



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

Arleto Tenório dos Santos

Exposição aguda e crônica de fipronil em girinos de rã touro

(*Lithobates catesbeianus*):

efeitos genotóxicos e morfológicos

São José do Rio Preto
2021

Arleto Tenório dos Santos

Exposição aguda e crônica de fipronil em girinos de rã touro

(*Lithobates catesbeianus*):

efeitos genotóxicos e morfológicos

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

Orientador: Prof^o. Dr. Classius de Oliveira

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

São José do Rio Preto
2021

S237e

Santos, Arleto Tenório dos

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

91 f. : il., tabs., fotos

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

Orientador: Prof. Dr. Classius de Oliveira

Coorientadora: Profa. Dr^a. Lilian Franco Bellussi

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

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

Essa ficha não pode ser modificada.

Arleto Tenório dos Santos

Exposição aguda e crônica de fipronil em girinos de rã touro

(*Lithobates catesbeianus*):

efeitos genotóxicos e morfológicos

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

Comissão Examinadora

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

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

Prof. Dr. Rodrigo Zieri
IFPS - Barretos

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

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

São José do Rio Preto
05 de agosto de 2021

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ex 31,3

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

Keywords: Anuran amphibians, Biomarkers, Body Pigmentation, Melanomacrophages

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

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

LISTA DE TABELAS

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

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

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

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

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

LISTA DE SÍMBOLOS

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

SUMÁRIO

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

1. INTRODUÇÃO GERAL

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

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

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

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

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

1.1 Situação atual dos agrotóxicos

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

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

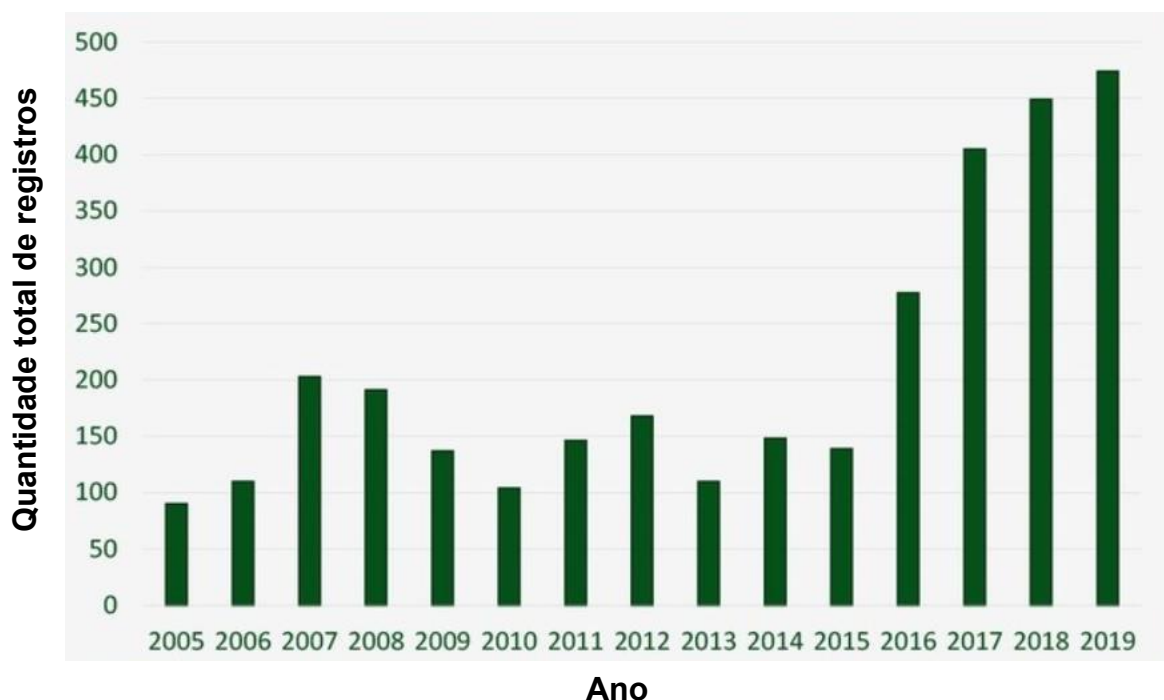


Figura 1. Registros de Agrotóxicos no Brasil.

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

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

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

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

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

1.2 Fipronil

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

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



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

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

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

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

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

1.2.1 Mecanismo de ação do Fipronil.

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

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

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

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

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

1.2.2 Degradação do Fipronil.

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

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

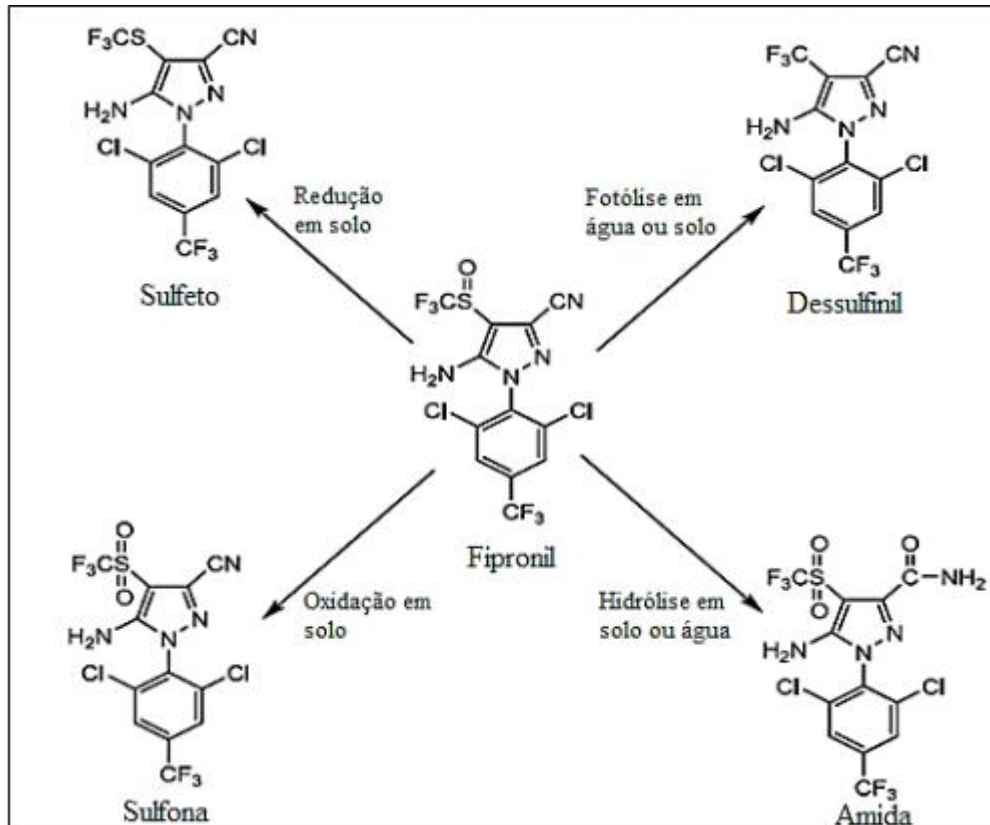


Figura 3. Produtos de degradação do fipronil.

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

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

1.2.3 Estudo com o Fipronil

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.3 Anfíbios como Bioindicadores

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.3.1. Espécie *Lithobates catesbeianus*

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

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

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

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

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

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

2 OBJETIVO e HIPÓTESES

Este estudo tem como objetivo avaliar sobre condições de laboratório, a toxicidade aguda e crônica da formulação do Regent 800 WG, utilizando como animal modelo de girinos de rã- touro (*Lithobates catesbeianus*), nos estágios 36 (GOSNER, 1990).

Nossa hipótese é que a exposição ao fipronil irá causar alterações na coloração externa (ou na pigmentação externa), em razão dessas células, comprovadamente, responderem a diversos agentes xenobióticos. Como aumento da coloração externa ou diminuição da coloração, desses animais uma vez que a melanina possui papel protetivo. Além disso, levantou-se a hipótese de que o fipronil causará alterações na morfologia nuclear dos eritrócitos, uma vez que apresenta potencial genotóxico.

Foi realizado o levantamento Cienciométrico como forma de sintetizar e organizar os trabalhos de pesquisas já publicados que utilizou a espécie *Lithobates catesbeianus* (= *Rana catesbeiana*) como animal modelo correlacionando com agroquímicos.

Os resultados estão expressos no último capítulo intitulado “*Genotoxic and melanic alterations in Lithobates catesbeianus (anura) tadpoles exposed to fipronil insecticide*”.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Metodologia da Cienciometria

Foi feita uma pesquisa cienciométrica sobre *Lithobates catesbeianus* utilizando-se três bancos de dados: Web of Science, Scopus e Scielo. As palavras-chave buscadas (*termos de busca*) foram o nome da espécie, “*Lithobates catesbeianus*”, e sua combinação com outras quatro variáveis: “agrotóxicos”, “efeitos ecotoxicológicos”, “histologia” e “teste de micronúcleos”. Após a busca bruta realizada nas três bases de dados, com os cinco *termos de busca*, um total de 1.759 artigos que foram selecionados, em uma primeira filtragem, conforme alguns critérios. Na segunda etapa foram selecionados 247 artigos, excluindo-se as duplicidades. Na segunda filtragem

foram selecionados os artigos que apresentaram a aplicação da *Lithobates catesbeianus* em alguma atividade experimental de laboratório, o que foi avaliado mediante a leitura dos resumos de cada um dos artigos. Finalizou-se a busca com 73 artigos, selecionados como material a ser explorado.

3.2 Delineamento experimental

Foram utilizados 128 girinos de *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802), nos estágios 36-38 de Gosner, obtidos no Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP) de Jaboticabal - SP. Os animais foram mantidos em aquários de 1L de água por animal, com aeração constante, temperatura controlada ($27.0 \pm 1^\circ\text{C}$) e fotoperíodo natural (~12h claro: 12h escuro). Os animais foram alimentados diariamente com ração proteica por 7 dias antes do início dos experimentos.



Figura 4. Organização do experimento no laboratório de anatomia comparada.
Fonte: Autor

Após este período, os animais foram reagrupados aleatoriamente (*random*) em 32 aquários com 4 exemplares em cada, mantendo a densidade populacional

preconizada de 1 animal por litro de água. Esse montante foi submetido a 3 concentrações do formulado “Regent ® 800 wg” (80% fipronil): 0.00 (controle), 0.04, 0.08, 0.4 mg/L; em 4 quatro tempos de exposição: 4, 8, 12 e 16 dias. Cada grupo foi realizado em duplicata, totalizando N=8/concentração/tempo. A água foi renovada a cada 48 horas. Foi utilizado a fim de garantir que as concentrações desejadas dos compostos na água fossem mantidas, e também para evitar interferência dos produtos de excreção dos animais. Após as trocas era fornecido o alimento (rações formuladas pelo CAUNESP especificamente para a espécie).

O projeto tem aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais, protocolo 199/2018 e RAN/IBAMA/MMA 18573- 1).

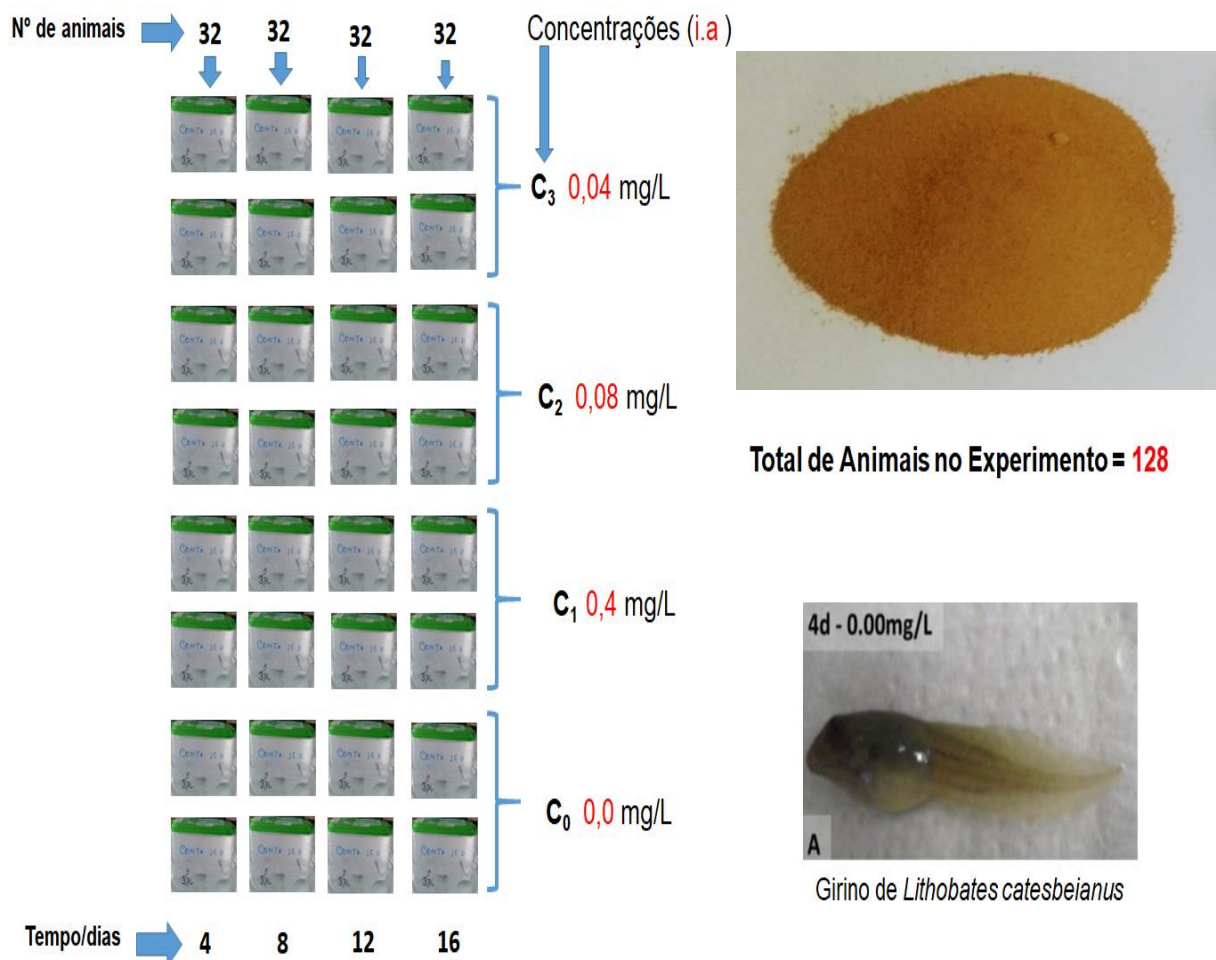


Figura 5. Delineamento do experimento utilizando o Regent ® 800 wg em girinos *Lithobates catesbeianus*.
Fonte: Autor.

Decorridos os tempos experimentais, os animais foram fotografados e em seguida eutanasiados em benzocaína (10g/L), o sangue foi retirado por punção

cardíaca com seringas e agulhas heparinizadas para a confecção de extensões sanguíneas. Posteriormente, os animais foram dissecados e o fígado foi retirado, pesado em balança analítica com precisão 0,05g e seguiram-se os procedimentos para análises hepáticas e de genotoxicidade. Toda a manipulação e cuidados dos animais seguiu o *NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals* e os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEUA – IBILCE/UNESP 199/2018).

3.2.1 Análise de anormalidades nucleares

Após anestesia na região caudal com xilocaína, o sangue foi retirado com seringa e agulha heparinizadas, gotejado na lâmina e foram feitos esfregaços sanguíneos que, após secos, foram fixados em metanol por 20 min e corados com Giemsa 7.5%, por 15min. As seguintes anormalidades nucleares foram mensuradas: eritrócitos anucleados, binucleados, bud e presença de micronúcleo. Para cada animal foram contabilizados 1000 eritrócitos (Pérez-Iglesias et al., 2014).

3.2.2 Quantificação da área de melanina

Para as análises histológicas fragmentos do fígado foram fixados em Metacarn (60% metanol, 30% clorofórmio, 10% ácido acético) por 3 horas, desidratados em série alcoólica, emblocados em historesina (kit Leica) e seccionados em micrótomo (Leica RM2245) na espessura de 2 μ m. Os cortes foram corados com Hematoxilina-eosina e observados em microscópio (Leica DM4000 B) com sistema de captura de imagens (Leica DFC 280). A quantificação da pigmentação foi realizada pela diferença de intensidade de coloração dos MMs (Santos et al., 2014) com o programa Image Pro-Plus, Media-Cybernetics Inc. (versão 6.0). Para cada animal foram feitas 25 fotos, fotografadas aleatoriamente.

