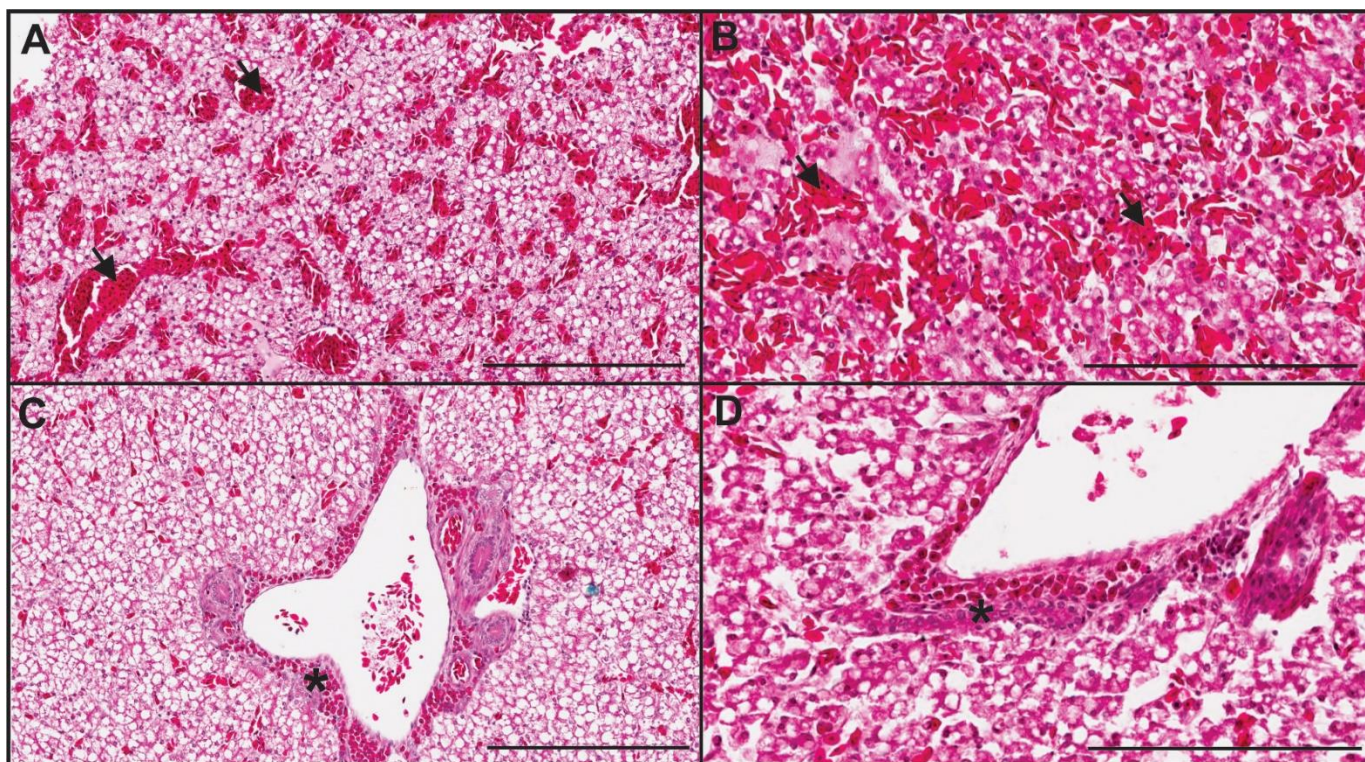


Figura 5-4: Alterações histológicas em fígado de neonatos de *Podocnemis expansa* expostos ou não ao glifosato e fipronil, isoladamente ou em combinação, em incubação artificial. (A) e (B) - Congestão nos vasos (setas) no grupo F2 (fipronil 400µg/L) e GF1(glifosato 65µg/L associado ao fipronil 4µg/L), respectivamente. (C) e (D) - Infiltrado inflamatório com presença de heterófilos (asteriscos) no grupo F1 (fipronil 4µg/L) e F2 (fipronil 400µg/L), respectivamente. Escala: (A) e (C) 300µm; (B) e (D) 200 µm.

Com relação ao encéfalo, a estrutura do tecido cerebral dos neonatos de *P. expansa* do grupo controle não apresentaram nenhuma alteração estrutural tecidual para esteatose, congestão, infiltrado inflamatório e necrose (Figura 5-5).

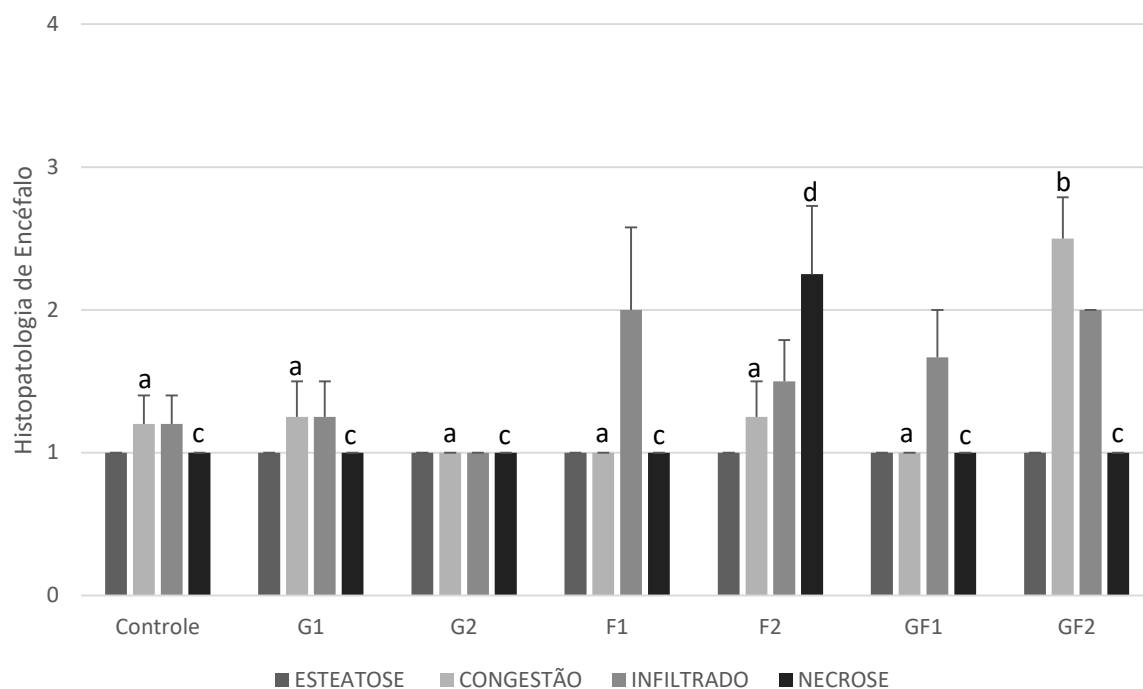


Figura 5-5: Alterações estruturais teciduais em encéfalo de neonatos de *Podocnemis expansa* expostos ou não ao glifosato e fipronil, isoladamente ou em combinação, em incubação artificial. De acordo com a histopatologia no tecido, foi categorizado quatro estágios de alterações: tecidos sem alteração (1), alteração discreta (2), alteração moderada (3) e alteração acentuada (4). As barras indicam a média + erro padrão. Os tratamentos com letras distintas diferem significativamente a 0,05 pelos testes de Kruskal-Wallis e Dunn. Tratamentos: G1- glifosato 65µg/L; G2- glifosato 6500µg/L; F1- fipronil 4µg/L; F2- fipronil 400µg/L; GF1- glifosato 65µg/L associado ao fipronil 4µg/L; GF2- glifosato 6500µg/L associado ao fipronil 400µg/L.

Em análise histopatológicas do encéfalo, verificou diferença com relação as alterações estruturais de congestão e necrose (Figura 5-6). Na congestão, o grupo controle diferiu apenas de GF2 ($p = 0.003$), enquanto que para a necrose o controle diferiu apenas de F2 ($p = 0.002$). Nenhum tratamento apresentou alterações de esteatose e infiltrado inflamatório em análises do encéfalo.