REFERÊNCIAS

- A Bíblia Sagrada. Traduzida em Português por João Ferreira de Almeida. Revista e Atualizada no Brasil. 2 ed. Barueri – SP: Sociedade Bíblica do Brasil, 1993.
- Abdel-Tawab, H. Mossa, Eman, S. Swelamb, Samia, M.M. Mohafrasha, Sub-chronic exposure to fipronil induced oxidative stress, biochemical and histopathological changes in the liver and kidney of male albino rats, *Toxicology Reports*, vol, 2,p.775-784, 2015.
- Abdalla, F. C.; Martins, L. P. A.; Silva-Zacarin, E. C. S.; Rizzi, G. M.; Costa, M. J.; Salla, R. F.; Kalinin, A. L.; Monteiro, D. A. The impact of cadmium chloride on the gonadal morphology of the North American bullfrog tadpoles, *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802). *Fresenius Environmental Bulletin*, v.22, n.6, 2013.
- Agostini, G. M. Ecotoxicología de Anfibios en Agroecosistemas del Noreste de la Región Pampeana. Tesis (Doctorado en Ciencias Exactas) - Centro de Investigaciones del Medio Ambiente, Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata - UNLP. Argentina, p 163, 2013.
- Ali, D., Nagpure, N.S., Kumar, S., Kumar, R. And Kushwaha, B., Genotoxicity assessment of acute exposure of chlorpyrifos to freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis. *Chemosphere*, vol, 71, p.1823–1831. 2008.
- Américo, J H. P.; Manoel, L. O.; Torres, N. H.; Ferreira, L. F. R. O uso de agrotóxicos e os impactos nos ecossistemas aquáticos. *Revista Científica ANAP Brasil*, vol,8, n.13, p. 101-115, 2015.
- Aranha, R. C. Potencial de toxicidade dos herbicidas glifosato e imazetapir em *Colossoma macropomum* (Pisces). 2013. 69 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Área de concentração Estudos de Ecossistemas Amazônicos, Universidade Federal do Oeste do Pará, Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia, Santarém, 2013.
- Ardeshira. R. A.; Zolgharniena. H.; Movahediniab. A.; Salamata. N.; Zabihi. E.; Rastgara. S. Measurement of DNA damage by CellProfiler software in the liver of Caspian white fish exposed to environmental concentrations of fipronil. *Computational Toxicology*,v.12, p.100-105, 2019.
- Babalola, O. O.; Van Wyk, J. H. Comparative early life stage toxicity of the African clawed frog, *Xenopus laevis* following exposure to selected herbicide formulations applied to eradicate alien plants in South Africa. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 75, n. 1, p. 8-16, 2018.
- Besten, P. J.; Munawar, M. Ecotoxicological testing of marine and freshwater ecosystems: emerging techniques, trends and strategies. Taylor e Francis Group. London, New York. (2005)

- Bobé, A.; Cooper, J. F.; Coste, C. M.; Muller, M. A. Behavior of Fipronil in Soil under Sahelian Plain Field Conditions. *Pestic Sci*, v. 52, p. 275-281, 1998.
- Boscolo, C. N. P.; Felício, A. A.; Pereira, T. S. B.; Margarido, T. C. S.; Rossa-Feres, D. C.; Almeida, E. A.; Freitas, J..S.; (2017). Comercial insecticide fipronil alters antioxidant enzymes response and accelerates the metamorphosis in *Physalaemus nattereri* (*Anura: Leiuperidae*) tadpoles European Journal of Zoological Research, v. 5, n. 1, p. 1-7, 2017.
- Brandão, E. A. & Araújo, A. F. B. A herpetofauna associada às Matas de Galeria no distrito Federal. In *Cerrado: caracterização e recuperação de Matas de Galeria* (J.F. Ribeiro, C.E.L. da Fonseca & J. C. Sousa-Silva, eds). Embrapa, Brasília, p. 561-606. 2001
- Brandão, F. P.; Marques, S.; Rodrigues, S.; Santos, B.; Travasso, R.; Venâncio, C.; Pereira, R.; Ortiz-Santaliestra, M.; Soares, A. M. V. M.; Gonçalves, F.; Lopes, I. Influência da temperatura na toxicidade de cobre em girinos de rã verde *Pelophylax perezi*. *Captar*, v. 3, p. 66–77, 2011.
- Brodeur, J.; Candiotti, V. J.; Soloneski, S.; Larramendy M. L.; Ronco, A. E. Evidence of Reduced Feeding and Oxidative Stress in Common Tree Frogs *Hypsiboas pulchellus* from an Agroecosystem Experiencing Severe Drought, *Journal of Herpetology*, vol46,p.72-78. 2012.
- CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Proposta para derivação de critérios para contaminantes ambientais da agricultura, Relatórios. Relatório Técnico - Companhia Ambiental do Estado de São - Paulo, São Paulo. 2010
- CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 2018. Qualidade das águas interiores no estado de São Paulo 2017, Relatórios. Série Relatórios/CETESB, São Paulo. Freely, *Aguas-Interiores-no-Estado-de-Sao-Paulo-2017.pdf*. (Acessado em 10 Janeiro de 2020).
- Chasin, A. A. M.; Azevedo, F. A. Intoxicação e avaliação da toxicidade, *In: As bases toxicológicas da Ecotoxicología*. Rima, São Paulo, São Carlos. 2003.
- Connell, D. W. Basic concepts of Environmental chemistry. New York. Lewis Publishers, 268p. 1997.
- Connelly, P. Environmental Fate of Fipronil. Calif. Environ. Protec. Ag. California, EUA, 2001.
- Correia, F. V.; Langenbach, T.; Campos, T. M. Avaliação do transporte de atrazina em solos sob diferentes condições de manejo agrícola. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v. 34, n. 2, 2010.
- Costa, M. J.; Monteiro, D. A.; Oliveira-Neto, A. L.; Rantin, F. T.; Kalinin, A. L. Oxidative stress biomarkers e heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original. *Ecotoxicology*, v.17, p. 153-63. 2003.

- Cox, C. Insecticide factsheet: Fipronil. Journal of pesticide reform v. 25, no. 1, 2005.
- Culley, D. D. J. Have we turned the corner in bullfrog culture? Aquaculture Magazine, v. 7, p.20-24, 1981.
- Cunha, E. R., Delariva, R. L. Introdução da rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) In: SHAW, 1802: UMA REVISÃO. SaBios-Revista de Saúde e Biologia, 4(2), 2009.
- David, M.; Marigoudar, S. R.; Patil V. K.; Halappa, R. Behavioral, morphological deformities and biomarkers of oxidative damage as indicators of sublethal cypermethrin intoxication on the tadpoles of *D. melanostictus* (Schneider, 1799). Pesticide Biochemistry and Physiology, v. 103, n. 2, p. 127-134, 2012.
- David, M.; Shambanagouda, R. M.; Vumar, K. P.; Ramesh, H. Behavioral, morphological deformities and biomarkers of oxidative damage as indicator of sublethal cypermethrin intoxication on tadpoles of *D. melanostictus* (Schneider, 1799). Pesticide Biochemistry and Physiology, v. 103, p. 127-134, 2012.
- Davis, A., Rowland, S.J., John, A.W.G., Mcgonigle, D., Russell, A. E. Lost At Sea: where is all the plastic? Science, vol. 304, p. 838, 2004.
- Dornelles, M. F.; Oliveira, G. T. Effect of atrazine, glyphosate and quinclorac on biochemical parameters, lipid peroxidation and survival in bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*). Archives of environmental contamination and toxicology, vol. 66, p.415-429, 2014.
- Dornelles, M. F.; Oliveira, G. T.; Toxicity of atrazine, glyphosate, and quinclorac in bullfrog tadpoles exposed to concentrations below legal limits. Environmental Science and Pollution Research, v. 23, p. 1610-1620. 2016.
- Duellman, W. E.; Trueb, L.; Biology of Amphibians. New York: McGraw-Hill, 1994.
- EFSA (European Food Safety Authority). Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance fipronil. Finalised on 3 March 2006, revised version of 12 April 2006. EFSA Scientific report (2006)
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. In: Bélanger, J., Pilling, D. (Eds.), The State of the World's Biodiversity for Food and Agriculture. FAO Commission on Genetic Resources for Food and R.A. Moreira et al. Ecotoxicology and Environmental Safety 206 (2020) Agriculture Assessments, Rome, p. 572, 2019.
- Fernandes, T. C. C. Investigação dos efeitos tóxicos, mutagênicos e genotóxicos do herbicida trifluralina, utilizando *A. cepa* e *Oreochromis niloticus* como sistemas-teste. Referências 93 Tese (Mestrado). 2005, 212 f., Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2005.
- Fanali, L. Z., Valverde, B. S. L, Franco-Belussi, L., Provete, D. B., De Oliveira, C. Response of digestive organs of *Hypsiboas albopunctatus* (Anura: Hylidae) to benzo[a]pyrene. Amphib-Reptil, v. 38, p. 175-185, 2017.

Fanali, L.Z., Franco-Belussi, L., Bonini-Rodrigues, C.R., De Oliveira, C. Effects of benzo[*a*]pyrene on the blood and liver of *Physalaemus cuvieri* and *Leptodactylus fuscus* (Anura: Leptodactylidae). *Environ Pollut*, v. 237, p. 93-102, 2018.

Ficetola, G. F; Bernardi, F. Amphibians in a human-dominated landscape: the community structure is related to habitat features and isolation. *Biological Conservation*, v. 119, n. 2, p. 219-230, 2004.

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

Foster, B.J., Sparks, D.W. & Duchamp, J.E. Urban Herpetology II: amphibians and reptiles of the Indianapolis airport conservation lands. *Proc Indiana Acad Sci*, v. 113, p. 53-59. 2004.

Franco-Belussi, L.; Sköld, H.N.; De Oliveira, C. Internal pigment cells respond to external UV radiation in frogs. *Journal of Experimental Biology*, p. jeb. 134973, 2016.

Franco Belussi, L.; Fenali. Z. L.; De Oliveira. C.; UV-B affects the immune system and promotes nuclear abnormalities in pigmented and non-pigmented bullfrog tadpoles. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, v. 180, p. 109-117, 2018.

Frenzilli, G.; Nigro, M.; Lyons, B.P. The comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutation Research*, v. 681.p,80-92, 2009.

Frost, D. *Amphibian Species of the World: an Online Reference*. Version 6.0, American Museum of Natural History, New York, 2018. Disponível em: Acesso em: 15 maio 2018.

Frost, D. *Amphibian Species of the World: an Online Reference*. Version 6.0, American Museum of Natural History, New York, 2018. Disponível em. Acesso em: 20 nov. 2019.

Gant, D. B., Chalmers, A. E., Wolff, M. A., Hoffman, H. B., Bushey, D. F. Fipronil: action at the GABA receptor. *Reviews in Toxicology*, v. 2, p. 147-15, 1998.

Gibbons, D.; Morrissey, C.; Mineau, P. A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 22, p. 103 – 118, 2015.

Gibbons, J.; Scott, D.; Ryan, T.; Buhlmann, K.; Tuberville, T.; Metts, B.; Greene, J.; Mills, T.; Leiden, Y.; Poppy, S. & Winne, R. The global decline of reptiles, déjà vu amphibians. *BioScience*, v. 5, p.653–666, 2000.

Gibbs, J. P. Distribution of woodland amphibians along a forest fragmentation gradient. *Landscape Ecol*, v.13, p, 263-268. 1998.

Goff, A. D.; Saranjampour, P.; Ryan, L. M.; Hladik, M. L.; Covi, J. A.; Armbrust, K. L.; Brander, S. M. The effects of fipronil and the photodegradation product fipronil desulfinyl on growth and gene expression in juvenile blue crabs, *Callinectes sapidus*, at different salinities. *Aquat. Toxicol.*, v.186, p, 96–104. 2017.

Gosner K. L. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetological*, vol 16:183-190, 1960.

Guillette, L. J. J.; Woodward, A. R.; Crain, A. D.; Pickford, D. B.; Rooney, A. A.; Percival, H. F. Plasma steroid concentrations and male phallus size in juvenile alligators from Seven Florida lakes. *General and Comparative Endocrinology*, v. 116, p. 356–372, 1999.

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.

Gripp, H. S.; Freitas, J. S.; Almeida, E. A.; Bisnoti, M. C.; Moreira, A. B. Biochemical effects of fipronil and its metabolites on lipid peroxidation and enzymatic antioxidant defense in tadpoles (*Eupemphix nattereri*: *Leiuperidae*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 136, p. 173-179, 2017.

Grisolia, C. K. *Agrotóxicos- mutações reprodução e Câncer*. Brasília Universidade de Brasília. 2005

Grosjean, S.; Ohler, A.; Chuaynkern, Y.; Cruaud, C.; Hassanin, A. Improving biodiversity assessment of anuran amphibians using DNA barcoding of tadpoles. Case studies from Southeast Asia. *Comptes Rendus Biologies (Elsevier)*. Pii: S1631-0691(15)00093-1. 2015.

Gunasekara, A. S.; Truong, T.; Goh, K. S.; Spurlock, F.; Tjeerdema, R. S. Environmental fate and toxicology of Fipronil. *Journal of Pesticide Science* v.32, n. 3, p. 189-199, 2007.

Hainzl, D., Cole, L. M., Casida, J. E. Mechanisms for selective toxicity of Fipronil insecticide and its sulfone metabolite and desulfinyl photoproduct. *Chemical Resources Toxicology*, v. 11, p. 1529-1535, 1998.

Hartmann M. T., Hartmann P. A., Haddad C. F. B. Reproductive modes and fecundity of an assemblage of anuran amphibians in the Atlantic rainforest, Brazil. *Iheringia*, v.3, p.207-215, 2010.

Hayes, T.B.; Falso, P.; Gallipeau, S.; Stice, M. The cause of global declines: a developmental endocrinologist's perspective. *Journal of Experimental Biology*, v. 213, n. 6, p. 921-933, 2010.

- Hayes, T. B.; Khoury, V.; Narayan, A.; Nazir, M.; Park, A.; Brown, T.; Adame, L.; Chan, E.; Buchholz, D.; Stueve, T.; Gallipeau, S. Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 107, n. 10, p. 4612-4617, 2010.
- Haywood, L.K.; Alexander, G.J.; Byrne, M.J.; Cukrowska, E. *Xenopus laevis* embryos and tadpoles as models for testing for pollution by zinc, copper, lead and cadmium. *African Zoology*. Vol, 39(2): 163–174, 2004.
- Hildenbrandt A., Guillamon M., Lacore S., Tauler R., Barcelo D. Impact of pesticides used in agriculture and vineyards to surface and groundwater quality (North Spain). *Water Res*, vol 42.p,3315–3326, 2008.
- IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Relatório de comercialização de agrotóxicos: Boletins anuais de produção, importação, exportação e vendas de agrotóxicos no Brasil. 2018. Disponível em:< <http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>>. Acesso em: 19 Nov 2019.
- Ikeda, T.; Zhao, X.; Nagata, K.; Kono, Y.; Shono, T.; Yeh, J. Z.; Narahashi, T. Fipronil Modulation of Gama-Aminobutyric Acid Receptors in Rat Dorsal Root Ganglion Neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* v. 296, n. 3, p. 914-921, 2001.
- Jackson, D.; Cornell, C.B.; Luukinen, B.; Buhl, K.; Stone, D. Fipronil Technical Fact Sheet; National Pesticide Information Center, Oregon State University Extension Services.2009
- Josende, M. E.; Tozetti, A. M.; Alalan, M. T.; Mathies Filho, V.; Ximenez, S. S.; Silva Júnior, F. M. R.; Martins, S. E. Genotoxic evaluation in two amphibian species from Brazilian subtropical wetlands. *Ecological Indicators*, v. 49, p. 83-87, 2015.
- Konstantinou I. K., Hela D. G., Albanis Ta. The status of pesticide pollution in surface waters (rivers and lakes) of Greece. Part I. Review on occurrence and levels. *Environ Pollut.* pp. 555–570, 2006.
- Lai, W. Pesticide use and health outcomes: Evidence from agricultural water pollution in China. *Journal of Environmental Economics and Management*, China, v. 86, p. 93-120, 2017.
- Landis, W. G.; Yu, M. H. Introduction to environmental toxicology: Impacts of Chemicals upon ecological Systems. 2. Ed. BOCA Raton: Lewis Publishers, 390p, 1999.
- Lau, E. T. C.; Karraker, N. E.; Kenneth, M. Y. L. Temperature-dependent acute toxicity of Methomyl pesticide on larvae of three Asian amphibian species. *Environmental Toxicology e Chemistry*. 30/87 (Toxicology); 52/216 (Environmental Sciences), 2015.
- Li, H., Zhang, R., Sun, F. Evaluation of toxicological responses and promising biomarkers of topmouth gudgeon (*Pseudorasbora parva*) exposed to fipronil at environmentally relevant levels. *Environ Sci Pollut Res* vol 27, 24081–24089 (2020).

Locke, M. A.; Zablutowicz, R. M.; Steinriede, R. W.; Dabney, S. M. Conservation management practices in Mississippi delta agriculture: Implications for crop production and environmental quality. In: VAN SANTEN, E. ed. Making conservation tillage conventional: Building a future on 25 years of research. In: Annual southern conservation tillage conference for sustainable agriculture, Auburn, 2002.

Lozi, A. Toxicidade comparada dos metais pesados, arsênio, cádmio, chumbo, cromo e níquel, sobre parâmetros reprodutivos de camundongos machos adultos após exposição aguda. UFV – Universidade Federal de Viçosa. 2019.

Mann, R.M.; Hyne, R. V.; Choung, C.B.; Wilson, S.P. Amphibians and agricultural chemicals: Review of the risks in a complex environment. *Environmental Pollution*, v. 157, n. 11, p.2903-2927, 2009.

Marcantonio, A. S.; Ranzani-Paiva, M. J.T.; Menezes, F. Toxicidade do sulfato de zinco para girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*): toxicidade aguda, crônica e parâmetros hematológicos. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 37, n. 2, p. 143- 154, 2011.

Margarido, T. C. S.; Felício, A. A.; Rossa-Feres, D. C.; Almeida, E. A. Biochemical biomarkers in *Scinax fuscovarius* tadpoles exposed to a commercial formulation of the pesticide Fipronil. *Marine Environmental Research*, v. 91, p. 61-67, 2013.

Mccomb, B. C.; Curtis, L.; Chambers, C. L.; Newton, M.; Bentson, K. Acute toxic hazard evaluations of glyphosate herbicide on terrestrial vertebrates of the oregon coast range. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 15, n. 3, p. 266-272, 2008.

Mcdiarmid, R. W.; Altig, R. Diversity. Familial and generic characterizations. In McDiarmid RW and Altig R (editors), *Tadpoles. The biology of anuran larvae*: 295–337. Chicago: The University of Chicago Press, 1999.

Mcdiarmmid, R. W.; Altig, R. *Tapdoles: the biology of anuran larvae*. Roy: Chicago, 1999.

MMA - Ministério do Meio Ambiente, Brasil. Agrotóxicos. 2019. Disponível em: Acesso em: 15 de fevereiro de 2020.

Montanha, F. P.; Pimpão, C. T. Efeitos toxicológicos de piretróides (cipermetrina e deltametrina) em peixes - Revisão. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, vol 18, p. 1-58, 2012.

Moreira, J. C; Peres, F; Pignati, W. A; Dores, E. F. G. C. Avaliação do risco à saúde humana decorrente do uso de agrotóxicos na agricultura e pecuária na região Centro Oeste. *Relatório de Pesquisa*. Brasília: 2010, CNPq 555193/2006-3.

Naqvi, G.; Shoaib, N.; Ali, A. M. Genotoxic Potential of Pesticides in the Peripheral Blood Erythrocytes of Fish (*Oreochromis mossambicus*). *Pakistan Journal of Zoology*, v. 48, n. 6, p. 1643-1648, 2016.

- Oliveira, M. C. L. M.; Santos, M. B.; Loebmann, D.; Hartman, A.; Tozetti, A. M. Diversity and associations between coastal habitats and Anurans in southern-most Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 85, p. 575–583, 2013.
- Oliveira, M.F.; Geihs, M.A.; França, T.F.A.; Moreira, D.C.; Hermes-Lima, M. Is “Preparation for Oxidative Stress” a Case of Physiological Conditioning Hormesis? *Front. Physiol*, v. 9, 945, 2018.
- Oliveira, P. R.; Bechara, G. H.; Denardi, S. E.; Oliveira, R. J.; Mathias, M. I. C. Genotoxic and mutagenic effects of fipronil on mice. *Experimental and Toxicologic Pathology*, v. 64, n. 6, p.569-573, 2012.
- Omitoyin, B. O.; Ajani, E. K.; Adesina, B. T.; Okuagu, C. N. F. Toxicity of lindane (Gamma Hexachloro – CycloHexane) to *Clarias gariepinus* (Burchell 1822). *World Journal Zoology*, v. 1, n. 1, p. 57-63, 2006.
- Peret, A. M.; Oliveira, L. F.; Bianchin Jr., I.; Selegim, H. M. R.; Peret, A. C. & Mozeto, A. A. Dynamics of fipronil in Óleo Lagoon in Jataí Ecological Station, São Paulo – Brazil. *Chemosphere*, v. 78, n. 10, p 1225 – 1229, 2010.
- Ramesh, A.; Balasubramanian, M. Kinetics and hydrolysis of fenamiphos, fipronil, and trifluralin in aqueous buffer solutions. *Journal of Pesticide Chemistry*, v. 47, n. 8, p. 3367-3371, 1999.
- Rand, G. M. E Petrocelli, S. R. *Fundamentals of Aquatic toxicology*. Washington. 665p. 1985.
- Ratra, G. S.; Casida, J. E. Gaba receptor subunit composition relative to insecticide potency and selectivity. *Toxicol. Lett*, v. 122, p. 215-222, 2001.
- Reilly. J. T., McMullin. M. F., Beer. P. A., Butt. N., Conneally. E., Duncombe. A., Green, A. R., Michael. N. G., Gilleece. M. H., Hall. G. W., Knapper. S., Mead. A., Mesa. R. A., Sekhar. M., Wilkins. B., Harrison. C. N. & Writing. H. British Committee for Standards in, *Guideline for the diagnosis and management of myelofibrosis*. *British Journal of Haematology*, v. 158, p, 453–471, 2012
- Ribeiro A. C. A., Dores E. F. G. C., Amorim R. S. S., Lourencetti C. Resíduos de pesticidas em águas superficiais de área de nascente do rio São Lourenço-MT: validação de método por 72 extração em fase sólida e cromatografia líquida. *Química Nova* v. 36, 2013.
- Rissoli, R. Z., Abdalla, F. C., Costa, M. J., Rantin, F. T., McKenzie, D. J., & Kalinin, A. L. Effects of glyphosate and the glyphosate based herbicides Roundup Original® and Roundup Transorb® on respiratory morphophysiology of bullfrog tadpoles. *Chemosphere*, v. 156, p. 37-44. 2016.
- Rollins-Smith, L. A. Amphibian immunity–stress, disease, and climate change. *Developmental & Comparative Immunology*, vol 66, p. 111-119 2017.

Römbke, J., Schmelz, R. M.; Pélosi, C. Effects of Organic Pesticides on Enchytraeids (Oligochaeta) in Agroecosystems: Laboratory and Higher-Tier Tests. *Frontiers in Environmental Science*, 5(May), 2017.

Sabik, H.; Jeannot, R.; Rondeau, B. Multiresidue methods using solid-phase, extraction techniques for monitoring priority pesticides, including triazines and Degradation products, in ground and surface waters. *J. Chromatography A*, v.885, p. 217-236, 2000.

Sadaria. A. M., Labban.C.W., Steele. J. C., Maurer. M. M., Halden. R. U. Retrospective nationwide occurrence of fipronil and its degradates in U.S. wastewater and sewage sludge from 2001 – 2016. *Water Research*, v. 155, p. 465-473,2019.

Seixas Filho, J. T.; Mello, S. C. R. P.; Bastos, M. P.; Miranda, R. G. B.; Veiga, R. C. A. Efeito de diferentes salinidades da água sobre o desempenho de girinos de *Rana catesbeiana* (Shaw, 1802). *Augustus*, v. 8, n. 16, p. 14-23, 2003.

Semlitsch, R. D.; Scott, D. E.; Pechmann, J. H. K. Time and size at metamorphosis related to adult fitness in *Ambystoma talpoideum*. *Ecology*, v. 69, n. 1, p.184 - 192, 1988.

Semlitsch, R. D & Wilbur, H. M. Effects of pond drying time on metamorphosis and survival in the salamander *Ambystoma talpoideum*. *Copeia* 1988:978-983, 1988.

Silva, D. R., Avilall, A. L. Magrol, T. A. A. Zanella, R. O.E, Noldin, A.J. Monitoramento de agrotóxicos em águas superficiais de regiões orizícolas no sul do Brasil. *Ciência Rural*, v. 39, n. 9, p. 2.383-9, 2009.

Silva, E. T. D., Both, C., Filho, O. P. R. Food Habits of Invasive Bullfrogs and Native Thin-Toed Frogs Occurring in Sympatry in Southeastern Brazil. *South American Journal of Herpetology*, vol .11, p. 25-33, 2016.

Silva, H. S. V. P.; Loiola, C.; Pereira, S. R. F.; Santos, R. L.; Andrade, G. V.; Nunes, G. S. Toxicidade aguda e genotoxicidade do agrotóxico comercial Folisuper 600BR a girinos de *Physalaemus cuvieri* (*anura: leiuperidae*). *Pesticidas*, Curitiba, v. 23, p. 1-10, 2013.

Silva, L. C. M., Moreira, R. A., Pinto, T. J. S. Acute and chronic toxicity of 2,4-D and fipronil formulations (individually and in mixture) to the Neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. *Ecotoxicology*, 2020.

Silva, M. R.; Campos, A. C. E.; Bohm, F. Z. Agrotóxicos e seus impactos sobre ecossistemas aquáticos continentais. *SaBios: Revista Saúde e Biologia*, v. 8, n. 2, p 46-58, 2013.

Simon-Delso, N., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L. P. Et Al. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends uses, mode of action and metabolites. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 22, p. 5 – 34 2015.

Singh B., Sharma D. K., Kumar R., Gupta A. Controlled release of the fungicide thiram from starch–alginate–clay based formulation. *Applied Clay Science*, v.45, p.76-82, 2009.

Solomon, G. M.; Schettler, T. Environment and health: endocrine disruption and potential human health implications. *Canadian Medical Association or its Licensors*, v.163, n.11, p.1471-1476, 2000.

Sousa, G.; Fontaine, F.; Pralavorio, M.; Botta-Fridlund, D.; Letreut, Y.; Rahamni, R. Insecticide cytotoxicity and CYP1A1/2 induction in primary human and rat hepatocyte cultures, *Toxicol. In Vitro*, v.11, p.451–457, 1997.

Spadotto, C. A.; Gomes, M. A. F.; Luchini, L. C.; Andréa, M. M. de. Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações. In: *Embrapa Meio Ambiente*, São Paulo, 2004.

Stafford E. G.; Tell L. A.; Lin, Z.; Davis, J. L., Vickroy, T. W.; Riviere J. E.; Baynes, R. E. Consequences of fipronil exposure in egg-laying hens. *J Am Vet Med Assoc*. 2018.

Stephan, C. E.; Mount, D. I. 1973. Use of toxicity tests with fish in water pollution control. *In*, *Biological methods for the Assessment of Water quality ASTM STP 528*. Am. Soc. Testing end materials. Philadelphia, Pa. 1973.

Thomson, J.R., Maron, M., Grey, M.J., Catterall, C.P., Major, R.E., Oliver, D.L. Avifaunal disarray: quantifying models of the occurrence and ecological effects of a despotic bird species. *Diversity and Distributions*, vol. 21, p.451-464, 2015.

Thompson, R.C., Moore, C.J., Vomsaal, F.S., Swan, S.H. Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends. *Philos. Trans. R. Soc. B*, vol. 364, p. 2153–2166, 2009.

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

USEPA - United States Environmental Protection Agency. Guidelines for ecological risk assessment. EPA/630/R-95/002F. U.S.EPA. Risk Assessment Forum. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency, 1998. 188p.

USEPA - United States Environmental Protection Agency. Fipronil for use on Rice (Regent ®, Icon®) and Pets (Frontline ®). HED Risk Assessment. Chemical 129121. Barcodes D242090, D245656, D245627, & D241676. Cases 288765, 031271, 060305, & 061662. Submissions S535772, S541670, S541551, S534929. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Washington DC. 1998.

USEPA - United States Environmental Protection Agency. New Pesticide Fact Sheet. U.S.EPA. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances p.1-10, 1996.

Valavadinis, A. Neonicotinoid insecticides. Banned by the European Union in 2018 after Scientific Studies Concluded their Use Harm Honey Bees. *Sci Rev*, vol. 1, p.1–36, 2018.

Vander Sluijs, J. P., Amaral-Rogers, L. P. Belzunces. 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, p. 148-154, 2015.

Vasconcelos, A. M. Avaliação dos efeitos do agrotóxico Vertimec® 18CE sobre girinos de *Lithobates catesbeianus* (*Amphibia, Anura, Ranidae*). 2014. 149 f. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2014.

Veiga, A. B. O uso do teste de A. cepa para detectar a toxicidade do inseticida Nuvacron. Monografia (Conclusão do curso de Ciências Biológicas), 1995. 58 f. – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 1995.

Walker, C.H.; Hopkin, S.P.; Sibly, R.M.; Peakall, D.B. Principles of ecotoxicology. 3. ed. Boca Raton: Taylor & Francis Group. 2006.

Walker, M.; Wachlevski, M.; Nogueira-Costa, P.; Garcia, P. C. A.; Haddad, C. F. B. A new species of *Fritziana* Mello-Leitão 1937 (*Amphibia: Anura: Hemiphractidae*) from the Atlantic Forest, Brazil. *Herpetologica*, v. 74, p. 329-3341, 2018.

Welss, K. D. The ecology and behavior of amphibians. Chicago: The University of Chicago. Press 1400p. 2007.

Weltje, L.; Ufer, A.; Hamer, M.; Sowing, P.; Demming, S.; Dechet, F. Risk assessment considerations for plant protection products and terrestrial life-stages of amphibians. *Science of the Total Environment*, v. 636, p. 500 - 511, 2018.

Wilde, G.E.; Whiworth, R.J.; Claassen, M.; Shufran, R.A. Seed treatment for control of wheat insects and its effect on yield. *J. Agr. Urban. Entomol*, v.18, p.1-11, 2001.

Wrubleswski, J.; Reichert Jr, F. W.; Galon, L.; Hartmann, P. A.; Hartmann, M. T. Acute and chronic toxicity os pesticides on tadpoles of *Physalaemus curvieri* (*Anura, Leptodactylidae*). *Ecotoxicology*, v. 27, n. 3, p. 369-368, 2018.

Yan, L.; Gong, C.; Zhang, X.; Zhang, Q.; Zhao, M.; Wang, C. Perturbation of metabonome of embryo/larvae zebrafish after exposure to fipronil. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v.48, p.39-45, dez.2016.

Ying Y.; Xu S.; Sun H.; Chang D.; Yin Y.; Zheng H.; Xu H.; Lou Y. Gelation of photocrosslinkable carboxymethyl chitosan and its application in controlled release of pesticide. *Carbohydrate Polymers* 86:1007-1013. Chevillard, A.; Coussy, H. A.; Guillard, V.; Gontard, N.; Gastaldi, E.; *Polym. Degrad. Stab.* 2012, 97, 2060. 15, 2011.

Young, B.E., Lips, K.R., Reaser, J.K., Ibáñez, R., Salas, A.W., Cedeño, J.R., Coloma, S.R., Ron, S.R., La Marca, E., Meyer, J.R., Muñoz, A., Bolaños, F., Chaves, G. & Romo, D. Population declines and priorities for amphibian conservation in Latin America. *Conserv. Biol.* 15:1213-1223, 2001.

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

RESUMO

A cienciometria é conhecida como a pesquisa quantitativa da produção científica, que permite entender melhor a amplitude e a natureza das atividades de pesquisa desenvolvidas nas diferentes áreas do conhecimento de diversos países, instituições e pesquisadores. O rápido avanço da ciência é, muitas vezes, de difícil acompanhamento, tendo em vista sua crescente mudança. A cada dia torna-se mais difícil a possibilidade de manter-se atualizado perante os acontecimentos científicos relevantes. Para realizar as buscas dos artigos relevantes, foram determinados quatro termos de busca: "*Lithobates catesbeianus*", em associação com os termos "*Lithobates catesbeianus* ecotoxicológicos", "*Lithobates catesbeianus* agrotóxicos", "*Lithobates catesbeianus* testes micronúcleos" e, "*Lithobates catesbeianus* histologia" (utilizando também o termo *Rana catesbeiana* para as 4 variações). Estes termos de busca foram inseridas em três bases de dados (*Web of Science, Scielo e Scopus*) como forma de busca aos artigos acadêmicos (fonte primária). Após a busca bruta realizada nas três bases de dados com os quatro termos de busca, foram encontrados 1.759 artigos científicos em periódicos de acesso livre, que continham no título uma dos termos de busca. Após a primeira filtragem, que solicita a presença de um dos termos de busca no conjunto de palavras-chave, obtivemos um total de 247 artigos. Nessa etapa foram rejeitados artigos em duplicidade, o que resultou em 73 artigos selecionados como material a ser explorado. Todos estes trabalhos utilizaram a espécie *Lithobates catesbeianus* (=Rana catesbeiana) como modelo para realização das pesquisas científicas em laboratórios. O presente estudo visou reunir esses artigos científicos disponíveis nas bases de dados exploradas e conseguiu apresentar as vantagens de se utilizar a espécie *Lithobates catesbeianus* (=Rana catesbeiana) como ferramenta nos ensaios em laboratório e no monitoramento da qualidade ambiental.

Palavras-chave: *Lithobates catesbeianus*, cienciometria, espécie modelo experimental.

CHAPTER I – CURRENT STATUS OF KNOWLEDGE ON THE USE OF *LITHOBATES CATESBEIANUS* (=RANA CATESBEIANA) AS A MODEL SPECIES FOR AGROCHEMICAL EFFECTS STUDIES

ABSTRACT

Scientometrics is known as the quantitative research of scientific production, which allows a better understanding of the breadth and nature of research activities developed in different areas of knowledge in different countries, institutions and researchers. The rapid advance of science is often difficult to follow up with, in view of its increasing change. Every day it becomes more difficult to keep up to date with relevant scientific events. To satisfy the search for the materials, four search terms were determined: "*Lithobates catesbeianus*", in association with the terms "*Lithobates catesbeianus* ecotoxicological", "*Lithobates catesbeianus* agrotoxic", "*Lithobates catesbeianus* micronucleus tests" and, "*Lithobates catesbeianus* histology" (also using the term *Rana catesbeiana* for the three variations). These strings were, inserted in three databases (Web of Science, Scielo and Scopus) as a way of searching for academic articles (primary source). After the crude search carried out in the three databases with the four strings, 1759 scientific articles were, found in open access journals, which contained in the title one of the search strings. After the first filtering, which prompts for the presence of one of the strings in the keyword set, we obtained a total of 247 articles. In this stage, duplicate articles were, rejected, which resulted in 73 articles selected as material to be explored. All these studies used the species *Lithobates catesbeianus* (=Rana catesbeiana) as a model for conducting scientific research in laboratories. The present study aimed to gather these scientific articles available in the databases explored and was able to present the advantages of using the species *Lithobates catesbeianus* (=Rana catesbeiana) as a tool in laboratory tests and environmental quality monitoring.