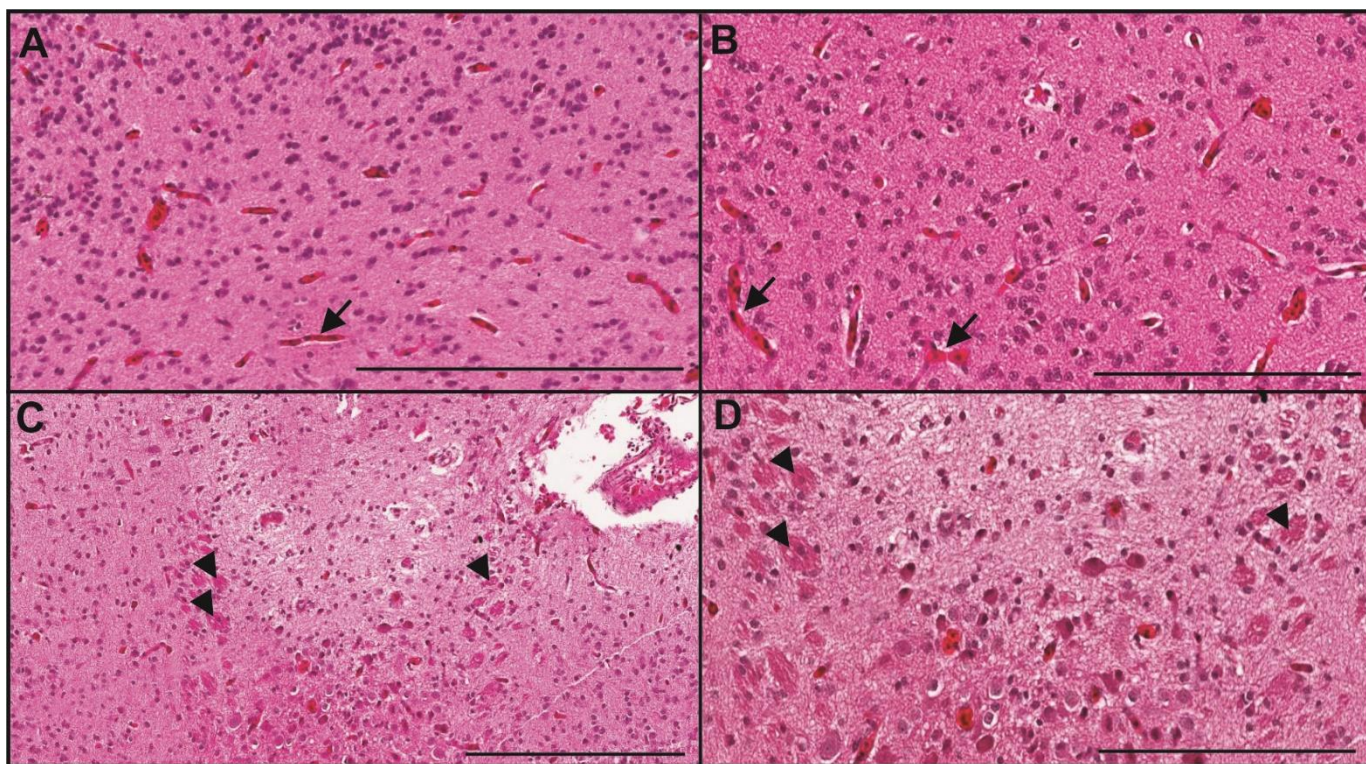


Figura 5-6: Alterações histológicas em encéfalo de neonatos de *Podocnemis expansa* expostos ou não ao glifosato e fipronil, isoladamente ou em combinação, em incubação artificial. (A) e (B) - Congestão nos vasos (setas) no grupo e GF2 (glifosato 6500µg/L associado ao fipronil 400µg/L). (C) e (D) - Necrose (pontas de setas) no grupo F2 (fipronil 400µg/L). Escala: (A) e (C) 300µm e (B) e (D) 200µm.

5.4. Discussão

5.4.1. Mutagenicidade

Os resultados do presente estudo evidenciam que a aplicação do teste de MN e outras ENAs em ensaios toxicológicos são parâmetros úteis na avaliação da ação mutagênica do glifosato Atar 48 e fipronil Regent 800WG em neonatos de *P. expansa*. Essa toxicidade é corroborada por demais trabalhos nos quais foram demonstrados efeitos genotóxicos e mutagênicos em exposição de répteis a contaminantes durante a incubação dos ovos. Com relação ao glifosato, Schaumburg et al. (2016) verificaram que a exposição embrionária de neonatos de *Salvator merianae* ao Roundup® (superiores a 100µg/ovo em aplicação tópica nos ovos) resultou em aumento significativo de MN e ENAs em todas as concentrações testadas. López González et al. (2017) evidenciaram um aumento significativo na frequência de micronúcleo em eritrócitos de *Caiman latirostris* expostos a formulações de PanzerGold® e Roundup® Full II (500, 750, 1000µg/ovo por 70 dias) também em aplicação tópica através do casca de ovo. Outros estudos com a espécie *C. latirostris* (exposição *in ovo*) verificaram aumento na frequência de micronúcleo e danos em eritrócitos quando as concentrações de glifosato aumentavam, reforçadas por alterações enzimáticas e metabólicas (Poletta et al.,

2009; Poletta et al., 2011). Com relação ao fipronil, De-Oliveira et al. (2020) verificaram que a sua exposição (4 e 400µg/L), bem como de glifosato (65 e 6500µg/L) e atrazina (2 e 200µg/L) isoladamente, causaram morfotoxicidade eritrocitária e efeito aneuploidogênico em neonatos de dez dias de *P.expansa* expostos durante incubação artificial dos ovos.

A detecção de anormalidades em eritrócitos fornece um índice de dano genético acumulado durante a vida das células, e sua formação pode representar um processo por meio do qual as células eliminam qualquer material genético amplificado do núcleo (Shimizu et al. 1998, Mesak et al. 2020). O acúmulo de danos no DNA pode ocorrer por meio de um aumento no número de eventos que danificam o material genético ou devido a uma diminuição na capacidade de reparo do DNA e/ou sistema antioxidante (Marques et al., 2014; Schaumburg et al., 2016). Com relação aos agrotóxicos, por exemplo, mecanismos de reparo de DNA mostraram ser suscetíveis a ações inibitórias associadas a níveis mais elevados de constituintes do glifosato e de seus metabólitos, aumentando o dano ao DNA mesmo após o término de sua exposição (Cavaş e Könen, 2007; Marques et al., 2014).

Alterações eritrocitárias como MNs, núcleo com brotamento e deslocado (encontradas em F1, G1 e GF1, respectivamente) cujas frequências individuais foram significativamente maiores em relação ao controle, estão associadas a processos carcinogênicos e a impactos negativos na reprodução, crescimento e sobrevivência dos indivíduos afetados (De-Oliveira et al., 2020). Os MNs podem resultar tanto da fragmentação dos cromossomos quanto das disfunções no aparelho do fuso mitótico, o que acarreta atraso do estágio de anáfase e a incorporação dos cromossomos inteiros e fragmentados no núcleo das células filhas durante a divisão celular (Fenech 2000; Mesak et al. 2019). Sua frequência é o resultado do equilíbrio dinâmico entre a formação de células micronucleadas e sua eliminação (Oliveira et al., 2010; Polard et al., 2011; Schaumburg et al., 2016). Núcleos com brotamento, por sua vez, assim como núcleos reniformes, multilobulados e constritos assimétricos/simétricos representam diferentes precursores dos MNs ou fenômenos binários (Crott e Fenech, 2001; Mesak et al. 2020; De-Oliveira et al., 2020).