Keywords: *Lithobates catesbeianus*; scientometrics; experimental model species.

INTRODUÇÃO

A cienciometria é conhecida como a pesquisa quantitativa da produção científica, iniciada na década de 1960 pela Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura (UNESCO) e a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE), que desenvolveram metodologias para a avaliação da atividade científica e tecnológica (SPINAK, 1998; FIGUEIRA et al., 1999 apud GARRIDO & RODRIGUES, 2005). As metodologias aceitas internacionalmente estão descritas nos Manuais de Frascati, de Oslo e de Canberra e são as referências clássicas para medir os resultados tecnológicos das pesquisas e desenvolvimentos (SPINAK, 1998). Alguns índices oriundos da bibliometria, como frequência de artigos e citações destes em bases de dados indexadas, além do fator de impacto dos periódicos onde estes são publicados, são as ferramentas da cienciometria (YAMAMOTO et al., 1999).

Anfíbios e a Pesquisa Científica

Os organismos da classe *Amphibia* surgiram há aproximadamente 350 milhões de anos e foram os primeiros vertebrados terrestres (ZHANG, 2011). Atualmente, existe um total de 8,365 espécies descritas de anfíbios, que são classificados em três ordens: Anura (sapos, rãs e pererecas), Caudata (salamandras) e Gymnophiona (cecílias) (ORR, 2000; FROST, 2019).

Muitas espécies de anfíbios destacam-se quanto a sua utilização pelos seres humanos. Um exemplo disto são as espécies que representam modelos ideais, seja para estudos médicos como também para a investigação herpetológica e de monitoramento ambiental da qualidade da água, solo e ar (ROURKE, 2007). A espécie *Bufo bufo* (sapo comum europeu) é mais visada para estudos genéticos, devido à facilidade de monitoramento do seu desenvolvimento, e aqueles em ambientes naturais (HITCHINGS & BEEBEE, 1998). Além disso, os anfíbios já foram utilizados como controle biológico intencional em algumas regiões, o que gerou estudos de impacto ambiental, como é o caso de *Glandirana rugosa* no Havaí (KLEECK & HOLLAND, 2018) e *Bufo marinus* na Austrália (SHINE, 2010).

É fundamental ressaltar que diversos fatores podem motivar pesquisas sobre estratégia no uso de determinada espécie como modelo para experimento em

laboratório. Segundo Jaric et al. (2019), há três principais categorias determinantes. A primeira diz respeito às características intrínsecas à espécie, como tamanho, morfologia, comportamento, aspectos reprodutivos, dentre outros. A segunda é a nível populacional ou espacial, como abundância, alcance, risco de extinção e habitat. Já a terceira são os fatores socioeconômicos, como a presença ou não de valores ecológicos, culturais ou econômicos da espécie e se há potencial ameaça aos seres humanos (JARIC et al., 2019).

Além disso, Davies et al. (2018) demonstraram que pesquisas com espécies ameaçadas de extinção podem estar enviesadas pelo interesse da população em determinados grupos animais (como mamíferos e pássaros), enquanto outros (como peixes, anfíbios e répteis) podem receber menor atenção por não ter este apelo popular.

Em síntese, diversos fatores podem influenciar a pesquisa sobre uma determinada espécie (FLEMING & BATEMAN, 2016). Uma forma eficiente de identificar os potenciais que motivam a pesquisa científica é a utilização dos métodos cienciométricos. Deste modo, além de se investigar as tendências nas pesquisas sobre a biodiversidade, é possível identificar as variáveis geradoras dos vieses e tomar as medidas propícias para utilização de uma espécie (LIU et al., 2011; STORK & ASTRIN, 2014).

***Lithobates catesbeianus* (= *Rana catesbeiana*) como modelo animal**

Modelos experimentais são uma representação de parte da realidade que visa, de maneira precisa, mas dentro das suas limitações, compreender fenômenos naturais (FERREIRA et al., 2005). Podem ser desde cultura de células a modelos animais vivos, os quais podem ser utilizados em todos os campos da pesquisa biológica (FERREIRA et al., 2005). Os anfíbios têm muitos recursos que os tornam bons modelos animais, tais como tolerâncias a alterações no oxigênio e temperatura, similaridades aos mamíferos, fisiologia básica e ampla gama de habitats ocupados (BURGGREN & WARBURTON, 2007). Além disso, são componentes críticos de ambientes aquáticos e terrestres, visto que podem ser influenciados por fatores antrópicos e, em consequência, alterar ecossistemas inteiros (HOPKINS, 2007).

Segundo O'Rourke (2007), o gênero *Lithobates* (anteriormente denominado *Rana*) é um dos mais utilizados como modelo em pesquisas. A espécie *Lithobates*

catesbeianus (= *Rana catesbeiana*) popularmente conhecida como rã touro, é uma espécie exótica, originária da América do Norte, e enquadra-se na família *Ranidae*, que agrupa as rãs verdadeiras. Essa família possui ampla distribuição mundial, com cerca de 23 gêneros e centenas de espécies, dentre os quais destaca-se o gênero *Lithobates*. Este gênero possui grande importância em decorrência de seu emprego em criações comerciais. No Brasil, essa espécie tem interesse econômico, o que intensifica cada vez mais os estudos do ponto de vista biológico e de produção.

A manutenção e reprodução de anfíbios nativos em laboratórios para fins acadêmicos ainda é bastante dificultada, já que se torna necessário desenvolver habitats compatíveis aos naturais, principalmente para estabelecer um modelo padronizado e um ambiente laboratorial propício (BUENO-GUIMARÃES et al., 2001). Entretanto, a utilização da rã touro em criações comerciais facilita o acesso aos pesquisadores a essa espécie, podendo ser utilizada em todas as fases de seu desenvolvimento e durante todo o ano, independente do período reprodutivo.

A *Lithobates catesbeianus* tem sido identificada como espécie com alto potencial na avaliação de efeitos deletérios de águas contaminadas. Vários autores utilizam girinos de *Lithobates catesbeianus* em experimentos de toxicidade e poluição aquática, devido a sua ampla ocorrência, facilidade de criação e aquisição, por tratar-se de um animal importante na cadeia alimentar, dentre outros fatores (GUIMARÃES et al., 2001; FORDHAN et al., 2001; LOMBARDI et al., 2002; BUENO-FERREIRA et al., 2004; BOONE et al., 2007; OSSANA et al., 2013). Além disso, essa espécie possui longo período larval, o que aumenta a probabilidade de exposição a contaminantes aquáticos, facilitando a ocorrência de exposição múltipla (BOONE et al., 2001). Espécies com período larval mais curto são menos propensas a se exporem repetidamente a contaminantes aquáticos, de modo que podem não ser organismos ideais para experimentos ecotoxicológicos (BOONE et al., 2001).

A utilização da *Lithobates catesbeianus* em testes ecotoxicológicos é validada, ainda, pela necessidade de um modelo representante dos anfíbios. As espécies modelos geralmente apresentam características peculiares, como facilidade no cultivo e aclimação em laboratório, baixo custo de aquisição/manutenção, sensibilidade a concentrações ambientais relevantes de compostos potencialmente tóxicos e poder de adaptação a diversas condições (CHAPMAN, 2002). Essas características são muitas vezes condizentes com aquelas de espécie invasoras/exóticas (GIOVANELLI et al., 2008).

Em vista da grande utilização da espécie *Lithobates catesbeianus* em pesquisas experimentais, bem como de todos os fatores descritos acima, que tornam a espécie *Lithobates catesbeianus* um bom modelo animal, justifica a escolha por utilizar esta espécie no estudo.

OBJETIVOS

Esta pesquisa tem por objetivo avaliar e descrever os trabalhos que utilizaram a *Lithobates catesbeianus* em sinonímia com (= *Rana catesbeiana*) como animal modelo que atende todas as características morfológicas e fisiológicas que um bioindicador deve apresentar para testar efeitos de agroquímicos, avaliando as respostas em diferentes biomarcadores de efeito.

METODOLOGIA

Foi feita uma pesquisa cienciométrica sobre *Lithobates catesbeianus* (= *Rana catesbeiana*) utilizando-se três bancos de dados: Web of Science, Scopus e Scielo. As bases foram acessadas por meio da internet utilizando a conexão VPN disponibilizada pela UNESP – Universidade Estadual Paulista, aos discentes de Pós Graduação. As palavras-chave buscadas (*termos de busca*) foram o nome da espécie, “*Lithobates catesbeianus*”, e sua combinação com outras quatro variáveis: “agrotóxicos”, “efeitos ecotoxicológicos” e “*Lithobates catesbeianus* histologia”, “teste de micronúcleos”. Os resumos não foram incorporados ao banco de dados nesta primeira busca, para evitar superestimação/sobreposição de resultados de pesquisa. A pesquisa de banco de dados ocorreu até dezembro de 2020. Buscou-se artigos científicos, teses, dissertações, monografias e periódicos, publicados nos últimos 10 anos, entre 2010 a 2020. Esta revisão da literatura científica foi baseada e nos estudos de (NABOUT et al., 2012, 2014).

Após uma busca geral realizada nas três bases de dados, com os cinco termos de busca utilizados, um total de 1.759 artigos científicos foram disponibilizados, com pelo menos um dos termos de busca. Os artigos foram selecionados, em uma primeira filtragem, conforme alguns critérios: que fosse de acesso livre, que apresentassem algum dos termos de busca no título, bem como no conjunto de palavras-chave. Nesta etapa foram selecionados 247 artigos, dos quais foram excluídos os artigos em

duplicidade e, posteriormente, seguiram para a segunda etapa da filtragem. Na segunda filtragem foram selecionados os artigos que apresentaram a aplicação da *Lithobates catesbeianus* (= *Rana catesbeiana*) em alguma atividade experimental de laboratório, o que foi avaliado mediante a leitura dos resumos de cada um dos artigos obtidos na primeira seleção. Finaliza-se a busca com apenas 73 artigos, selecionados como material a ser explorado (Tabela 1). Os artigos selecionados foram agrupados conforme as palavras chaves usadas nas bases de dados.

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

Filtro	Termos de busca	Wos	Scopus	SciELO	Total
1	<i>L. catesbeianus</i>	587	573	599	1759
2	<i>L. catesbeianus</i> e ecotoxicológicos	552	520	584	1656
3	<i>L. catesbeianus</i> e agrotóxicos	74	67	98	239
4	<i>L. catesbeianus</i> e Micronucleus	70	73	92	235
5	<i>L. catesbeianus</i> e histologia	42	36	38	116
Relevantes, exceto duplicidades					73

Wos – *Web of Science*. SciELO

Fonte: Autor

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A fim de facilitar a leitura e anotações sobre os estudos selecionados, os trabalhos foram organizados segundo as palavras-chave buscadas. Das 73 publicações, em 37% dos estudos constavam o termo de busca “*Lithobates catesbeianus* e agrotóxicos”, em 24% “*Lithobates catesbeianus* e micronúcleos”, em 20% “*Lithobates catesbeianus* e ecotoxicológico” e 19% “*Lithobates catesbeianus* e hepatotóxico” (Figura 1).

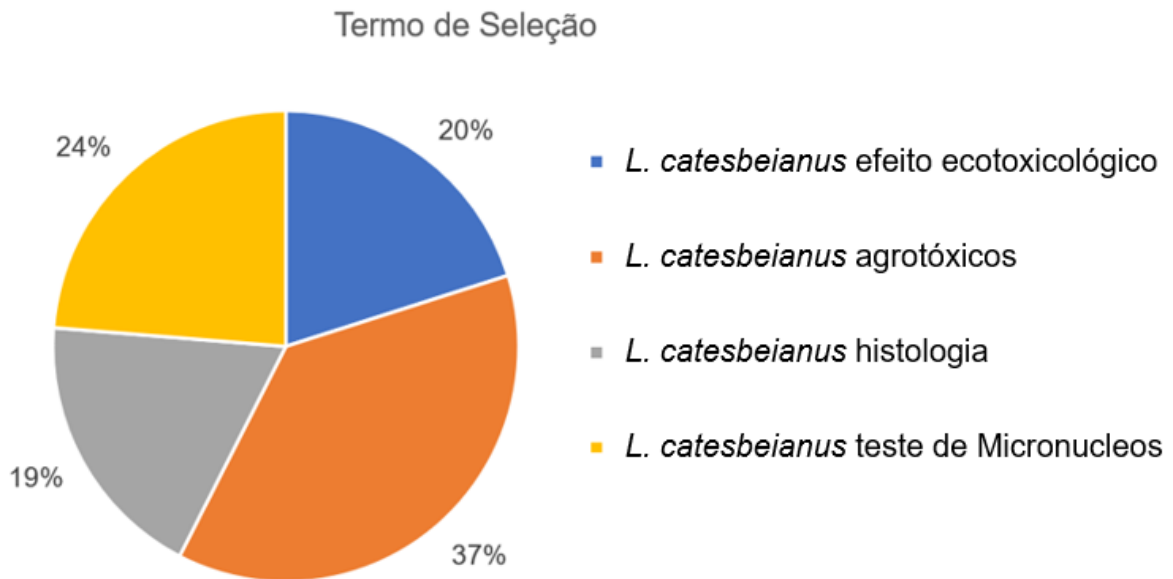


Figura 1. Distribuição dos trabalhos encontrados, segundo as palavras chaves utilizadas para realização das buscas nas plataformas de dados
Fonte: Autor

Nestes últimos 10 anos, os trabalhos de pesquisas têm utilizado a espécie *Lithobates catesbeianus* (= *Rana catesbeiana*) como bioindicador no monitoramento da qualidade ambiental. É possível notar um crescente aumento dos estudos entre os anos de 2015-2018, sendo que nos anos seguintes esse número foi reduzido pela metade (Figura 2).

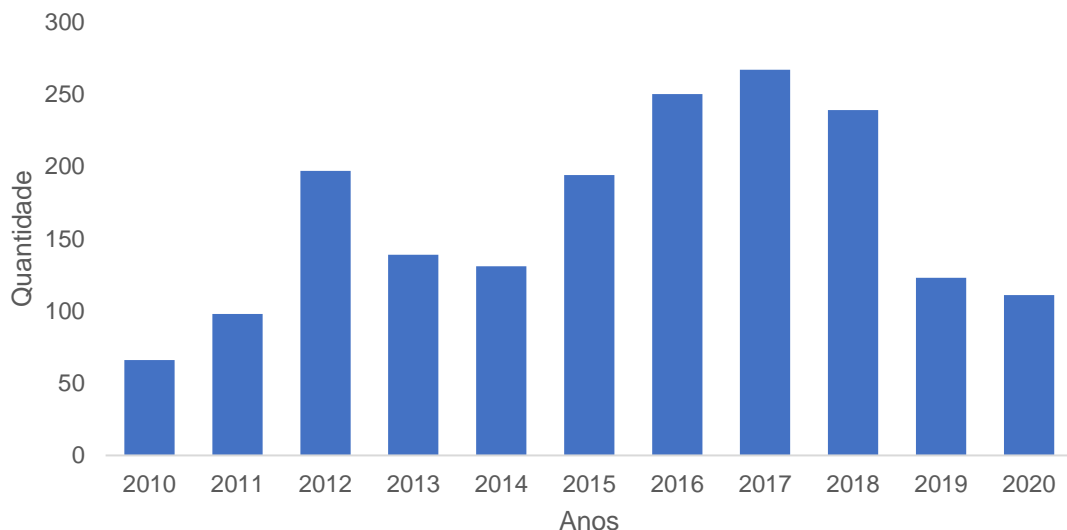


Figura 2. Tendência temporal em publicações de artigos sobre o uso da *Lithobates catesbeianus* (= *Rana catesbeiana*) como modelo experimental em pesquisas científicas entre os anos de 2010 a 2020.

Fonte: Autor

Os estudos avaliam predominantemente os efeitos de agrotóxicos de diferentes classes na espécie, destacando-se as pesquisas com agroquímicos (Clomazone, 2,4D, Extrato de Pietro, Abamectina, Atrazine, Glifosato, Dimetilamina, Perimetanol, Metilsulfuron-metil, Bispiribac sódio, Diuron, Picloran, Boral, Folisuper, Imidacloprid, cipermetrina, Biocarb, Facet®, quinclorac) com mais de 50% dos resultados, seguidos de metais pesados, com cerca de 10% (Figura 3). Outras interferências também foram estudadas, sendo 5% com os efluentes industriais, 5% águas de rios, 5% águas de irrigação, 5% medicamentos, 3% inertes e surfactantes, 3% efluentes hospitalares, 3% fungicidas, 2% nonilfenol, 2% temperatura máxima e mínima, 2% CO₂ e 2% algas e flores.

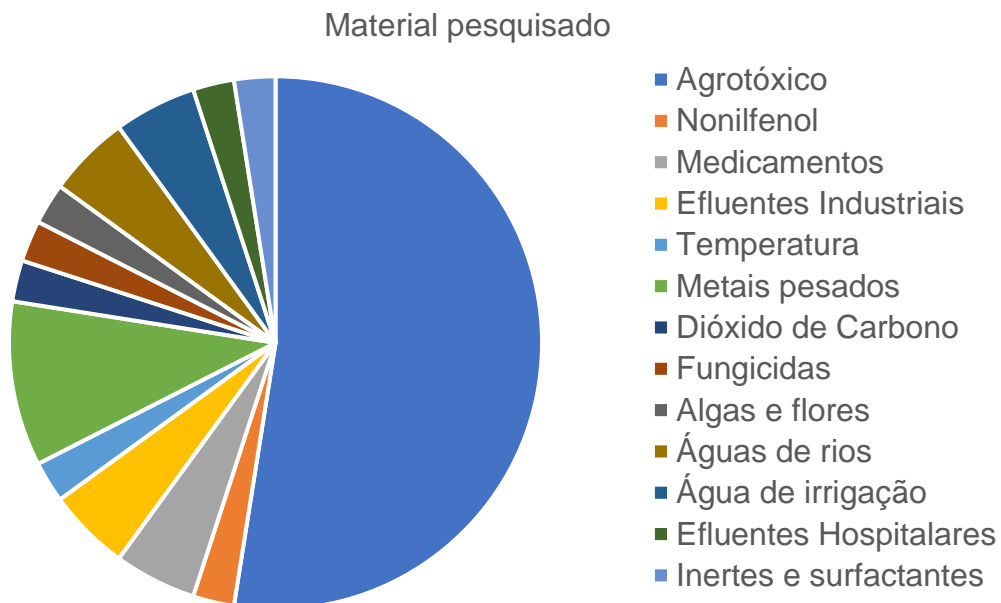


Figura 3. Relação das principais substâncias e estressores ambientais avaliados em estudos científicos, utilizando como modelo bioindicador a espécie *Lithobates catesbeianus* (= *Rana catesbeiana*).

Fonte: Autor

As correlações entre técnicas, material coletado e resultados analíticos obtidos em estudos sobre efeitos de agroquímicos, que foram selecionadas para elucidação no nosso trabalho estão demonstrados na Figura 4.

MATERIAL COLETADO PARA ANÁLISE		TESTES E TÉCNICAS APLICADAS		CONTEÚDO ANALISADO	
Sangue	13,04	Micronúcleos	Ferritina plasmática	Morfologia oral,	
MN	10,87		Varição hormonal e imunológica	Condição de dentição	
Morfologia	13,04	PAS, Azul	Temperatura, <u>Maxima</u> e mínima	Pigmentação da base mandibular	
Bioquímica	19,57	Morfometria	<u>Melanomacrófago</u>	Influências no cérebro	
Genético	2,17		Nanopartículas de agrotóxicos	Níveis normais e elevados de CO ₂	
Histologia	10,87	Agregação	Tecido ovariano	Pigmentação	
Fígado	15,22	Microcosmos	Anormalidades nucleares em eritrócitos	Peso corporal	
Intestino	2,17	Espectrofotometria	Escurecimento corporal	Biometria	
Enzimas	2,17	Células melanomacrófágicas	Gônadas e sangue	Cloaca Bucal	
Pigmentação	4,35				
Cérebro	2,17				
Rins	2,17				
Brânquias	2,17				

Figura 4. Correlação das principais técnicas aplicadas em relação ao material coletado e os conteúdos analisados nos artigos publicados e selecionados para esta pesquisa.

Fonte: Autor

Dentre os 73 artigos avaliados, a maior parte avaliou os efeitos de agroquímicos em diferentes parâmetros, utilizaram em suas pesquisas a espécie *Lithobates catesbeianus* (*Rana catesbeiana*). As substâncias estudadas são herbicidas, como DMA®, glifosato e atrazina, (DORNELLES & OLIVEIRA, 2013; OLIVEIRA et al., 2016; RISSOLI et al., 2016; COLTRO et al., 2017; RIOS et al., 2017; MESAK et al., 2018; FREITAS et al., 2019; MOREIRA et al., 2019; WILKENS et al., 2019), fungicidas (ARAÚJO et al., 2014), inseticidas, como piretroides e a abamectina (VASCONCELOS et al., 2016; MONTALVÃO & MALAFAIA, 2017; VASCONCELOS et al., 2017; AMARAL et al., 2018b; OLIVEIRA et al., 2019) ou estudos em áreas de conhecida atividade de agricultura (THIBODEAU et al., 2012). Os parâmetros avaliados variam desde aspectos bioquímicos, como análises enzimáticas (THIBODEAU et al., 2012; DORNELLES & OLIVEIRA, 2013; FRANÇAS et al., 2015; COLTRO et al., 2017; WILKENS et al., 2019), até avaliações comportamentais (ARAÚJO et al., 2014; VASCONCELOS et al., 2016).

Alguns dos estudos avaliados mostram que herbicidas como quinclorac, Boral, glifosato e atrazina podem gerar estresse oxidativo, principalmente (mas não apenas) no fígado, o que estimula a ação de enzimas antioxidantes (DORNELLES & OLIVEIRA, 2013; COLTRO et al., 2017; WILKENS et al., 2019). Essas enzimas podem auxiliar o organismo a retomar a homeostase oxidativa (COLTRO et al., 2017; WILKENS et al., 2019), porém, dependendo das condições e da toxicidade do composto, alguns efeitos como a peroxidação lipídica pode continuar aumentada mesmo após a ação das enzimas (DORNELLES & OLIVEIRA, 2013). Thibodeau et al.

(2012) demonstraram, ainda, que *Lithobates catesbeianus* coletadas em áreas de alta atividade de agricultura apresentam maiores taxas de oxidação do ácido retinóico (em comparação com áreas de menor atividade), o que pode estar relacionado com efeitos teratogênicos.

Estudos demonstrando genotoxicidade ou mutagenicidade de agroquímicos também foram comuns no levantamento realizado. Maiores taxas de anormalidades nucleares e/ou danos ao DNA de eritrócitos foram observadas em animais expostos a abamectina (MONTALVÃO & MALAFAIA, 2017; AMARAL et al., 2018b;), ao 2,4 D (MESAK et al., 2018) e ao extrato de piretro (OLIVEIRA et al., 2019). Respostas de ordem imunológica também podem ser desencadeadas por pesticidas, como o aumento dos leucócitos no sangue (OLIVEIRA et al., 2019) e aumento dos centros de melanomacrófagos e eosinófilos no fígado, acompanhado de lipidose (OLIVEIRA et al., 2016). Dois métodos diferentes para avaliar resíduos de α -cipermetrina e seus principais metabólitos em *Rana catesbeiana*, foram observados com a exposição ao risco de afetar negativamente o tecido dos anfíbios, e interromper a sinalização de TH ou induzir o estresse celular é baixo (YAO et al., 2017).

Os demais estudos com agrotóxicos demonstram efeitos na morfologia e/ou fisiologia da rã touro, e no seu comportamento. A abamectina e o 2,4D causam prolongamento do período de desenvolvimento dos girinos, além de, respectivamente alterar sua morfologia bucal e reduzir a taxa respiratória (VASCONCELOS et al., 2017; FREITAS et al., 2019). O sistema respiratório também é afetado por herbicidas a base de glifosato, visto que causam alterações na morfologia da pele dos animais, importante órgão para as trocas gasosas (RISSOLI et al., 2016; FREITAS et al., 2019). Já em relação aos aspectos comportamentais, alguns estudos demonstraram redução da capacidade natatória dos girinos e, ainda, a capacidade de reconhecer e evitar ambientes contaminados com determinados agrotóxicos (ARAÚJO et al., 2014; VASCONCELOS et al., 2016; FREITAS et al., 2019; MOREIRA et al., 2019).

Alguns dos estudos avaliados mostram genotoxicidade causada por íons de metais pesados como, cobre, zinco, cádmio, lítio e selênio, com alterações no metabolismo normal podendo gerar estresse oxidativo, principalmente no fígado, rim e músculos o que estimula a ação de enzimas antioxidantes (NOGUEIRA et al., 2017; MONTEIRO et al., 2018; CHAGAS et al., 2020; CARVALHO et al., 2020; VIDAL et al., 2021), além de danos no DNA eritrócito (OSSANA & SALIBIÁN, 2013; OSSANA et al., 2013; VERONEZ et al., 2016; BOIARSKI et al., 2020).

Lee *et al* (2010); Hammond *et al*, (2013); Flynn *et al* (2019), realizaram estudos com a *Rana catesbeiana* para avaliar os efeitos de nanopartículas dióxido de titânio, Cádmio, perfluoroalkyl usados em fabricação de produtos alimentícios, medicamentos, incluindo cosméticos, roupas, e eletrodomésticos, por apresentar riscos à saúde de humanos e animais selvagens comprometendo a tireoide, hormônios, metabolismo e metamorfose em anuros.

Os trabalhos mostraram que substâncias químicas presentes nas águas contaminadas de rios e córregos, ocasionadas por resíduos industriais, urbanos, hospitalares e fármacos provocam alterações nos parâmetros bioquímicos devido as reações metabólicas alterando as atividades enzimáticas, com potencial de gerar efeitos teratogênicos, genotoxicidade ou mutagenicidade em girinos e adultos *Lithobates catesbeianus* (= *Rana catesbeiana*) (OSSANA *et al.*, 2010; DAVIS *et al.*, 2010; CABANA & FERNÁNDEZ, 2010; KNOOP *et al.*, 2011; MERCANTE *et al.*, 2014; LING *et al.*, 2014; VELDHOEN *et al.*, 2014; PEREIRA *et al.*, 2015; VERONEZ *et al.*, 2016; AMARAL *et al.*, 2018; MONTEIRO *et al.*, 2018; ARAÚJO *et al.*, 2019; BOIARSKI *et al.*, 2020; OSSANA *et al.*, 2020; LIN *et al.*, 2020; TITON, *et al.*, 2021), toxinas HAB, (OSSANA & SALIBIÁN, 2013; SU *et al.*, 2020;), EDCs (SCAIA *et al.*, 2019) até avaliações de mudanças climáticas e os possíveis efeitos sobre os anfíbios e habitats e a conservação da vida selvagem (SANABRIA *et al.*, 2011; FULLER *et al*, 2011; JANCOWSKI *et al.*, 2013; KAMOROFF *et al.*, 2019; JOHOVIC *et al.*, 2020; GUEVARA-MOLINA *et al.*, 2020).

Ishihara *et al.*, (2019) e Guevara-Molina *et al.*, (2020) avaliaram estressores ambientais severos, como baixas temperaturas e os mecanismos epigenéticos que podem modificar as histonas no fígado de girinos de *Lithobates catesbeianus* aclimatado a baixa temperatura. Observou-se que girinos de *Lithobates catesbeianus* têm diferentes mecanismos epigenéticos quando em comparação com os de outros organismos, como répteis e mamíferos. Dentre as pesquisas, diferentes parâmetros da *Lithobates catesbeianus* foram avaliados, como bioquímicos, hormônios da tireoide, metamorfose, expressão genéticas, sistema biológicos (MOCHIZUKI *et al.*, 2012; JACKMAN *et al.*, 2018; LUEHR *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2021; QUEIROZ *et al.*, 2021). Wang *et al.*, (2021) utilizaram bioengenharia de tecidos em compostos bioativos em *Lithobates catesbeianus*, e concluíram que apresentaram excelentes propriedades osteocondutivas, como indicador em compostos bioativos. Luehr *et al*, (2018) aplicaram a Espectrometria de imagem para avaliar as transições nos perfis

metabólicos durante a metamorfose que envolve a transformação de um girino aquático em um sapo juvenil.

Jackman *et al.*, (2018) e Queiroz *et al.*, (2021) usaram repertório genético, a mioglobina e globina de *Rana catesbeiana* para avaliar a retenção e perda dos genes. Concluíram que o repertório de genes em anfíbios é ditado pela ascensão de um novo evento anterior de transposição. Mochizuki *et al.*, (2012) usando PCR em tempo real, investigaram o perfil de expressão genética no fígado de girinos *Rana catesbeiana* controlada pelo hormônio da tireoide podendo ser bloqueada pela exposição ao frio. Abbott *et al.*, (2021) usou *Rana catesbeiana*, como um modelo sensível e ambientalmente apropriado para testar TH e sua interrupção na ausência e presença de tiroxina (T4), hormônio que induz à metamorfose, e encontrou evidências de sua modulação causada por sucralose, esses dados mostraram atividades xenobióticas e perturbação da tireoide em anfíbios.

Estudos avaliados mostram que os herbicidas Tebuthiuron e 2,4-D, podem gerar alterações bioquímicas, fisiológicas e stress oxidativo, principalmente (mas não apenas) no fígado, o que estimula a ação de atividades enzimáticas, frequência de anormalidades, nucleares e peroxidação lipídica e processo inflamatório em girino de *Lithobates catesbeianus* (VIRIATO *et al.*, 2021; GROTT *et al.*, 2021). Respostas de ordem imunológica podem ser desencadeadas, o aumento dos leucócitos no sangue, diminuição dos níveis de plasma, melatonina e testosterona, fagocitose leucocitose induzida pela injeção de LPS intraperitoneal (2 mg/kg) em machos adultos de *Lithobates catesbeianus* (FIGUEIREDO *et al.*, 2021).

Efeitos citotóxicos, morfológicos, imunológicos e metabólicos, promoveram o alargamento dos sinusoides hepáticos e a vacuolização dentre outras alterações bioquímicas além alterações no fígado que prejudicam a homeostase e a saúde dos girinos *Lithobates catesbeianus*, após a exposição a sulfonato alquilbenzene (BELUSSI *et al.*, 2021). O uso do ácido guanidinoacético (GAA) e betaine na suplantação não fez melhorar a utilização de metionina para *Lithobates catesbeianus* (LIN *et al.*, 2021).

Alterações metabólicas, imunológicas e histopatológicas causadas por agrotóxicos presentes na água, chamam a atenção para efeitos subletais desencadeados pela presença de contaminantes no ambiente aquático utilizando modelos de nicho ecológico, para avaliar problemas como efeitos das mudanças

climáticas e espécies invasoras (VIDAL et al., 2021; FERNANDES *et al.*, 2021; LOW *et al.*, 2021).

Zhang et al., (2021) observaram que Ghrelin e motilina causaram alterações no estômago e intestino superior de três espécies de sapos usados em sua pesquisa: *Lithobates catesbeiana* e *Xenopus tropicalis*, *Pelophylax nigromaculata*.

Ressalta-se que a fase larval foi a mais utilizada nos estudos avaliados (Figura 5). Um apelo é relatado aos contaminantes ambientais, que quando liberados para o meio ambiente, naturalmente ou por causa de atividades humanas, podem contaminar habitats aquáticos, ameaçando populações de anfíbios que dependem desses ambientes para sua sobrevivência, especialmente os girinos, que passam todo seu período de desenvolvimento submersos.

Os resultados das correlações entre os trabalhos pesquisados trazem um destaque importante, visto que toda gama de elementos químicos inorgânicos (metais, não-metais e minerais) fazem parte da composição química dos pesticidas, tintas, insumos agrícolas, industriais e urbanos, em geral como substâncias coadjuvantes inertes, estando presentes em altas concentrações nos efluentes industriais e urbanos.

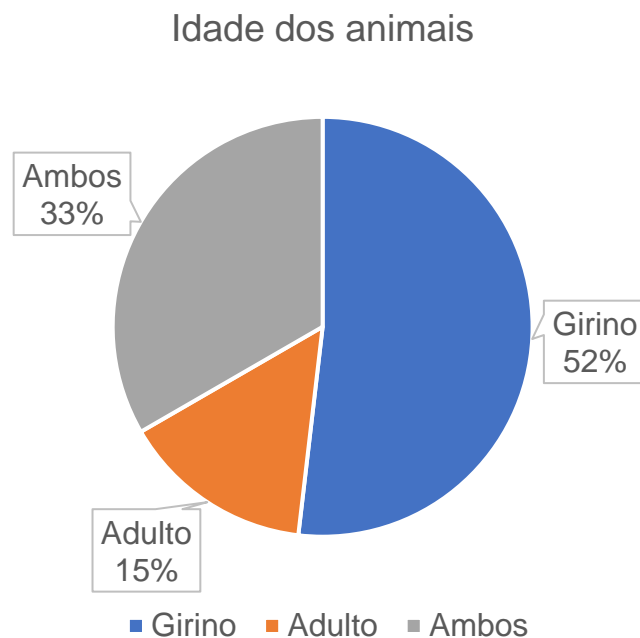


Figura 5. Estágio dos animais utilizados nos trabalhos publicados em artigos que foram selecionados para esta pesquisa.

Fonte: Autor

PERSPECTIVAS FUTURAS

As expectativas futuras para utilização desta espécie *Lithobates catesbeianus* (= *Rana catesbeiana*) em pesquisas científicas é bastante promissora, visto que se mostra um importante modelo animal para auxiliar nas determinações de concentração segura de substâncias a serem lançadas no ambiente.

Além dos fatores já citados anteriormente, como facilidade de obtenção, tamanho, longo período de desenvolvimento, entre outros, esta cienciometria demonstrou que os trabalhos experimentais realizados com a espécie nos últimos anos têm gerado bons resultados, sendo de grande importância especialmente na área da ecotoxicologia.