A presença anormal de núcleos eritrocitários deslocados no citoplasma das células encontrados em GF1, embora pouco comum em répteis, já foi relatada em estudos envolvendo neonatos de *P. expansa* expostos a nanopartículas de óxido de zinco (NPs ZnO) (Araújo et al., 2019) e ao glifosato e atrazina (De-Oliveira et al., 2020). Sabe-se que elementos estruturais citoesqueléticos mantêm o núcleo na posição central dos eritrócitos, sendo que sua rotação/deslocamento pode ter ocorrido por alterações nas proteínas ou nos mecanismos que formam os microtúbulos, microfilamentos e/ou filamentos intermediários em decorrência da

exposição aos contaminantes, cujos mecanismos de ação podem estar relacionados à excessiva produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Mesak et al. 2020; De-Oliveira et al., 2020). De acordo com esses autores, a indução do estresse oxidativo pela exposição ao glifosato é bem documentada em diferentes modelos animais, incluindo animais do grupo dos répteis, reforçando essa hipótese (Burella et al., 2018; Lajmanovich, et al., 2019; Hussain et al., 2019; Bali et al., 2019; Turkmen et al., 2019). Apesar de não ter sido evidenciada em suas duas concentrações isoladas (G1 e G2), chama-se a atenção que a contaminação utilizado no presente estudo foi indireta, por meio do substrato contaminado, o que pode ter minimizado a toxicidade deste composto para os organismos alvos. Com relação a binucleação, com resultados não significativos no presente estudo, a mesma representa um indicador de divisão celular anormal devido ao bloqueio de citocinese, o que pode levar ao desequilíbrio genético em células e estar envolvida na carcinogênese (Çavas et al. 2005; Yasui et al. 2015).

A presença de MNs e outras anormalidades nucleares eritrocitárias encontradas apenas nas menores concentrações testadas, isoladamente e em associação, ressalta a ausência de efeitos dependentes da dose exposta aos contaminantes. Resultado semelhante foi encontrado por De-Oliveira et al., (2020), onde os autores verificaram aumento significativo na frequência individual de núcleos multilobulados, deslocados e entalhados em neonatos de *P. expansa*, sobretudo em doses baixas de glifosato, fipronil e atrazina.

A exposição a contaminantes durante estágios críticos de desenvolvimento pode ter consequências graves e permanentes evidenciadas no decorrer da vida desses animais (Burella et al., 2016). Frequentemente os primeiros estágios de vida de organismos ovíparos exibem maior grau de sensibilidade toxicológica à contaminantes químicos se comparados com adultos (López González et al., 2017). Isso ocorre sobretudo devido a imaturidade dos sistemas de reparo e desintoxicação, o que pode aumentar a suscetibilidade de alguns filhotes a fatores que afetam sua sobrevivência, como a resposta a diferentes tipos de infecções ou estresse induzido por contaminantes (López González et al., 2017). Para filhotes de *P. expansa* recém eclodidos, a aptidão individual é extremamente importante, pois tal característica garante a possibilidade de atingir o ambiente aquático e de crescimento (Mesak et al. 2020).

Ovos de *P. expansa* precisam de 47 a 64 dias para eclodir na natureza e muitas vezes os recém-nascidos mais jovens permanecem nas câmaras dos ninhos por vários dias até que o saco vitelino seja absorvido (Kuchling 1999; Gomes e Ferreira Júnior, 2011; Magalhães, 2017; Simoncini et al., 2019). Após esse período, os recém-nascidos emergem dos ninhos e enfrentam uma longa jornada para chegar à água doce (Cantarelli et al. 2014). Assim,

alterações nucleares como as evidenciadas neste estudo podem levar à morte celular, instabilidade genômica ou ao câncer. Essas consequências podem afetar a sobrevivência, reprodução, ou herança genética de tartarugas expostas ao contaminante (Mesak et al. 2019). De acordo com López González et al. (2017) o uso e abordagem das análises de MN e ENAs reflete também potenciais alterações na cinética celular, metabolismo, perfil estrutural dos núcleos dos eritrócitos e eventos de estabilidade genômica, que podem fornecer informações valiosas sobre o estágio de progressão de algumas doenças degenerativas auxiliando significativamente no diagnóstico preditivo precoce.

5.4.2. Histopatologia hepática

Embora alguns estudos tenha relatado os riscos da contaminação de organismos não-alvos associados ao uso dos contaminantes glifosato e fipronil (Verderame e Scudiero, 2019; Zhang et al. 2019; Chen et al., 2020; Mestre et al., 2019; De-Oliveira et al., 2020; Lopes et al. 2021), os resultados descritos neste estudo fornecem a primeira evidência do efeito tóxico hepático e cerebral destes agrotóxicos em répteis aquáticos. Geralmente sensível a contaminantes ambientais, a alteração hepática exerce impacto significativo na saúde dos animais, visto que além de ser um órgão vital do metabolismo, o fígado também é considerado um órgão imunológico (Shimpi et al., 2017). Sendo assim, alterações neste órgão podem comprometer demandas energéticas e metabólicas, sendo que o estado nutricional hepático pode ser considerado um indicador geral de saúde a curto prazo (Everaarts et al., 1993; Zhang et al. 2019).

Análises histopatológicas hepáticas de neonatos de *P. expansa* apresentaram as alterações estruturais teciduais de congestão nos grupos tratados com fipronil isoladamente (F1 e F2), glifosato (G2) e associação de ambos os agrotóxicos (GF1). Também denominada de congestão passiva ou hiperemia passiva, essa alteração consiste no aumento local do volume de sangue devido a uma redução de um fluxo sanguíneo no tecido (Kumar et al., 2010). Nessa situação, há a ocorrência de estase de glóbulos vermelhos e acúmulo de hemoglobina desoxigenada, o que frequentemente leva ao edema (Kumar et al., 2010). Com relação ao infiltrado inflamatório, houve alterações estruturais hepáticas apenas nos grupos tratados isoladamente com fipronil (F1 e F2). Denominada também de infiltrado celular, essa alteração é composta predominantemente por macrófagos, linfócitos e plasmócitos, dependendo do agente ou substância incitante e da duração do processo inflamatório, e pode apresentar um padrão de distribuição perivascular em muitos tecidos (Zachary, 2018).

Os resultados referentes a hepatotoxicidade causada sobretudo pelo inseticida fipronil corroboram outros estudos com exposição a este contaminante. Peveling e Demba (2003) evidenciaram alteração da proporção fígado e/ou gordura corporal do lagarto *Acanthodactylus dumerili* (30µg/g de peso corporal, dose única) expostos ao fipronil Adonis®, via presa contaminada ou instilação do estômago. Em peixes, efeitos histológicos e fisiológicos, como aumento da atividade da superóxido dismutase hepática em *Cyprinus carpio* (Clasen et al., 2012), cariorrexe, hipertrofia hepatocelular, hipertrofia nuclear, agregados de melanomacrófagos e contração da veia central em *Cyprinus carpio* (Qureshi et al., 2016) e alteração das atividades das enzimas antioxidantes da truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (Uçar et al., 2021), reforçam o potencial efeito toxicológico do fipronil no meio aquático.

Com relação aos efeitos do glifosato na histopatologia do fígado de neonatos *P. expansa*, verificou-se que o herbicida apresentou toxicidade apenas com relação a congestão em G2 e GF1. Apesar de muitos estudos alertarem sobre os riscos associados ao uso e a exposição de herbicidas à base de glifosato, suas consequências para a saúde animal ainda é uma questão de debate (IARC, 2015; Williams et al., 2016a; Williams et al., 2016b). Em trabalho de Verderame e Scudiero (2019) os autores verificaram perda das funções fisiológicas do fígado e quadro hepático grave com degeneração e aparecimento de formações fibróticas advindas da exposição ao glifosato puro (0,05 e 0,5µg/kg de peso corporal – 3 semanas) em lagarto *Podarcis siculus*. Em girinos de *Dendropsophus minutus*, alterações teciduais hepáticas como vacuolização dos hepatócitos, presença de núcleos hiper cromáticos, aumento da pigmentação do melanomacrófago, esteatose e infiltração inflamatória, que podem refletir degeneração hepatocelular irreversível, foram encontradas após a exposição aguda (96 horas) ao herbicida glifosato (65, 130, 260 e 520µg/L) e ao surfactante polioxietileno amina - POEA (1,25, 2,5, 5 e 10µg/L) mesmo nas baixas concentrações dos pesticidas (Lopes et al. 2021). Em peixes, a exposição ao glifosato a curto (2,5, 5 e 10 mg/L - 96 horas) e longo prazo (2,5 e 5mg/L- 21 dias) em juvenis de *Oncorhynchus mykiss* desencadearam lesão histopatológica do fígado como degenerações moderada e fibrose (Topal et al., 2015) e em *Poecilia reticulata* houve alterações regressivas, como esteatose, núcleos picnóticos, alta distribuição de fibras colágenas e células degeneradas após a exposição ao glifosato (1,8mg/L – 24 horas; e 35mg/L – 96 horas) (Dos Santos et al. 2017; Antunes et al. 2017).