Nesse caso, é importante também o uso de biomarcadores, que são maneiras de medir a interação entre organismos biológicos e agentes ambientais, o que fornece meios efetivos para prevenção, vigilância e alerta, a fim de avaliar a qualidade da água e meio ambiente (BLAISE & GAGNÉ, 2009).

REFERÊNCIAS

- Abbott. E.A., Helbing. C. C. Sucralose Affects Thyroid Hormone Signaling in American Bullfrog [*Rana (Lithobates) catesbeiana*] Tadpoles. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, v.80, p. 735–744, 2021.
- Amaral, F. D.; Montalvão, F. M; Mendes, O. B.; Castro, S. L. A.; Malafaia, G. Behavioral and mutagenic biomarkers in tadpoles exposed to different abamectin concentrations. Environmental Science and Pollution Research, v.25, p. 12932–12946, 2018
- Amaral. D. F., Montalvão. M. F., Mendes. B. O., Araújo. A. P. C., Rodrigues. A.S. L., Malafaia. G. Sub-lethal effects induced by a mixture of different pharmaceutical drugs in predicted environmentally relevant concentrations on *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) (Anura, ranidae) tadpoles. Environmental Science and Pollution Research, v. 26, p. 600-616, 2019.
- Araújo.N.V.C. Shinn.C.; Vasconcelos.M. A.; Ribeiro.R. Gespindola.G.L.E. Preference and avoidance responses by tadpoles: the fungicide pyrimethanil as a habitat disturber. Ecotoxicology, v. 23, p. 851 860, 2014.
- Araújo. A. P. C., Mesak. C., Montalvão. M. F., Freitas. I. N., Chagas. T. Q., Malafaia. C.G. Anti-cancer drugs in aquatic environment can cause cancer: Insight about mutagenicity in tadpoles. Science of the Total Environment, v.650, p2284-2293, 2019.
- Astley, H. C. et al. Chasing maximal performance: a cautionary tale from the celebrated jumping frogs of Calaveras County. The Journal of Experimental Biology, Oxford, v. 216, p. 3947–3953, 2013.
- Azizi, E.; Roberts, T. T. J. Muscle performance during frog jumping: influence of elasticity on muscle operating lengths. Proceedings of the Royal Society B, Londres, v. 1, p. 1523–1530, 2010.
- Belussi. L. F., Jones-Costa. M., Salla. R. F., Souza. B. S. F., Vidal. F. A. P., Oliveira. C. R., Zacarin. E. C. M. S., Abdalla. F. C., Duarte. I. C. S., Oliveira. C. Hepatotoxicity of the anionic surfactant linear alkylbenzene sulphonate (LAS) in bullfrog tadpoles. Chemosphere, v. 266, p. 129014, 2021.
- Blaise, C.; Gagné, F. Bioassays and biomarkers, two pillars of Ecotoxicology: past, present and prospective uses. Fresenius Environ. Bull, v.18, p.135-139, 2019.
- Blaise, C.; Gagné, F.; Burgeot, T. Three simple biomarkers useful in conducting water quality assessments with bivalve mollusks. Environ.Sci.Pollut.Res., Canada 2016.
- Boiarski, R.D; Toigo, M.C.; Sobjak, M.T.; Santos, P.F.A.; Romão, S.; Guimarães, B. T. A.; Assessment of antioxidant system, cholinesterase activity and histopathology in *Lithobates catesbeianus* tadpoles exposed to water from an urban stream. Ecotoxicology, v.29, p.314 326, 2020.

Boone, M. D.; Multiple stressors in amphibian communities: effects of chemical contamination, bullfrog, and fish. *Ecological Applications*, v. 17, n. 1, p. 229-301, 2207.

Boone, M. D.; Bridges, C. M.; Rothermel, B. B. Growth and development of larval green frogs (*Rana clamitans*) exposed to multiple doses of insecticide. *Oecologia*, v. 129, p. 518-524, 2001.

Bueno-Guimaraes, H. M. Tadpole Epithelium Test: Potencial Use of *Rana catesbeiana* Histopathologic Epithelial Changes to Evaluate. *Bulletin of Environmental Contaminant and toxicology*, n. 67, p. 202-209, 2001.

Burggren, W. W.; Warburton, S. Amphibians as Animal Models for Laboratory Research in Physiology. *ILAR Journal*, Oxford, v. 48, n. 3, p. 260–269, 2007.

Cabana. M., Fernández. D. Nueva vía de entrada de Rana toro (*Lithobates catesbeianus*) en la Península Ibérica. *Bol. Asoc. Herpetol. Esp.* p.21,2010.

Carvalho. C.S.; Utsunomiya. H.S.M.; Stigliani. T.P.; Costa. M.J., Fernandes.M.N. Biomarkers of the oxidative stress and neurotoxicity in tissues of the bullfrog, *Lithobates catesbeianus* to assess exposure to metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.196, p. 110-560, 2020.

Coltro. M. L., Silva. P. R., Valgas. A. A., Miguel. C., Freitas. B. S. Oliveira. G.T. Influence of the Herbicide Facet® on Corticosterone Levels, Plasma Metabolites, and Antioxidant System in the Liver and Muscle of American Bullfrog Tadpoles. *Water Air Soil Pollut*, v. 16, p. 28-41, 2017.

Costa. M. J., Ribeiro. L. R., Salla. R. F., Gamero. F. U., Alves. L. M. L. M., Silva-Zacarin. E. C. M. Effects of the organophosphorus pesticide Folisuper 600 (methyl parathion) on the heart function of bullfrog tadpoles, *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802). *Braz. J. Biol.* v. 75, n. 4, p. S163-S168, 2015.

Chagas. C.R.C.; Utsunomiya.M.S.H. Fernandes.N.M. Carvalho.S.C.; Metabolic responses in bullfrog, *Lithobates catesbeianus* after exposure to zinc, copper and cadmium. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, v. 233, 2020.

Chapman, P. M. Integrating toxicology and : putting the “eco” into ecotoxicology, *Marine pollution bulletin*, v. n. 1, p. 7-15, jan.2002.

Dornelles, M. F.; Oliveira, G. T. 2014. Effect of atrazine, glyphosate and quinclorac on biochemical parameters, lipid peroxidation and survival in bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*). *Archives of environmental contamination and toxicology*, v. 66, p. 415-429, 2014.

Dornelles. M. F. Oliveira1. G.T. Toxicity of atrazine, glyphosate, and quinclorac in bullfrog tadpoles exposed to concentrations below legal limits. *Environ Sci Pollut Res*, vol. 23, p. 23:1610–1620, 2016.

- Davis. A. K., Keel. M. K., Ferreira. A., Maerz. J. C. Effects of chytridiomycosis on circulating white blood cell distributions of bullfrog larvae (*Rana catesbeiana*), *Comp Clin Pathol* v.19, p. 49-55, 2010.
- Davies, T. Popular Interest In Vertebrates Does Not Reflect Extinction Risk and Is Associated with Bias in Conservation Investment. *PLoS One*, v. 13, n.9, p. 20-36, 2018.
- Ferreira, L. M.; Hochman, B.; Barbosa, M. V. J. Modelos experimentais em pesquisa. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 20, n. Supl.2, p. 28–34, 2005.
- Fernandes. I. F., Utsunomiya. H. S. M., Valverde. B. S. L., Ferraz. J. V. C., Fujiwara. G. H., Gutierrez. D. M., Oliveira. C., Belussi L.F., Fernandes. M. N., Carvalho. C. S. Ecotoxicological evaluation of water from the Sorocaba River using an integrated analysis of biochemical and morphological biomarkers in bullfrog tadpoles, *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802). *Chemosphere*, v. 275. 2021.
- Ferreira, C. M. Effects of Copper Oxychloride in *Rana catesbeiana* Tadpoles Toxicological and Biocumulative Aspects. *Bulletin of Environmental Contaminant and Toxicology*, v. 73, p. 465-470, 2004.
- Figueiredo. A. C., Titon. S. C. M., Jr. B. T., Vasconcelos- Teixeira. R., Barsotti. A. M. G., Gomes. F.R. Systemic hormonal and immune regulation induced by intraperitoneal LPS injection in bullfrogs (*Lithobates catesbeianus*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, v.253, p. 110872, 2021.
- Fleming, P. A; Bateman, P. W. The Good, the Bad. And the Ugly: Which Australian Terrestrial Mammal Species Attract Most Research, *Mammal Review*, v. 46, n. 4, p. 241-254, 2016.
- Flynn. R.W., Chislock. M.F., Gannon. M.E., Bauer. S.J., Tornabene. B.J., Hoverman. J.T., Sepúlveda. M.S. Acute and chronic effects of perfluoroalkyl substance mixtures on larval American bullfrogs (*Rana catesbeiana*). *Chemosphere*, v. 236, p. 124350, 2019.
- Fordaham.C. L., Tessari. J. F., Ramsdell .H. S., Keefe. T. J. Effects of Malathion on Survival, Growth, development, and equilibrium posture of Bullfrog Tadpoles (*Rana catesbeiana*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 20, n. 1, p. 179-184, 2001.
- França. F.M., Paiva. T. C. B., Marcantonio. A.S., Texeira. P.C., Ferreira. C. M. Acute toxicity and Ecotoxicological risk assessment of rice pesticides to *Lithobates catesbeianus* tadpoles. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, v. 50, p. 406–410, 2015
- Freitas. S.J.; Giroto.L. Goulart.G.V.B; Alho.G.O.L; Gebara.C.R; Montagner. C.C.; Schiesarid. L.; Espíndola.G.L.E; Effects of 2,4-D-based herbicide (DMA® 806) on sensitivity, respiration rates, energy reserves and behavior of tadpoles. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol, 182, 2019.

Frost, D.R.2019. Amphibian Species of the world. Versão 6.0. Acesso em Janeiro 2021.

Fuller. T.E., Pope. K.L., Ashton. D. T., Hartwell H., Jr. W. Linking the Distribution of an Invasive Amphibian (*Rana catesbeiana*) to Habitat Conditions in a Managed River System in Northern California. Restoration Ecology, v.19.p, 204-2013, 2011.

Garrido, R.G. & Rodrigues, F.S. 2005. Os rumos da Ciência brasileira sob a ótica dos índices cienciométricos. Revista do Biomédico, v. 66, n. 1. Disponível em: <www.crbm1.gov.br/bio66/artigocien_66.asp>.

Gervasi, S. S. et al. Experimental evidence for American bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) susceptibility to chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*), EcoHealth, v. 10 n. 2, p. 166-171, Jun .2013.

Giovanelli, J. G.; Haddad, C. F. B.; Alexandrino, J. Predicting the potencial distribution of the alien invasive American bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) in Brazil. Biol Invasions, v. 10, p. 585-590, 2008.

Grott. S. C., Bitschinski. D., Israel. N. G., Abel. G., Silva. S. P., Alves. T. C., Lima. D., Bairy. A. C. D., Mattos. J.J., Silva. L. B., Albuquerque. C. A.C., Almeida. E. A. Influence of temperature on biomarker responses and histology of the liver of American bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*, Shaw, 1802) exposed to the herbicide Tebuthiuron. Science of the Total Environment, v.771, p. 144971, 2021.

Guevara-Molina. E.S., Gomes. F.R., Camacho. A. Effects of dehydration on thermoregulatory behavior and thermal tolerance limits of *Rana catesbeiana* (Shaw, 1802). Journal of Thermal Biology, v. 93.p, 102721, 2020.

Hammond. A. S., Carew And. A.C., Helbing. C. C. Evaluation of the effects of titanium dioxide nanoparticles on cultured *Rana catesbeiana* tailfin tissue. Frontiers in genetic, v.4, p.252, 2013.

Hitchings, S. P; Beebee, T. J. C. Loss of Genetic Diversity and Fitness in Common Toad (*Bufo bufo*). Population Isolated by Inimical Habitat. Journal of Evolutionary Biology, v. 11, n.3, p. 269-283, 1998.

Hopkins, W. A. Amphibians as models for studying environmental change. ILAR journal, v. 48, n. 3, p. 270–277, 2007.

Ishihara. A.; Yamauchi.K. Analysis of global and gene-specific acetylation of histones in the liver of American bullfrog (*Rana catesbeiana*) tadpoles acclimated to low temperature. Journal of Thermal Biology, n. 184, 2019

Jancowski. K., Orchard1. S. A. Stomach contents from invasive American bullfrogs *Rana catesbeiana* (= *Lithobates catesbeianus*) on southern Vancouver Island, British Columbia, Canada. NeoBiota, v.16, p.17-37, 2013.

Jaric. I, Correia R.A, Roberts D.L, Gessner. J, Meinard. Y, Couechamp. F. On the overlap between scientific and societal taxonomic attentions – Insights for conservation. *Science of total environment*, v. 648, p. 772, 778, 2019.

Johvic.I. Gama.M., Banha. F., Tricarico. E., Anastacio. P.M. A potential threat to amphibians in the European Natura 2000 network: Forecasting the distribution of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus*. *Biological Conservation*, v.245, p.108-551, 2020.

Kleeck, M. J.; Holland, B. S. Gut Check: Predatory Ecology of the Invasive Wrinkled Frog (*Glandirana rugosa*) In Hawaii. *Pacific Science*, v. 72, n. 2, p. 199-209, 2018.

Knoop. R., Ferreira. C. M., Takahashi. N. S., França. F. M., Antonucci. A. M., Teixeira. P. C., Sugohara. A., Dias. D. C., Tachibana. L., Hipolito. C. Influência da incorporação de vitamina c à dieta no desempenho produtivo de rãs-touro *lithobates catesbeianus* pós-metamorfoseadas. *Bol. Inst. Pesca*, v. 37, p. 383 – 391, 2011.

Lee. K. W., Chang. Z., Oh. B. S., Lu. M., Park. J. S. Estrogenic Response in Male Bullfrog (*Rana catesbeiana*) Hepatocytes after Single or Combined Exposure to Cadmium (Cd) and 17beta-Estradiol (E2). *Bull Environ Contam Toxicol*, v.85, p. 452–456, 2010.

Lin. J., Zhang. C., Lu. K., Song. K., Wang. L. Effect of guanidinoacetic acid and betaine supplementation in soybean meal-based diets on growth performance, muscle energy metabolism and methionine utilization in the bullfrog *Lithobates catesbeianus*. *Aquaculture*, v.533, 2021

Ling. G., Gao. J., Zhang. S., Xie. Z., Wei. L., Yu. H., Wang. Y. Cathelicidins from the Bullfrog *Rana catesbeiana* Provides Novel Template for Peptide Antibiotic Design. *PLoS One*, v.9, 2014.

Liu, X.; Zhang, L.; Hong, S. Global Biodiversity Research During A Bibliometric Analysis. *Biodiversity and Conservation*, v.20, n. 4, p. 807-826, 2011.

Lombard, J. V. et al. Acute Toxicity of the Fungicide Copper Oxychloride to tadpoles of Bullfrog *Rana catesbeiana*. *Bulletin of Environmental Contaminant and Toxicology*, vol, 69, p. 415-420, 2002.

Luehr. T. C., Koide. E. M., Wang. X., Han. J., Borchers. C. H. Metabolomic insights into the effects of thyroid hormone on *Rana* [*Lithobates*] *catesbeiana* metamorphosis using whole-body Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Mass Spectrometry Imaging (MALDI-MSI). *General and Comparative Endocrinology*, v. 265, p. 237–245, 2018.

Mercante. C.T.J., Santos.A.M.V. Moraes. M.A.B. Pereira.J.S. Lombardi. J.V. Bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) farming system: water quality and environmental changes. *Acta Limnologica Brasiliensia*, v. 26, n. 1, p. 9-17, 2014.

- Mesak.C. Oliveira. B, M.; Ferreira.O.R. Malafaia.G. Mutagenic assessment of *Lithobates catesbeianus* tadpoles exposed to the, 2. 4-D herbicide in a simulated realistic scenario. Environmental Science and Pollution Research, v. 25, p. 15235–15244, 2018.
- Mochizuki. K., Goda. T., Yamauchi. T. Gene expression profile in the liver of *Rana catesbeiana* tadpoles exposed to low temperature in the presence of thyroid hormone. Biochemical and Biophysical Research Communications, v.420, p.845-850, 2012.
- Montalvão. F. M.; & Malafaia. G.; Effects of abamectin on bullfrog tadpoles: insights on Cytotoxicity, V.24, p. 23411–23416, 2017.
- Montalvão. M.F., Souza. J.M., Guimarães. A.T.B., Menezes. A. S. L.R., Castro. A. L. S., Rodrigues. A.S.L., Malafaia. G. The genotoxicity and cytotoxicity of tannery effluent in bullfrog *Lithobates catesbeianus*. Chemosphere, v.183, p. 491-502, 2017.
- Monteiro.A. N.A.J.; Cunha. A.L.; Costa. P .H. M.; Reisb. S.H.; Aguiarc. S.C.A.; Bahia. O.L.R.V.; Burbano.R.M.R. Rochad.M.A.C. Mutagenic and histopathological effects of hexavalent chromium in tadpoles of *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) (Anura, Ranidae). Ecotoxicology and Environmental Safety, v.163 P.400-407, 2018
- Moreira. A.R.; Freitas. S. J; Pinto. J.S.T.; Schiesari. L.; Daam. A.M.; Montagner.C.C; Goulart. V. B; Espindola. L. E. G; Mortality, Spatial Avoidance and Swimming Behavior of Bullfrog Tadpoles (*Lithobates catesbeianus*) Exposed to the Herbicide Diuron .Water Air Soil Pollut, v. 230: p.125, 2019.
- Moyes, C. D.; Schulte, P. M. Princípios de fisiologia animal. Artmed editora Fisiologia Animal, 2ª ed. 792, Brochura, 2010.
- Nabout. J. C., Carvalhalho. P, Prado. M.U., Borges. P. P., Machado. K.B., Haddad. K. B, Michelan. T. S., Cunha. H. F., Soares. T. N., Trends and biases in global climate change literature. Natureza Conservação, v. 10 p. 45–51, 2012.
- Nabout, J. C., Parreira, M. R., Teresa, F. B., Carneiro, F. M., Cunha. H.F., Ondei. L. S., Caramori. S. S., Soares T. N. Publish (in a group) or perish (alone): the trend from single- to multi-authorship in biological papers. Scientometrics, v. 102, p.357–364, 2014.
- Nogueira. A. L. F; Abdalla. C.F; Costa.J.M; Salla. F. R; Efeito do Cádmio no fígado de girinos de rã-touro. Rev. Elet. Cient, v. 3, n. 2, p. 447-471, 2017.
- Oliveira.R.C; Garcia. D. T.; Franco. B. L; Salla.F.R; Souza.S.F.B; Melo. S.F.N.; Irazusta. P.S.; Costa.J.M. Zacarin.S.M.C.E. Fraceto.F.L. Pyrethrum extract encapsulated in nanoparticles: Toxicity studies based on genotoxic and hematological effects in bullfrog tadpoles. Environmental Pollution, v.253, p 1009-1020, 2019.

Oliveira. R.C; Fraceto. F.L; Rizzi.M.G; Salla.F.R; Abdalla.C.F; Monica Jones Costa; Zacarin.S.M.E; Hepatic effects of the clomazone herbicide in both its free form and associated with chitosan-alginate nanoparticles in bullfrog tadpoles. *Chemosphere*, v. 149, p.304-313, 2016.

Olson, J. M.; Marsh, R. L. Activation patterns and length changes in hindlimb muscles of the bullfrog *Rana catesbeiana* during jumping. *The Journal of Experimental Biology*, Oxford, v. 201, n. Pt 19, p. 2763–2777, 1998.

O'rourke, D. P. Amphibians used in research and teaching. *ILAR journal*, Oxford, v. 48, n. 3, p. 183–187, 2007.

Orr, R. T. *Biologia dos Vertebrados*. São Paulo: Roca, 508 p.2000.

Ossana. N. A., Castané. P. M., Pellota. G. L. Mudry. M. D., Salibián. A. Toxicity of Waterborne Copper in Premetamorphic Tadpoles of *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802). *Bull Environ Contam Toxicol*, v.84, p. 712-715, 2010.

Ossana, N. A; Castane, P. M.; Salibian, A. Use of *Lithobates catesbeianus* Tadpoles in a Multiple Biomarker Approach for the Assessment of Water Quality of the Reconquista River (Argentina). *Archives of environmental contamination and toxicology*, v. 65, n. 3, p. 486-497, 2013.

Ossana, A. N.; Salibián. A.; Micronucleus test for monitoring the genotoxic potential of the surface water of Luján River (Argentina) using erythrocytes of *Lithobates catesbeianus* tadpoles. *Ecotoxicol. Environ. Contam*, v. 8, n. 1, P. 67-74, 2013.

Pereira. M. P. C., Daam. M. A., Resende. J. C., Vasconcelos. A. M., Espinola. E. L.G., Botta. C. M.R. Toxicity of Vertimec 18 EC (active ingredient abamectin) to the neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. *Chemosphere*, v.139, p. 558-564, 2015.

Pinto-Vidal. F.A., Carvalho. C. S., Abdalla. F. C., Ceschi-Bertoli. L., Utsunomiya. H. S. M., Silva. R. H., Salla. R. F., Jones-Costa, M. Metabolic, immunologic, and histopathologic responses on premetamorphic American bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) following exposure to lithium and selenium. *Environmental Pollution*, v. 270, p. 116086, 2021.

Queiroz.J. P. F., Lima. N. C. B., Rocha. B. A. M., The rise and fall of globins in the amphibia. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics*, v. 37, p. 100759, 2021.

Rios. F. M., Wilcoxon. T. E., Zimmerman. L. M. Effects of imidacloprid on *Rana catesbeiana* immune and nervous system. *Chemosphere*, v. 188, p.465-469, 2017.

Rissoli, Z. R. Abdalla, C.F.; Costa,J.M; Rantin,T.F; Mckenzie,J.D; Kalinin.L.A; Effects of glyphosate and the glyphosate based herbicides Roundup Original® and Roundup Transorb® on respiratory morphophysiology of bullfrog tadpoles, v.156, p.37-44, 2016.

Rourke, D. P. Amphibians Used in Research and Teaching. ILAR Journal, v. 48, n. 3, p. 183-187, 2007.

Rourke, D.P. Amphibians Used in Research and Teaching. ILAR Journal, v.48, n.3,p. 183-187,2007.

Scaia.F.M.; Lara Gregorio.S.L.; Franco.B.L.; Domingues.S.M.; Oliveira.C.; Gonadal, body color, and genotoxic alterations in *Lithobates catesbeianus* tadpoles exposed to nonylphenol. Environmental Science and Pollution Research, v.26, p. 22209–22219, 2019

Shine, R. 2010. The ecological impact of invasive cane toads (*Bufo marinus*) in Australia. The Quarterly Review of Biology, v. 95, n. 3, p.253-291.

Simões, M. G.; Shaw, I. S. Controle e modelagem fuzzy. 2ª ed. Blucher. São Paulo, 186 p.2007.

Su, C.R, Meyers, M .C.; Warner, A. E.; Garcia, A. J.; Refsnider, M. J.; Lad, A.; Breidenbach, D. J.; Modyanov , N.; Malhotra, D.; Kennedy, J. D. S. H.; Harmful Algal Bloom Toxicity in *Lithobates catesbeiana* Tadpoles. Toxins, v.12, p.378, 2020

Spinak, E. Indicadores Cienciométricos. Ciências da Informação, v. 27, n. 2, 1998.

Spinak, E. Indicadores cienciométricos, Brasília. Ciência da Informação, v. 27, n. 2, p. 141-148, maio/ago 1998.

Stork, H.; Astrin, J.J. Trends in Biodiversity – A Bibliometric Assessment. Open Journal of Ecology. v. 4, n. 07, p. 354, 2014.

Thibodeau. J., Filion. S., Spear. P., Paquin. J., Boily. M. Oxidation of retinoic acids in hepatic microsomes of wild bullfrogs *Lithobates catesbeianus* environmentally-exposed to a gradient of agricultural contamination. Ecotoxicology, v. 21, p. 1358-1370, 2012.

Titon. M.C.S; Junior. T.B; Assis.R.V; Teixeira.V.R; Neto. G.G.P; Lima.S.A; Ferreira.F.L; Fernandes.A.P; Gomes.R.F; Markus.G; Hormonal daily variation covaries with immunity in captive male bullfrogs (*Lithobates catesbeianus*). General and Comparative Endocrinology, v.303,2020.

Vasconcelos. M.A.; Daam. A. M.; Resende. C.J.; Pereira.C.M. Espíndolag.L.E. Survival and development of bullfrog tadpoles in microcosms treated with abamectin. Ecotoxicology, v.26. p. 729–737.2017.

Veldhoen. N., Skirrow. R. C., Brown. L. L.Y., Aggelen. G. V., Helbing. C. C. Effects of Acute Exposure to the Non-steroidal Anti-inflammatory Drug Ibuprofen on the Developing North American Bullfrog (*Rana catesbeiana*) Tadpole. Environmental Science & Technology, v.48, p. 10439–10447, 2014.

- Veronese. A. C. S., Salla. R.V., Baroni. V.D., Barcarolli. I.F., Bianchini. A., Martinez. C.B.R., Gomes. A.R.C. Genetic and biochemical effects induced by iron ore, Fe and Mn exposure in tadpoles of the bullfrog *Lithobates catesbeianus*. *Aquatic Toxicol*, v.174, p.101-108,2016.
- Vidal.P.A.F; Abdalla. C.F.; Carvalho. S.C.; Utsunomiya M.S.H.; Oliveira.T.A.L.; Salla.F.R.; Costa.J.M.; Metamorphic acceleration following the exposure to lithium and selenium on American bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.207, 2021.
- Viriato. C., França. F.M., Santos. D. S., Marcantonio. A.C., Pedroso. C. B., Ferreira. C.M. Evaluation of the potential teratogenic and toxic effect of the herbicide 2, 4-D (DMA® 806) in bullfrog embryos and tadpoles (*Lithobates catesbeianus*). *Chemosphere*, v. 266, p. 129018, 2021.
- Zhang, Z. Q. *Animal Biodiversity: An Outline of Higher-Level Classification and Survey of Taxonomic Richness*. Magnólia Press, 2011.
- Yamamoto, O.H., et al. "A produção científica. Na psicologia: uma análise dos periódicos brasileiros no período 1990-1997", *Psicologia Reflexão e Crítica*, v. 12, n. 2, p. 549-565, 1999.
- Yao. G., Jing. X., Liu. C., Wang. P., Liu. X., Hou. Y., Zhou. Z., Liu. D. Enantioselective degradation of alpha-cypermethrin and detection of its metabolites in bullfrog (*Rana catesbeiana*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v., 141.p, 93-97, 2017.
- Wang. J.K., Çimenoglu. C., Cheam. N. M. J., Hu. X., Tay. C. Y. Sustainable aquaculture side-streams derived hybrid biocomposite for bone tissue engineering. *Materials Science & Engineering C*, v.126, p. 112104, 2021.
- Wei Low. B. Zeng. Y., Tan.H. H., Yeo. D.C.J. Predictor complexity and feature selection affect Maxent model transferability: Evidence from global freshwater invasive species. *Biodiversity methods*, v.154, 2020.
- Wilkins. A. L. L., Valgas. A. A. N., Oliveira. G. T., Effects of ecologically relevant concentrations of Boral® 500 SC, Glifosato® Biocarb, and a blend of both herbicides on markers of metabolism, stress, and nutritional condition factors in bullfrog tadpoles. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 26, p. 23242–23256, 2019.
- Zhang. S., Teraoka .H. Kaiya. H., Kitazawa. T. Motilin- and ghrelin-induced contractions in isolated gastrointestinal strips from three species of frogs. *General and Comparative. Endocrinology*, v.300, p. 113649, 2021.

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

Genotoxic and melanic alterations in *Lithobates catesbeianus* (Anura) tadpoles exposed to Fipronil insecticide

Arleto T. Santos¹, Bruno S.L. Valverde¹, Classius De Oliveira², Lilian Franco-Belussi³

¹Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, campus São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.

²Departamento de Biologia – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho campus São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.

³Laboratório de Patologia Experimental – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil.

DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11948-w>

Corresponding Author:

Classius de Oliveira

classius.oliveira@unesp.br

Departamento de Biologia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

CEP: 15054-000, Rua Cristóvão Colombo, 2265

São José do Rio Preto – SP, Brazil

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

DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11948-w>. Disponível em:

<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11356-020-11948-w>. Acesso em: 1 set. 2021.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the genotoxic and morphological systemic effects of both an acute and a chronic exposure of bullfrog tadpoles to Fipronil. *Lithobates catesbeianus* tadpoles had morphological biomarkers (skin, liver and blood) analyzed at Gosner stages 36-38, when exposed to four different concentrations of Regent[®] 800 WG (80% Fipronil): 0.00 (control), 0.04, 0.08, 0.4 mg/L; and four experimental times: 4, 8, 12, and 16 days. Body darkness responded directly to the treatment and exposure time. There was a treatment-dependent decrease in darkness of heads and tails. In relation to the biometric analysis, Fipronil induced a decrease in the individual weight and liver mass at the end of the experiments, whereas the hepatosomatic index did not vary according to the treatment. For the exposed animals and for the control group, the area of hepatic melanin increased as exposure time increased. Fipronil has genotoxic effects on *L. catesbeianus* tadpoles even after short exposure times (e.g., 4 and 8 days), and the main nuclear abnormality is in the anucleate cells. A relevant correlation was observed between genotoxic biomarkers and cutaneous and internal melanin. The frequency of nuclear abnormalities is inversely correlated both with the hepatic melanin area and with the cutaneous melanin of animals. Fipronil has distinct systemic effects on tadpoles based on its concentration, as well as on its exposure time. Such alterations (pigmentation level and rate of erythrocyte abnormality) result in morphological and physiological effects, which may compromise the behavior and survival of the anurans.

Keywords: Biomarkers, Body Darkness, Genotoxicity, Melanin, Melanomacrophages, Nuclear Abnormalities

Introduction

In the last ten years, Brazil has become the biggest toxic agrochemicals market in the world, corresponding to a 190% increase in the national market (Lopes 2018; Anvisa 2019; MMA, 2019). The increase in the use of such chemical substances results in water resource contamination (Thompson et al. 2007; Ribeiro et al. 2013) and may affect natural ecosystems (Konstantinou et al. 2006; Hildebrant et al. 2008; Foit et al. 2010) along with the non-target species which live in these habitats (Mann et al. 2009).

Fipronil ($C_{12}H_4Cl_2F_6N_4OS$) is a new generation insecticide known worldwide (Roberts and Reigart 2013); besides being used in agriculture, it is a veterinary medication for the control of pests, parasites, and larvae (Zhao and Salgado 2010; Amaral 2012). Fipronil is responsible for causing endocrine disruption (Silva et al. 2011), thus it is classified as carcinogenic for humans (Fent 2014). It also causes genotoxicity (Tomiazzi et al. 2018), hepatotoxicity (Ferreira et al. 2012), reproductive toxicity (Josende et al. 2015), behavioral, immunological, and mortality alterations (Pochini and Hoverman 2017). Amongst the products in which Fipronil is the active ingredient, one of which, Regent 800 WG, is classed as a highly toxic – red label (Anvisa 2019). It acts by means of contact or ingestion and is, delivered by land or air (Agrofit 2020). Thus, it may be transported and found in aquatic environments, where it, causes great damage to the local biota, (Albuquerque et al. 2016; Bernabò et al. 2016). Simon-Delso et al. (2015) summarized some reasons for the success of systemic insecticides (Fipronil and neonicotinoids) based on the similarities of their properties, e.g., toxicity and physicochemical profiles and also reviewed their trends, uses, mode of action and its metabolites, in addition to documenting their share of the global market in the last 25 years. In amphibians, Fipronil may spread once or twice faster than in mammals (Wagner et al. 2016) and its effects in anurans are related to enzymatic alterations (Reynaud et al. 2012; Gripp et al. 2017) and metamorphosis time (Boscolo et al. 2017).

Experiments regarding the concentrations of Fipronil in aquatic environments are lacking, mainly in the ponds that serve as a transient environment for amphibians that live close to the cultivation areas, especially during application periods. These concentrations in a realistic condition may be higher than those that have been, described for freshwater rivers. However, according to de Toffoli et al. (2015), in the

soil close to agricultural areas of Northwest Brazil, environmentally relevant concentrations of Fipronil, Fipronil sulfone and Fipronil sulfide are present, ranging from 35 to 180 µg/kg, which is very close to the concentration in the water used in our experimental protocols.

The acute toxicity for pesticides on aquatic organisms can be, measured by establishing the LC50 or the concentration in water (e.g. mg/L) which is toxic to the test organisms. According to a review of the effects of Fipronil on vertebrate wildlife (Gibbons et al. 2015), there is a marked variation among vertebrate's taxa and different systemic insecticides in acute toxicity. In that study, neonicotinoid and Fipronil insecticides could exert their impact on vertebrates either, directly, through their overt toxicity, or indirectly, for example by reducing their food supply. For amphibians no Fipronil toxicity experiments have been reported, however for some fish the toxicity of Fipronil varies according to species, with lethal concentrations (LC50) ranging from: 0.042 mg/L in *Oreochromis niloticus* (African tilapia) to 0.43 mg/L in *Cyprinus carpio* (European carp; Qureshi et al. 2016). The LC50 in *Rhamdia quelen* (silver catfish) is 0.81 mg/L at 48 h of study (Fredianelli et al. 2019).

Anurans are biomarkers of the environment quality, since they have a quick response to environmental stress; therefore, they are vulnerable to terrestrial and aquatic contamination (Brodeur and Candiotti 2017). Their organs and internal membranes contain melanin (Franco-Belussi et al. 2016) – an endogenously extracted polymer (Céssarini 1996) which absorbs and neutralizes free radicals and other potentially toxic agents derived from the cellular catabolism (Zuasti et al. 1989; Agius and Roberts 2003). In the skin, melanin is the first barrier against UV radiation (Montagna and Carlisle 1991), and enables the adaptive interaction of animals and the environment (e.g., camouflage, cryptic coloration) (Aspengren et al. 2009; Skold et al. 2016). Researchers have found evidence of internal melanin alterations and skin coloration due to environmental contaminants (Franco-Belussi et al. 2018; Pérez-Iglesias et al. 2019; Scaia et al. 2019); these are co-related to genotoxic effects (Franco-Belussi et al. 2018), which show that aquatic contaminants may cause damage to the adaptive capacity of animals to their environment.