Tendo em vista os resultados aqui apresentados, infere-se que os efeitos nocivos do glifosato dependem sobretudo da via de contaminação, duração da exposição (crônica ou aguda) e concentração do tóxico. No presente estudo, a poluição ocorreu de via indireta, por

meio da contaminação do substrato de incubação dos ovos, em contraste com os demais trabalhos apresentados onde a exposição se deu de forma direta com a administração oral dos herbicidas (Verderame e Scudiero, 2019) ou em contato direto com a água contaminada (Topal et al., 2015; Dos Santos et al., 2017; Antunes et al., 2017). Chama-se a atenção ainda a barreira calcária formada pela casca, que pode ter servido como barreira de proteção para os embriões contra a exposição ao glifosato, o que poderia explicar os poucos efeitos hepatotóxicos do glifosato no presente estudo.

As alterações estruturais de esteatose encontradas no tecido hepático de todos os tratamentos, incluindo o controle, podem ter ocorrido devido ao estudo ter sido realizado com neonatos de cinco dias de *P. expansa*, os quais possuíam reservas de vitelo que ainda não haviam sido absorvidas. Do ponto de vista metabólico, os Testudines recém eclodidos consomem grandes quantidades de combustíveis energéticos, como os lipídios, já nos primeiros dias após emergência dos ninhos e, para satisfazer suas necessidades metabólicas ocorre mobilização de suas fontes vitelínicas, já que sua principal fonte de lipídios está presente no vitelo residual (Duncan et al., 2012). No entanto, sabe-se que alterações lipídicas hepáticas estão frequentemente relacionadas a exposição a contaminantes, pelo aumento da peroxidação lipídica, que pode levar a danos celulares, acúmulo de lipídios e apoptose das células (Dornelles e Oliveira, 2013; Ortiz-Ordoñez et al., 2016; Bach et al., 2018; Riaño et al., 2020).

Nos resultados obtidos não foi observado sinergismo na associação dos agrotóxicos. Em análise da histopatologia do fígado de neonatos de *P. expansa*, o fipronil apresentou maior toxicidade que o glifosato, e pode estar ocorrendo antagonismo entre esses dois agrotóxicos visto que a exposição a ambos os contaminantes em sua maior concentração (GF2) não resultou em diferença significativa na análise de congestão. Efeitos antagônicos em misturas de pesticidas podem ser causados pela associação entre as moléculas do composto, o que diminuiu sua biodisponibilidade. Nesse caso, ocorre uma indução da atividade enzimática causada pelo herbicida e o consequente aumento da biotransformação do inseticida (Cedergreen, 2014; Mansano, 2020). No entanto, a ausência de alterações na concentração mais alta do grupo associação (GF2) pode ter ocorrido devido à desintoxicação e função metabólica hepática (Sozen et al., 2015), visto que o estresse oxidativo no fígado causado por contaminantes pode induzir um aumento drástico na atividade enzimática, causando um estado de defesa do órgão para se preservar do dano oxidativo (Zhang et al. 2019).

5.4.3. Histopatologia cerebral

As análises histopatológicas do encéfalo de neonatos de *P. expansa* expostos ao fipronil revelam danos consideráveis, sugerindo que esse inseticida apresenta maior toxicidade em comparação ao herbicida glifosato. Tanto o fipronil em sua maior concentração (F2) quanto sua associação ao glifosato (GF2) apresentaram alterações estruturais teciduais de necrose e congestão, respectivamente, confirmando que as respostas histopatológicas são dependentes não só da duração do período de exposição mas sobretudo da concentração dos pesticidas.

Embora o encéfalo frequentemente não seja considerado um órgão vital na maioria dos estudos, ele pode ser um órgão-alvo para o fipronil (Ardehir et al., 2017). Clasen et al. (2012) relataram aumento da peroxidação lipídica no cérebro da carpa *Cyprinus carpio* após 90 dias de exposição a uma formulação comercial contendo fipronil e Ardehir et al. (2017) verificaram alterações na distribuição das células purkinje na camada ganglionar do cerebelo de peixes *Rutilus frisii* expostos a este inseticida (632mg/kg por injeção via intraperitoneal). Estes autores observaram ainda o comportamento de natação semicircular e tremores musculares como sinal clínico nos peixes expostos e sugerem correlação entre essas alterações.

A necrose cerebral encontrada nos encéfalos de neonatos de *P. expansa* expostos a maior concentração do fipronil (F2) pode ser comparável ao infarto seguido de oclusão vascular (Lakshmaiah, 2017). Neste caso, quando uma artéria que supre o SNC é subitamente obstruída, o fornecimento de sangue para as células no centro da área infartada é rapidamente interrompido e, se isto for mantido por um período suficiente, todas as células morrem (Zachary, 2018). Evidenciada em outros estudos neurotóxicos (Basanta e Mukherjee, 2000; Ayoola e Ajani, 2008; Pugazhvendan et al. 2009; Lakshmaiah, 2017), esse comprometimento do tecido por mudanças patológicas de uma determinada região cerebral pode levar à redução de sua função particular, alterando funções comportamentais e fisiológicas dos animais (Lakshmaiah, 2017). Dentre elas, dificuldade respiratória, perda de equilíbrio, natação errática, tremores, convulsões, calafrios musculares, escurecimento e edemas já foram relatadas por autores como consequências de alterações neuronais por exposição a substâncias químicas (Pugazhvendan et al., 2009; Ardehir et al., 2017; Lakshmaiah, 2017).

A toxicidade do fipronil em invertebrados resulta de sua capacidade de bloquear os canais de cloreto dependentes do ácido gama-aminobutírico (GABA) dos neurônios no sistema nervoso central (Chaulet et al, 2019). No entanto, não se conhece os mecanismos de ação desse inseticida em um sistema mais complexo, como o sistema neural de vertebrados. Além da dose e do tempo de exposição, a via de administração pode afetar o grau de

toxicidade (Ardeshir et al., 2017). Estudos realizados sobre a toxicocinética do fipronil em exposição aquática em trutas arco-íris *Pimephales promelas* (Pickford et al., 2003) e rãs verdes *Pelophylax kl. esculentus* (Reynaud et al., 2012) demonstraram que esse inseticida pode ser facilmente absorvido e distribuído para a maioria dos órgãos. Após a exposição, o fipronil é absorvido pela corrente sanguínea e transferido diretamente para o fígado, que possui potencial poder de desintoxicação (Carbis et al., 1996). Mesmo considerando sua taxa de eliminação do corpo do animal, o fipronil é transportado pelo sangue não oxigenado para o coração e bombeado para as guelras/pulmões, onde por fim, o sangue oxigenado contendo o contaminante e seus metabólitos circula por todo o corpo (Ardeshir et al., 2017).

Muitas vezes negligenciado em estudos de ecotoxicidade, a ocorrência de comportamentos neurotóxicos e a diminuição do índice cerebral em répteis estão intimamente relacionados ao acúmulo de agrotóxicos no cérebro (Zhang et al., 2019). A exposição em lagartos *Eremias argus* por via oral em dose única do miclobutanil (20 mg/kg de peso corporal) resultou em diferenças nos níveis deste fungicida entre os diferentes tecidos analisados, sendo que sua concentração diminuía na ordem de estômago > fígado > pulmão > sangue > testículo > rim > coração > cérebro (Chen et al. 2017). Apesar do tecido neural apresentar a menor toxidade entre os elementos analisados e nenhum sinal neurológico ter sido observado nos animais após a contaminação, os autores ressaltam que mesmo em pequena concentração, o resíduo de pesticida no tecido cerebral indica que o miclobutanil ultrapassou a barreira hematoencefálica. A neurotoxicidade de inseticidas a base de neonicotinóides foi verificada também em exposição oral aguda subcrônica por 28 dias em lagartos chineses (*Eremias argus*) (Wang et al., 2019). De acordo com os resultados, o pesticida dinotefurano apresentou forte persistência no cérebro, ao contrário de tiametoxam e imidacloprid, que foram rapidamente absorvidos e excretados pelos lagartos. Com relação aos agrotóxicos glifosato e fipronil, não há trabalhos referentes ao acúmulo destes pesticidas no cérebro de répteis.

Os resultados do presente estudo são biologicamente relevantes e trazem informações importantes sobre a ecotoxicologia de répteis aquáticos. O potencial mutagênico, hepatóxico e neurotóxico dos agrotóxicos comerciais Glifosato Atar 48® e Fipronil Reagent® 800WG evidenciados pela frequência de MNs, ENAs e alterações estruturais teciduais na histopatologia do fígado e encéfalo podem induzir mudanças significativas no metabolismo, fisiologia, comportamento e até mesmo na sobrevivência de *P. expansa*, visto que não se sabe as reais consequências desses efeitos no desenvolvimento deste animal. Estudos futuros envolvendo estágios diferentes de desenvolvimento e o biomonitoramento de regiões

naturalmente expostas simultaneamente a esses pesticidas são necessários para melhor compreender os efeitos destes contaminantes nesta espécie.

5.5. Conclusões

O uso do teste MNs em conjunto com ENAs demonstraram ser ferramentas sensíveis para determinar o potencial mutagênico de formulações comerciais de glifosato e fipronil, mesmo em concentrações permitidas pela legislação vigente brasileira. A análise histopatológica hepática e cerebral evidenciaram efeitos hepatóxicos e neurotóxicos sobretudo do fipronil em neonatos de *P. expansa*. Esta descoberta evidencia a importância de usar diferentes biomarcadores para avaliar os efeitos ecotoxicológicos acima descritos. Além disso, ressalta-se que Testudídeos devem ser incluídos nos testes para caracterizar ou indicar o potencial risco ambiental causado por agrotóxicos.

Apoio financeiro

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) e ao Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Répteis e Anfíbios (RAN) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) por permitir a realização deste estudo.

5.6. Referências

- Agostini M.G., Roesler I., Bonetto C., Ronco A.E., Bilenca D. 2020. Pesticides in the real world: The consequences of GMO-based intensive agriculture on native amphibians. *Conservation*, 241, 108355.
- Amaral, M.J., Sanchez-Hernandez, J.C., Bicho, R.C., Carretero, M.A., Valente, R., Faustino, A.M., Soares, A.M., Mann, R.M., 2012. Biomarkers of exposure and effect in a lacertid lizard (*Podarcis bocagei* Seoane) exposed to chlorpyrifos. *Environ. Toxicol. Chem.*, 31, 2345–2353.
- Antunes, A.M., Rocha, T.L., Pires, F.S., de Freitas, M.A., Leite, V.R.M.C., Arana, S., Moreira, P.C., Sabóia-Morais, S. M. T. 2017. Gender-specific histopathological response in guppies *Poecilia reticulata* exposed to glyphosate or its metabolite aminomethylphosphonic acid. *Journal of Applied Toxicology*, 37(9):1098–1107.

- Ardeshtir, R. A., Zolgharnein, H., Movahedinia, A., Salamat, N., Zabihi, E. 2017. Comparison of waterborne and intraperitoneal exposure to fipronil in the Caspian white fish (*Rutilus frisii*) on acute toxicity and histopathology. *Toxicology Reports*, 4, 348–357.
- Ayoola, S.O., Ajani, E.K. 2008. Histopathological Effects of cypermethrin on juvenile African catfish *Clarias gariepinus*. *World Journal of Biological Research*, 001(2):1-14.
- Araújo, A.P.C., Lima, V.S., de Andrade Vieira, J.E., Mesak, C., Malafaia, G., 2019. First report on the mutagenicity and cytotoxicity of ZnO nanoparticles in reptiles. *Chemosphere*, 235, 556–564.
- Bach, N.C., Marino, D.J.G., Natale, G., Somoza, G.M., 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.
- Bali, Y.A., Kaikai, N., Ba-M'hamed, S., Bennis. M., 2019. Learning and memory impairments associated to acetylcholinesterase inhibition and oxidative stress following glyphosate based-herbicide exposure in mice. *Toxicology*, 415, 18-25.
- Basanta K.D., Mukherjee, S.C. 2000. A histopathological study of carp *Labeo rohita* exposed to hexachlorocyclohexane. *Veterinarski Arhiv*, 70(4):169-180.
- Beckie, H.J., Flower, K.C., Ashworth, M.B. 2020. Farming without Glyphosate? *Plants*. 9 (96):1-15.
- Behmer, O.A., Tolosa, E.M.C., Freitas Neto, A.G. 1976. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. São Paulo: EDART.
- Bicho, R.C., Amaral, M.J., Faustino, A.M.R., Power, D.M., Rêma, A., Carretero, M.A., Soares, A.M., Mann, R.M., 2013. Thyroid disruption in the lizard *Podarcis bocagei* exposed to a mixture of herbicides: a field study. *Ecotoxicology* 22, 156–165.
- Bohm, M. et al. 2016. Evaluation of Stage-Dependent Genotoxic Effect of Roundup® (Glyphosate) on *Caiman latirostris* Embryos. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 72(1):50–57.
- Burella, P.M., Odetti, L.M., Simoniello, M.F., Poletta, G.L., 2018. Oxidative damage and antioxidant defense in *Caiman latirostris* (broad-snouted caiman) exposed in ovo to pesticide formulations. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 161, 437–443.
- Cantarelli, V.H., Malvasio, A., Verdade, L.M. 2014. Brazil's *Podocnemis expansa* Conservation Program: Retrospective and Future Directions. *Chelonian Conservation and Biol.* 13(1):124–128.
- Carbis, C. R., Rawlin, G. T., Mitchell, G. F., Anderson, J. W., McCauley, I. 1996. The histopathology of carp, *Cyprinus carpio* L., exposed to microcystins by gavage, immersion and intraperitoneal administration. *Journal of Fish Diseases*, 19(3):199–207.
- Carpenter, J.K., Monks, J.M., Nelson, N., 2016. The effect of two glyphosate formulations on a small, diurnal lizard (*Oligosoma polychroma*). *Ecotoxicology* 25, 548–554.

Cavaş, T., Könen, S. 2007. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagenesis*. 22 (4):263–268.

Çavas, T., Garanko, N.N., Arkhipchuk, V.V. 2005. Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of shes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. *Food Chem Toxicol*, 43, 569–574.

Cedergreen, N., 2014. Quantifying synergy: a systematic review of mixture toxicity studies within environmental toxicology. *PloS One* 9 (5), e96580.

Chaulet, F.C., Barcellos, H.H.A., Fior, D., Pompermaier, A., Koakoski, G., Rosa, J.G.S., Fagundes, M., Barcellos, L.J.G. 2019. Glyphosate- and Fipronil-Based Agrochemicals and Their Mixtures Change Zebrafish Behavior. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 77 (3):443-451.

Chang, J., Li, J., Wang, H., Wang, Y., Guo, B., Yin, J., Hao, W., Li, W., Li, J., Xu, P., 2016. Tissue distribution, metabolism and hepatic tissue injury in Chinese lizards (*Eremias argus*) after a single oral administration of lambda-cyhalothrin. *Environ. Pollut.* 218, 965–972.

Chen, L., Li, R., Diao, J., Tian, Z., Di, S., Zhang, W., Cheng, C., Zhou, Z. 2017. Tissue distribution and toxicity effects of myclobutanil enantiomers in lizards (*Eremias argus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 145, 623–629.

Chen, L., Wang, D., Zhou, Z., Diao, J. 2020. Comparing alpha-cypermethrin induced dose/gender-dependent responses of lizards in hepatotoxicity and nephrotoxicity in a food chain. *Chemosphere*, 256, 127069.

Clasen, B., Loro, V. L., Cattaneo, R., Moraes, B., Lópes, T., De Avila, L. A., Zanella, R., Reimche, G.B., Baldisserotto, B. 2012. Effects of the commercial formulation containing fipronil on the non-target organism *Cyprinus carpio*: Implications for rice–fish cultivation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 77, 45–51.

Crott, J., Fenech, M. 2001 Preliminary study of the genotoxic potential of homocysteine in human lymphocytes in vitro. *Mutagenesis* 16(3):213–217.

CONCEA - Controle de Experimentação Animal, 2018. Resolução normativa nº 37, de 15 de fevereiro de 2018. Baixa a Diretriz da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA. *Diário Oficial da União* 1, 5.

Cox, N.A., Temple, H.J. 2009. European Red List of Reptiles. IUCN - International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, Gland, Luxembourg.

De-Oliveira, J.S.P., Vieira, L.G., Carvalho, W.F., de Souza, M.B., de Lima Rodrigues, A.S., Simões, K., De Silva, D.M., Mendonça, J.S., Hirano, L.Q.L., Santos, A.L.Q., Malafaia, G. 2020 Mutagenic, genotoxic and morphotoxic potential of different pesticides in the erythrocytes of *Podocnemis expansa* neonates. *Science of The Total Environment*, 737, 140304.

Dornelles, M., Oliveira, G., 2013. Effect of atrazine, glyphosate and quinclorac on biochemical parameters, lipid peroxidation and survival in bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 66 (3): 415–429.

Dos Santos, A.P.R., Rocha, T. L., Borges, C.L., Bailão, A.M., Soares, C.M.A, Sabóia-Morais, S.M.T. 2017. A glyphosate-based herbicide induces histomorphological and protein expression changes in the liver of the female guppy *Poecilia reticulata*. Chemosphere, 168, 933–943.

Duncan, W., Silva, M., Cunha, S. L., Areosa, V., Andrade, P. 2012. O vitelo residual e sua importância para o manejo dos quelônios aquáticos recém-eclodidos. In: Andrade, P.C.M. Manejo Comunitário de Quelônios no Médio Amazonas e Juruá PROJETO PÉ-DE-PINCHA, UFAM, Manaus, eds 1. p. 455-498.

Emery, J.P., Mitchell, N.J., Cogger, H., Agius, J., Andrew, P., Arnall, S., Detto, T., Driscoll, D. A., Flakus, S., Green, P., Harlow, P., McFadden, M., Pink, C., Retallick, K., Rose, K., Sleeth, M., Tiernan, B., Valentine, L. E., Woinarski, J. Z. 2021. The lost lizards of Christmas Island: A retrospective assessment of factors driving the collapse of a native reptile community. Conservation Science and Practice, 3 (2):1-20.

Everaarts, J.M., Shugart, L.R., Gustin, M.K., Hawkins, W.E., Walker, W.W. 1993. Marcadores biológicos em peixes: integridade do DNA, parâmetros hematológicos e índice somático do fígado. Mar. Environ. Res., 35, 101 – 107.

Fenech, M., 2000. The in vitro micronucleus technique. Mutat. Res. 455, 81–95.

Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A.T., Surrallés, J., Crott, J.W., Parry, J., Norppa, H., Eastmond, D.A., Tucker, J.D., Thomas, P., 2011. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. Mutagenesis 26 (1):125–132.

Firmiano, E.M.S. 2013. Descrição histológica e detecção imuno-histoquímica de células do sistema neuroendócrino difuso no oviduto de *Phrynops geoffroanus* (Testudines, Chelidae). Dissertação em Biologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Forero-Medina, G., Ferrara, C.R., Vogt, R.C., Fagundes, C.K., Balestra, R.A.M., Andrade, P.C.M., Lacava, R.C., Bernhard, R., Lipman, A.J., Lenz, A.J., Ferrer, A., Calle, A., Aponte, A.F., Calle-Rendón, B.R., Santos Camilo, C., Perrone, E.L., Miraña, E., Cunha, F., Andrew G., Loja, E., Del Rio, J., Vera Fernandez, J.L., Hernández, O.E., Del Aguila, R., Pino, R., Cueva, R., Martinez, S., Bernardes, V.C.D., Sainz, L., Horne, B.D. 2019 . On the future of the giant South American river turtle *Podocnemis expansa*. Oryx, 55 (1):73 - 80.

Gomes, A.S., Ferreira Junior, P.D. 2011. Management and relocation of nests of *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) (Testudines, Podocnemididae) on the Crixás-Açu River broad-snouted. Brazil. Brazilian Journal of Biology, 71, 975-982.

Hirano, L.Q.L., Alves, L.S., Menezes-Reis, L.T., Mendonça, J.S., Simões, K., Santos, A.L.Q., Vieira, L.G. 2019. Effects of egg exposure to atrazine and/or glyphosate on boné development

in *Podocnemis unifilis* (Testudines, Podocnemididae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 182, 109400.

Hopkins, W.A., Winne, C.T., 2006. Influence of body size on swimming performance of four species of neonatal natricine snakes acutely exposed to a cholinesteraseinhibiting pesticide. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 1208.

Hussain, R., Ali, F., Rafique, A., Ghaffar, A., Jabeen, G., Rafay, M., Saima Liaqat, Khan, I., Malik, R., Muhammad Kasib Khan, Niaz, M., Kashfa Akram, Masood, A. 2019. Exposure to Sub-Acute Concentrations of Glyphosate Induce clinico-Hematological, Serum Biochemical and Genotoxic Damage in Adult Cockerels. *Pakistan Veterinary Journal*, 39(02):181-186.

IARC - International Agency for Research on Cance. 2015. Some Organophosphate Insecticides and Herbicides, Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human, v. 112.

Kwon, M., Leibowitz, M. L., Lee, J.-H. 2020. Small but mighty: the causes and consequences of micronucleus rupture. *Experimental & Molecular Medicine*, 52(11):1777–1786.

Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N., Aster, J.C. 2010. Robbins & Cotran Patologia - Bases Patológicas das Doenças. Eds.8. Rio de Janeiro: Elsevier, 1479p.

Kuchling, G. 1999. The reproductive biology of the Chelonia. Springer -Vergal Berlin Heidelberg, Eds.1, v. 38, p. 223.

Lajmanovich, R.C., Peltzer, P.M., Attademo, A.M., Martinuzzi, C.S., Simoniello, M.F., Colussi, C.L., Cuzziol Boccioni, A.P., Sigrist, M. 2019. First evaluation of novel potential synergistic effects of glyphosate and arsenic mixture on *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) tadpoles. *Heliyon*, 5 (10), e02601.

Lakshmaiah, G. 2017. Brain Histopathology of the Fish *Cyprinus carpio* Exposed to Lethal Concentrations of an Organophosphate Insecticide Phorate. *International Journal for Advance Research and Development*, 2, 668-672.

Latorre, M.A., Romito, M.L., Larriera, A., Poletta, G.L., Siroski, P.A., 2016. Total and differential white blood cell counts in Caiman latirostris after in ovo and in vivo exposure to insecticides. *J. Immunotoxicol.* 1–6.

Lopes, A., Benvindo-Souza, M., Carvalho, W.F., Nunes, H.F., Lima, P.N., Costa, M.S., Benetti, E.J., Guerra, V., Saboia-Morais, S.M.T., Santos, C.E., Simões, K., Bastos, R.P., Silva, D.M. 2021. Evaluation of the genotoxic, mutagenic, and histopathological hepatic effects of polyoxyethylene amine (POEA) and glyphosate on *Dendropsophus minutus* tadpoles. *Environmental Pollution*, 289, 117911.

López González, E.C., Larriera, A., Siroski, P.A., Poletta, G.L. 2017. Micronuclei and other nuclear abnormalities on *Caiman latirostris* (Broad-snouted caiman) hatchlings after embryonic exposure to different pesticide formulations. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 136, 84–91.

Lovich, J.E., Ennen, J.R., Agha, M., Gibbons, J.W. 2018. Where have all the turtles gone, and why does it matter? *Bioscience*, 68 (10):771–781.

Magalhães, M.S. Desenvolvimento embrionário de *Podocnemis expansa* (Testudines: Podocnemididae): descrição do pronefro e mesonefro e diferenciação gonadal em ambiente natural, Balbina, Amazonas. 2017. 162p. Tese de doutorado em Biologia de Água Doce e Pesca Interior - Programa de Pós-Graduação do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas.

Mansano, A.S., Moreira, R.A., Dornfeld, H.C., Freitas, E.C., Vieira, E.M., Daam, M.A., Rocha, O., Seleglim, M.H.R. 2020. Individual and mixture toxicity of carbofuran and diuron to the protozoan *Paramecium caudatum* and the cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 201, 110829.

Marques, A., Guilherme, S., Gaivão, I., Santos, M. A., Pacheco, M. 2014. Progression of DNA damage induced by a glyphosate-based herbicide in fish (*Anguilla anguilla*) upon exposure and post-exposure periods — Insights into the mechanisms of genotoxicity and DNA repair. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 166, 126–133.

Medeiros, N.C., Locatelli-Dittrich, R., Schmidt, E.M.S., Alvares, A.A.A., Patrício, L.L., Lange, R.R., Souza, R.A.M. 2012. Effect of the blood collection site on the hematological parameters in red-eared slider, *Trachemys scripta elegans*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 32(1):37-40.

Mesak, C., Montalvão, M.F., Paixão, C.F.C., Mendes, B.O., Araújo, A.P.D.C., Quintão, T.C., Malafaia, G. 2019. Do Amazon turtles exposed to environmental concentrations of the antineoplastic drug cyclophosphamide present mutagenic damages? If so, would such damages be reversible? *Environ Sci Pollut Res Int*. 26(6):6234-6243.

Mestre, A.P., Amavet, P.S., Vanzetti, A.I., Moleon, M.S., Parachú, M.V., Poletta, G.L., Siroski, P.A., 2019. Effects of cypermethrin (pyrethroid), glyphosate and chlorpyrifos (organophosphorus) on the endocrine and immune system of *Salvator merianae* (Argentine tegu). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 169, 61e67.

Mingo, V., Leeb, C., Fahl, A.-K., Lötters, S., Brühl, C., Wagner, N. 2019. Validating buccal swabbing as a minimal-invasive method to detect pesticide exposure in squamate reptiles. *Chemosphere*. 229, 529-537.

Mingo, V., Lötters, S., Wagner, N. 2017. The impact of land use intensity and associated pesticide applications on fitness and enzymatic activity in reptiles - A field study. *Environment International*, 124, 284-293.

Moura, L. R. 2009. Aspectos morfológicos do fígado de tartaruga-da-amazônia *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) (Testudines, Podocnemididae) e *Phrynops geoffroanus* (Schwiegger, 1812) (Testudines, Chelidae). 69 f. Dissertação em Ciências Agrárias, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais.

Oliveira, M., Ahmad, I., Maria, V.L., Ferreira, C.S.S., Serafim, A., Bebianno, M.J., Pacheco, M., Santos, M.A. 2010. Evaluation of oxidative DNA lesions in plasma and nuclear

abnormalities in erythrocytes of wild fish (*Liza aurata*) as an integrated approach to genotoxicity assessment, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 703(2):83–89.

Ortiz-Ordoñez, E., López-López, E., Sedeño-Díaz, J., Uría, E., Morales, I., Pérez, M., Shibayama, M., 2016. Liver histological changes and lipid peroxidation in the amphibian *Ambystoma mexicanum* induced by sediment elutriates from the Lake Xochimilco. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 46, 156–164.

Peveling, R., Demba, S.A. 2003 Toxicity and pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* var. *Acridum* (Deuteromycotina, Hyphomycetes) and fipronil to the fringe-toed lizard *Acanthodactylus Dumerili* (Squamata: Lacertidae). *Environmental Toxicology and Chemistry*. 22 (7):1437–1447.

Pickford, K. A., Thomas-Jones, R. E., Wheals, B., Tyler, C. R., Sumpter, J. P. 2003. Route of exposure affects the oestrogenic response of fish to 4-tert-nonylphenol. *Aquatic Toxicology*, 65(3):267–279.

Poletta, G.L., Larriera, A., Kleinsorge, E., Mudry, M. D. 2009. Genotoxicity of the herbicide formulation Roundup® (glyphosate) in broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) evidenced by the Comet assay and the Micronucleus test. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 672(2):95–102.

Poletta, G. L., Kleinsorge, E., Paonessa, A., Mudry, M. D., Larriera, A., Siroski, P. A. 2011. Genetic, enzymatic and developmental alterations observed in *Caiman latirostris* exposed in ovo to pesticide formulations and mixtures in an experiment simulating environmental exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(4):852–859.

Polard, T., Jean, S., Gauthier, L., Laplanche, C., Merlina, G., Sánchez-Pérez, J. M., Pinelli, E. 2011. Mutagenic impact on fish of runoff events in agricultural areas in south-west France. *Aquatic Toxicology*, 101(1):126–134.

Pugazhvendan, S.R., Jothi Narendiran, N., Kumaran, R.G., Kumaran, S., Alagappan, K.M. 2009. Effect of Malathion Toxicity in the Freshwater Fish *Ophiocephalus punctatus*-A Histological and Histochemical Study. *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 1(3):218-224.

Qureshi, I. Z., 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.). *Aquatic Toxicology*, 179, 103–114.

Reynaud, S., Worms, I. A. M., 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*). *Environmental Pollution*, 161, 206–214.

Riaño, C., Ortiz-Ruiz, M., Pinto-Sánchez, N.C., Gómez-Ramírez, E. 2020. Effect of glyphosate (Roundup Active®) on liver of tadpoles of the colombian endemic frog *Dendropsophus molitor* (amphibia: Anura). *Chemosphere*, 250:126287.

Russo, A., Degraasi, F., 2018. Molecular cytogenetics of the micronucleus: still surprising. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen* 836, 36–40.

Santos, C.F.M., Fiori, M.M. 2020. Turtles, indians and settlers: *Podocnemis expansa* exploitation and the Portuguese settlement in eighteenth-century Amazonia, *Topoi* (Rio J.), 21 (44):350-373.

Schaumburg, L.G., Siroski, P.A., Poletta, G.L., Mudry, M.D. 2016. Genotoxicity induced by Roundup® (Glyphosate) in tegu lizard (*Salvator merianae*) embryos. *Pesticide biochemistry and physiology*. 130, 71-78.

Simon-Delso, N., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L.P., Bonmatin, J.M., Chagnon, M., Downs, C., Furlan, L., Gibbons, D.W., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreutzweiser, D.P., Krupke, C.H., Liess, M., Long, E., McField, M., Mineau, P., Mitchell, E.A.D., Morrissey, C.A., Noome, D.A., Pisa, L., Settele, J., Stark, J. D., Tapparo, A., Van Dyck, H., Van Praagh, J., Van der Sluijs, J.P., Whitehorn P.R., Wiemers M. 2015. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environ Sci Pollut Res Int*. 22(1): 5-34.

Simoncini, M.S., Portelinha, T.C.G., Montelo, K.M., Falcon, G.B., Collicchio, E., Balestra, R. A.M., Luz, V.L.F., Malvasio, A. 2019. Avaliação da influência dos fatores ambientais sazonais na reprodução da tartaruga-da-amazônia (*Podocnemis expansa*): um estudo de caso no Tocantins. In: Lacava, R. V., Balestra, R. A. M. (Ed.). *Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Quelônios Amazônicos*, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Ibama, Brasília. 192p.

Shimizu, N., Itoh, N., Utiyama, H., Wahl, G.M. 1998. Selective Entrapment of Extrachromosomally Amplified DNA by Nuclear Budding and Micronucleation during S Phase. *The Journal of Cell Biology*, 140(6):1307–1320.

Shimpi, P.C., More, V.R., Paranjpe, M., Donepudi, A.C., Goodrich, J.M., Dolinoy, D.C., Rubin, B., Slitt, A.L. 2017. Hepatic Lipid Accumulation and Nrf2 Expression following Perinatal and Peripubertal Exposure to Bisphenol A in a Mouse Model of Nonalcoholic Liver Disease. *Environmental Health Perspectives*, 125(8), 087005.

Southwood, A., Avens, L. 2009. Physiological, behavioral, and ecological aspects of migration in reptiles. *Journal of Comparative Physiology B*, 180(1), 1–23.

Sozen, H., Celik, O.I., Cetin, E.S., Yilmaz, N., Aksozek, A., Topal, Y., Cigerci, I.H., Beydilli, H. 2015. Evaluation of the Protective Effect of Silibinin in Rats with Liver Damage Caused by Itraconazole. *Cell Biochem Biophys* 71, 1215–1223.

Sparling, D.W., Linder, G., Bishop, C.A., Krest, S. 2010. *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles*. Eds.2. Taylor and Francis, Hoboken.

Steinel, N.C., Bolnick, D.I., 2017. Melanomacrophage centers as a histological indicator of immune function in fish and other poikilotherms. *Front. Immunol.* 8, 827.

Topal, A., Atamanalp, M., Uçar, A., Oruç, E., Kocaman, E. M., Sulukan, E., Akdemir, F., Beydemir, S., Kılınç, N., Erdoğan, O., Ceyhun, S.B. 2015. Effects of glyphosate on juvenile

rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Transcriptional and enzymatic analyses of antioxidant defence system, histopathological liver damage and swimming performance. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 111, 206–214.

Turkmen, R., Birdane, Y.O., Demirel, H.H., Yavuz, H., Kabu, M., Ince, S., 2019. Antioxidant and cytoprotective effects of N-acetylcysteine against subchronic oral glyphosatebased herbicide-induced oxidative stress in rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 26 (11):11427–11437.

Uçar, A., Parlak, V., Özgeriş, F.B., Yeltekin, A.Ç., Alak, G., Atamanalp, M. 2020. Determination of Fipronil toxicity by different biomarkers in gill and liver tissue of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*, 56(7):543-549.

Uçar, A., Özgeriş, F.B., Parlak, V., Yeltekin, A.C., Kocaman, E.M., Alak, G., Atamanalp, M. 2021. Neurotoxic responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to fipronil: multi-biomarker approach to illuminate the mechanism in brain, *Drug and Chemical Toxicology*, 18, 1-6.

Verderame, M., Scudiero, R. 2019. How Glyphosate Impairs Liver Condition in the Field Lizard *Podarcis siculus* (Rafinesque-Schmaltz, 1810): Histological and Molecular Evidence. *BioMed Research International*, 1–13.

Vogt, R.C.; Fagundes, C.K.; Bataus, Y.S.L.; Balestra, R.A.M.; Batista, F.R.W.; Uhlig, V.M.; Silveira, A.L.; Bager, A.; Batistella, A.M.; Souza, F.L.; Drummond, G.M.; Reis, I.J.; Bernhard, R.; Mendonça, S.H.S.T.; Luz, V.L.F. 2015. Avaliação do Risco de Extinção de *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) no Brasil. Processo de avaliação do risco de extinção da fauna brasileira. ICMBio. Ministério Do Meio Ambiente. Brasília.

Vogt, R.C. 2008. Amazon Turtles. Lima: Wust Ediciones, Peru.

Wang, Y., Zhang, Y., Li, W., Han, Y., Guo, B. 2019. Study on neurotoxicity of dinotefuran, thiamethoxam and imidacloprid against Chinese lizards (*Eremias argus*). *Chemosphere*. 217:150-157.

Weir, S.M., Talent, L.G., Anderson, T.A., Salice, C.J., 2014. Unraveling the relative importance of oral and dermal contaminant exposure in reptiles: insights from studies using the western fence lizard (*Sceloporus occidentalis*). *PLoS One* 9, e99666.

Wilkinson, L. 1990. Systat: The system for statistics. 1990. Systat Inc., Evanston. 1, 822.

Williams, G.M., Aardema, M., Acquavella, J., Berry, S.C., Brusick, D., Burns, M.M., Camargo, J.L.V., Garabrant, D., Greim, H.A., Kier, L.D., Kirkland, D.J., Marsh, G., Solomon, K.R., Sorahan, T., Roberts, A., Weed, D.L. 2016a. A review of the carcinogenic potential of glyphosate by four independent expert panels and comparison to the IARC assessment. *Critical Reviews in Toxicology*, 46(sup1), 3–20.

Williams, G. M., Berry, C., Burns, M., de Camargo, J. L. V., Greim, H. 2016b. Glyphosate rodent carcinogenicity bioassay expert panel review. *Critical Reviews in Toxicology*, 46(sup1), 44–55.

Yasui, M., Kamoshita, N., Nishimura, T., Honma, M. 2015. Mechanism of induction of binucleated cells by multiwalled carbon nanotubes as revealed by live-cell imaging analysis. *Genes and Environment* 37(1).

Zachary, James F. 2018. Bases da patologia em veterinária. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier.

Zhang, L., Chen, L., Meng, Z., Zhang, W., Xu, X., Wang, Z., Quin, Y., Deng, Y., Liu, R., Zhou, Z., Diao, J. 2019. Bioaccumulation, behavior changes and physiological disruptions with gender-dependent in lizards (*Eremias argus*) after exposure to glufosinate-ammonium and l-glufosinate-ammonium. *Chemosphere*, 226, 817–824.

6. Considerações finais

O presente estudo conclui que a incubação dos ovos em substrato poluído com os produtos formulados Glifosato Atar 48® e/ou Fipronil Regent® 800WG resultam em impactos biológicos consideráveis que podem afetar a saúde de embriões e neonatos de *P. expansa*.

A contaminação periódica com os produtos formulados glifosato e/ou fipronil durante 44 dias de incubação artificial, interferiu no crescimento embrionário de *P. expansa* (inferido pela menor biomassa corpórea e retardo no desenvolvimento) e induziu malformações ósseas no anel ossicular escleral, mesmo em concentrações permitidas pela legislação vigente. Podendo ser irreversíveis, essas alterações podem acarretar prejuízos na aptidão física, locomotora e acuidade visual dos indivíduos expostos.

Com relação aos constituintes da casca dos ovos de *P. expansa*, os agrotóxicos comerciais glifosato e/ou fipronil acarretaram em redução no teor de umidade, proteína bruta e aumento do extrato etéreo. Essas alterações podem estar relacionadas a possíveis modificações nos mecanismos e/ou taxas de transporte das cascas, podendo afetar a disponibilidade de nutrientes e água, resultando em deficiência, desenvolvimento lento e comprometendo funções importantes no metabolismo dos embriões.

A presença de micronúcleo e outras anormalidades nucleares eritrocitárias encontradas em análise de sangue periférico dos neonatos de *P. expansa* expostos aos contaminantes evidenciam alterações mutagênicas e podem estar associadas a processos carcinogênicos. Concomitantemente, alterações estruturais teciduais na histopatologia do fígado e encéfalo dos mesmos indivíduos expostos evidenciam os efeitos hepatotóxicos e neurotóxicos sobretudo advindos da exposição ao fipronil. Essas alterações no fígado podem comprometer demandas energéticas e metabólicas dos neonatos enquanto que o comprometimento do tecido cerebral pode resultar na redução de sua função particular, alterando funções comportamentais e fisiológicas dos animais.

Com relação a utilização das formulações comerciais de glifosato e fipronil, apesar de não apresentarem sinergismo quando utilizadas em conjunto, as mesmas induziram toxicidade evidenciando a importância de se utilizar diferentes biomarcadores para avaliar os efeitos ecotoxicológicos destes pesticidas em Testudines. Além disso, ressalta-se a importância de estudos referentes a exposição a contaminantes durante estágios críticos de desenvolvimento de *P. expansa*, podendo este ter consequências graves e permanentes no decorrer da vida desses animais. Faz-se necessário portanto, a realização de mais estudos sobre os impactos

dos agrotóxicos na fauna silvestre para subsidiar a revisão da legislação brasileira vigente e evitar maiores danos à biodiversidade.