Melanomacrophages (MMs) are cells, which are present in the haematopoietic organs of fish and anurans. Such cells, with a phagocytic activity similar to that of macrophages (Agius 1980), contain melanin and substances of the cellular catabolism, such as haemosiderin and lipofuscin (Agius and Roberts 2003). MMs are

morphological biomarkers of effects and are used as tools to evaluate the effects of contaminants e.g., glyphosate (Pérez-Iglesias et al. 2016; Bach et al. 2018; Pérez-Iglesias et al. 2019), benzo[α]pyrene (Fanali et al. 2017; 2018), flutamide (Gregorio et al. 2016). Pyrethroid, (Oliveira et al. 2016), carbaryl (Çakici 2015), as well as sexual steroid hormones (Zieri et al. 2015). Hence, these cells are important in order to detect tissue alterations as a result, of possible xenobiotics present in the environment. However, there are few studies that, evaluate the role of these cells in tadpoles and there are no reports on the possible effects that Fipronil may have on them.

Therefore, the objective of this study was to evaluate the systemic effects of both acute and chronic exposure of bullfrog tadpoles to Fipronil. In order to do so, morphological biomarkers such as morphological nuclear alterations in erythrocytes were, examined, in addition to histological analyses of the liver and animal coloration. Moreover, a comparative approach was used regarding genotoxic responses, by assaying the melanin present both in, the liver and, the skin of the animal, in order to test the hypothesis that it plays a role in protecting tissues (De Oliveira et al. 2017).

Materials and Methods

Animal Sampling and Experimental Design.

In total, 128 *Lithobates catesbeianus* (Shaw 1802) tadpoles were studied, at Gosner stages 36-38; they were obtained from UNESP's Centro de Aquicultura (CAUNESP) in Jaboticabal, São Paulo, Brazil. Animals were kept in aquaria containing 1 L water/animal, with constant aeration, controlled temperature ($27.0 \pm 1^\circ\text{C}$), and natural photoperiod (~ 12h light: 12h dark). Animals were fed with a protein meal every day for 7 days before experiments began.

After that acclimatation period, animals were randomly rearranged in 32 aquaria with 4 specimens in each tank; the proposed population density was 1 animal per liter of water. The specimens were exposed to four different concentrations of Regent® 800 WG (80% Fipronil): 0.00 (control), 0.04, 0.08, 0.4 mg/L; and four periods of exposure: 4, 8, 12, and 16 days. These concentrations are in accordance with Toffoli et al. (2015) agricultural soil of Northwest of Brazil (i.e. 35 to 180 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Each group was analyzed in duplicate, with a total of $N=8/\text{concentration}/\text{time}$. The water was totally renewed every 48 hours with the replacement of compound concentrations in the treated groups. These animals were, also fed every 48 hours.

After the experimental periods, animals were photographed and then euthanized with benzocaine (10 g/L). Their blood was sampled through cardiac puncture with a heparinized syringe and needles for the obtainment of blood extensions. Subsequently, animals were desiccated and had their livers removed. All manipulation and care of animals followed the NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals; all procedures were previously approved by the Ethical Committee and Animal, Experimentation from IBILCE/UNESP (CEUA 199/2018).

Biometric Analyses

Following the 7-day acclimatization period, an exploratory analysis of the biomass that composed each replicate was conducted immediately before the beginning of the experiments. The biomass behavior was evaluated for each subgroup (control and treated), both before and after the experiments, aiming to observe possible sub-lethal alterations of anatomic or developmental character. Animals were weighed on an analytical balance with, 0.001 g precision and measured with a pachymeter (0.01 mm) the livers were also weighed. Based on this data, it was possible to calculate the hepatosomatic index ($HSI = \text{liver weight (g)}/\text{animal weight (g)} \times 100$).

Body Darkness Analyses

In order to quantify body darkness, we used Photoshop® to standardize the area measured. Landmarks were used to standardize measurements in each animal (Franco-Belussi et al. 2018). All image analyses were performed in accordance with Svensson et al. (2005). The digital images were converted to CIE $L^*a^*b^*$, which consisted of three parameters: L^* (lightness) represents the relative lightness ranging from total black to total white; a^* (redness) represents the balance between red and green; and b^* (yellowness) represents the balance between yellow and blue. Afterwards, the following formula was used: $100 - (100 \times L^*/255)$, considering the relative area of L^* (Svensson et al. 2005; Franco-Belussi et al. 2018).

Hepatic Melanin

The liver was, fixed in Methacarn (60% methanol, 30% chloroform and 10% acetic acid) for 3 hours, then dehydrated and immersed in historesin (Leica). Cuts of 2 μm were stained in hematoxylin-eosin and photographed in a microscope coupled to the image capturing system (Leica DM4B). The melanin area present in the liver,

measured through the ImagePro-plus 6.0 software by using a differential staining technique (Santos et al., 2014). In order to do so, 25 photomicrographs were used for each animal.

Nuclear Abnormalities in Erythrocytes

Blood smears were stained with Giemsa 7.5% for 15 min and subsequently washed in running water. Following this, 1000 erythrocytes were analyzed for each animal through a light microscope (Leica DM4000). The nuclear abnormalities were, evaluated according to Franco-Belussi et al. (2016).

Statistical Analysis

In order to model the ratio of nuclear abnormalities, a Generalized Linear Model (GLM) was built with a binomial distribution and a *log* link function, including treatment and time of exposure; each one containing a categorical predictor with 4 levels, in addition to their interactions. We tested our model assumptions by using diagnostic plots through the R (Team Core, 2016) package *sjplot* (Lüdecke 2016). Residuals had homogeneity of variance and normal distribution.

In order to model the darkness (response variables), a Generalized Linear Mixed-Effects Models (GLMM) with beta distribution was fitted, including treatment and time as categorical predictor variables with four levels each, along with their interactions (Franco-Belussi et al. 2018). In order to model the area of hepatic melanin, a GLMM was used but, instead, with a gaussian distribution.

Pearson correlation was, used in order to test for a correlation between the ratio of nuclear abnormalities and body darkness. In addition, nuclear abnormalities were tested with hepatic melanin. All analyses were conducted through R v. 3.4.0 (R Core Team 2017).

Results

Biometrics

Table 1 contains the assayed biometric variables. No anatomical alteration was verified qualitatively. The 16-day group had an increase in biomass, compared to their biomass at the beginning of the experiment ($P < 0.001$; Table S1).

Variáveis biométricas

Tempo (dias)	Tratamento (mg/L)	Peso (g)	SD	Comprimento (cm)	SD	Peso líquido (g)	SD	HSI
4	0.00	1.55	0.26	5.74	0.39	0.050	0.01	3.34
	0.04	1.05*	0.21	5.29 ^a	0.60	0.028 ^{*,a}	0.006	2.68 ^{a,l}
	0.08	1.18	0.49	5.32	0.94	0.033*	0.02	2.88
	0.40	1.29 ^{a,c}	0.23	5.56 ^a	0.21	0.050	0.01	3.87 ^a
8	0.00	1.43	0.25	5.70	0.40	0.046	0.01	3.25
	0.04	1.31	0.27	5.44 ^a	0.40	0.045 ^b	0.006	3.54 ^a
	0.08	1.50	0.22	5.68	0.35	0.048	0.006	3.25
	0.40	1.66 ^a	0.38	5.95 ^a	0.48	0.049	0.01	2.95 ^b
12	0.00	1.68	0.35	6.04	0.68	0.052	0.02	3.09
	0.04	1.50	0.61	5.90 ^a	0.93	0.04 ^a	0.02	2.49 ^b
	0.08	1.60	0.33	5.88	0.70	0.042	0.01	2.63
	0.40	2.15 ^b	0.22	6.67 ^b	0.46	0.066	0.007	3.09 ^a
16	0.00	1.86	0.44	6.41	0.60	0.051	0.02	2.68
	0.04	1.72	0.52	6.34 ^b	0.79	0.044 ^b	0.01	2.64 ^b
	0.08	1.64	0.27	6.04	0.30	0.044	0.007	2.79
	0.40	1.55 ^c	0.24	6.02 ^a	0.21	0.040	0.006	2.62 ^b

Table 1: Biometric Variables. Different letters indicate differences between the same treatments at different exposure times. (*) Represents differences between control and treatment at the same exposure time. (#) Represents differences between the initial and final biomass at the same time and treatment. ($p < 0.05$). HSI - Hepatosomatic Index. Mean \pm SE.

Font: Author

By assaying the individual's variables, Fipronil was observed to cause a decrease in the individual weight in 4-days of 0.04 mg/L ($P = 0.03$; Table S2) and liver mass in 4-days of 0.04 mg/L and 0.08 mg/L treatments ($P < 0.05$; Table S3). Although the treatments decreased liver weight, the hepatosomatic index (HSI) did not vary according to the treatment (Table S4). Similarly, total length did not vary among control and treatment groups (Table S5). All biometrics variables result in significant differences in at least one experimental time (Tables 1; S1-S5) showing the effects of time of exposure.

Body Darkness

The color of *L. catesbeianus* tadpoles responds directly to the treatment and exposure time. There was a decrease in the darkness of heads and tails, thus indicating it is both time and treatment dependent (Figure 1).

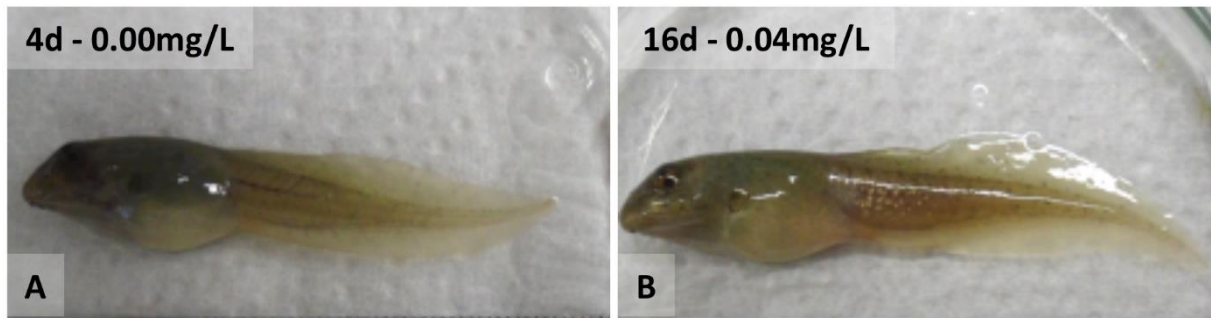


Figure 1: (A) *L. catesbeianus* tadpoles exposed to Fipronil at a concentration of 0.00 (control group) after four days of exposure. (B) *L. catesbeianus* tadpoles exposed to Fipronil at a concentration of 0.04 mg/L after 16 days of exposure.
Font: Author

The head pigmentation at initial times (i.e. 4 and 8 days) decreased at the lowest concentration (0.04 mg/L; Figure 2; Table S6); such response persisted during the other times. The tail darkness decreased in 8-days, only at the 0.08 mg/L concentration, whereas for 12 and 16 days there was a decrease in pigmentation at the lowest concentration (0.04 mg/L; Figures 1, 2; Table S7).

Hepatic Melanin

The area of hepatic melanin increased as exposure time increased in all treatments, including in the control group (Figure 3; Table S8).

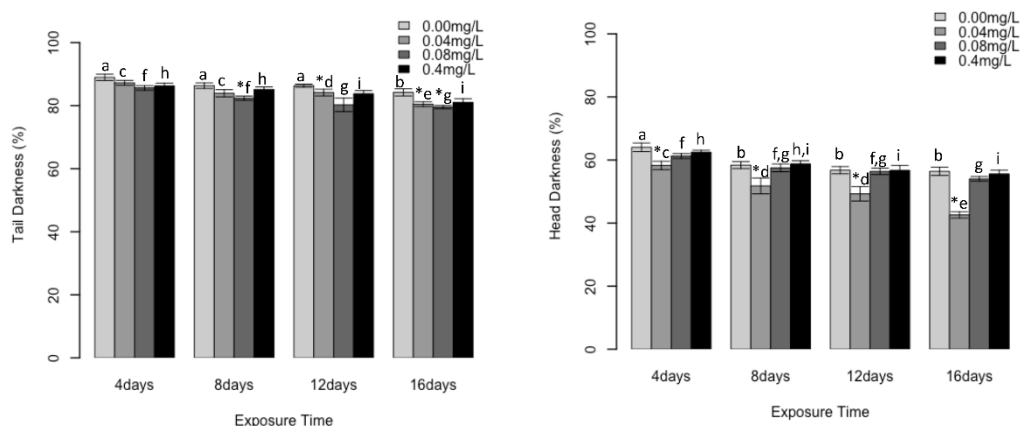


Figure 2: Head and tail darkening percentage. Different letters indicate differences between the same treatments at different exposure times. (*) Represents differences between control and treatment at the same exposure time ($p < 0.05$). Data is, provided as the Mean \pm SE.

Font: Author

For the exposed animals, hepatic melanin decreased at a 0.04 mg/L concentration of Fipronil after 4 days of exposure ($P = 0.0001$; Table S8); however, after 8 days at the same concentration, there was a substantial increase ($P = 0.0009$; Table S8), which indicates an acute response to the treatment. For the other exposure times, only 12 days had a treatment effect, i.e. there was an increase in hepatic pigmentation at 0.08 mg/L concentration, thus suggesting a chronic effect of such concentration ($P < 0.0001$; Figure 4; Table S8).

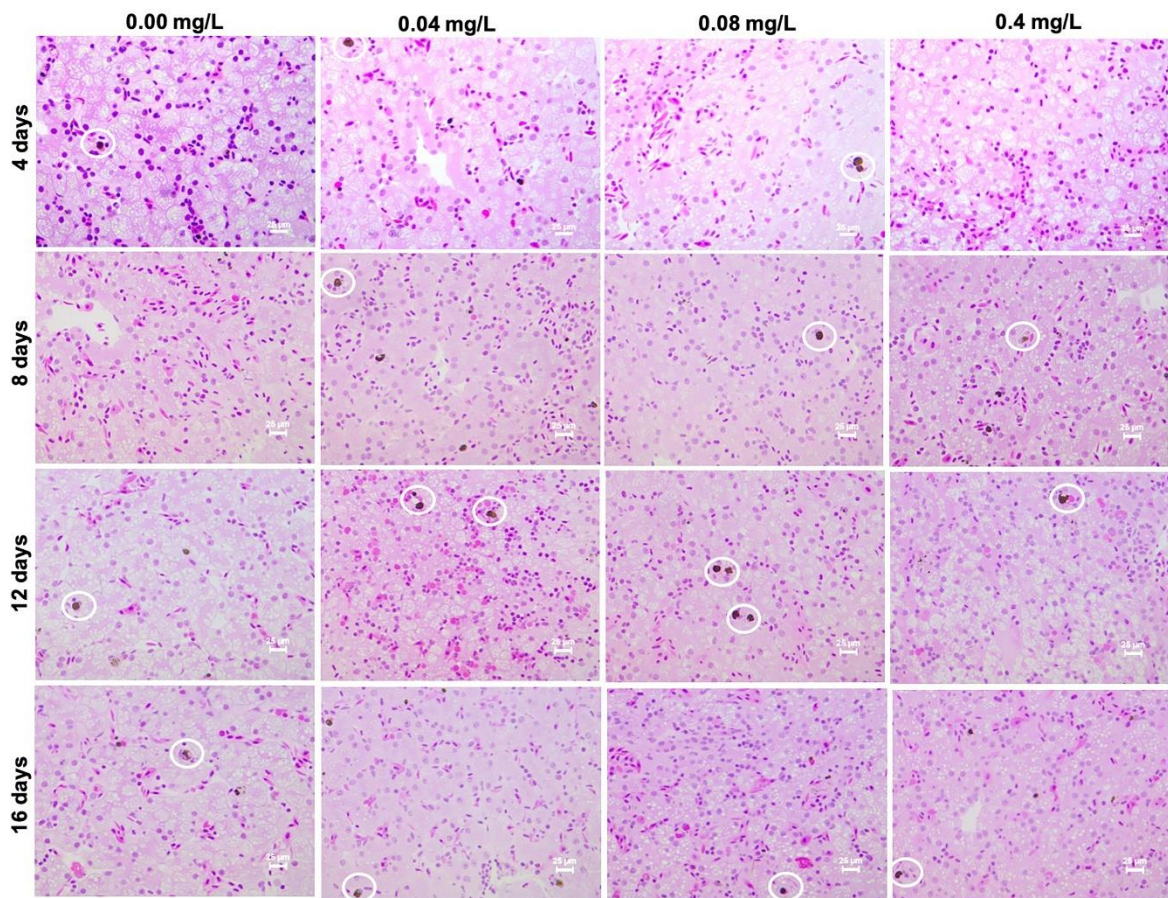


Figure 3. Histology of the hepatic tissue showing hepatic melanin (circles). HE – 25 μm.

Font: Author

By considering the effects of time and treatment together, it is noteworthy that after 16 days of exposure all concentrations led to the same response (Figure 4; Table S8).

Nuclear Abnormalities

Fipronil presents genotoxic effects on *L. catesbeianus* tadpoles in short exposure times (e.g., 4 and 8 days) ($P < 0.05$; Figure 5, 6; Table S9). That may be due

to the facts that in tadpoles the erythrocyte replacement rate tends to be higher at initial developmental stages. The main nuclear abnormality observed was that of anucleate cells (Figure 4).

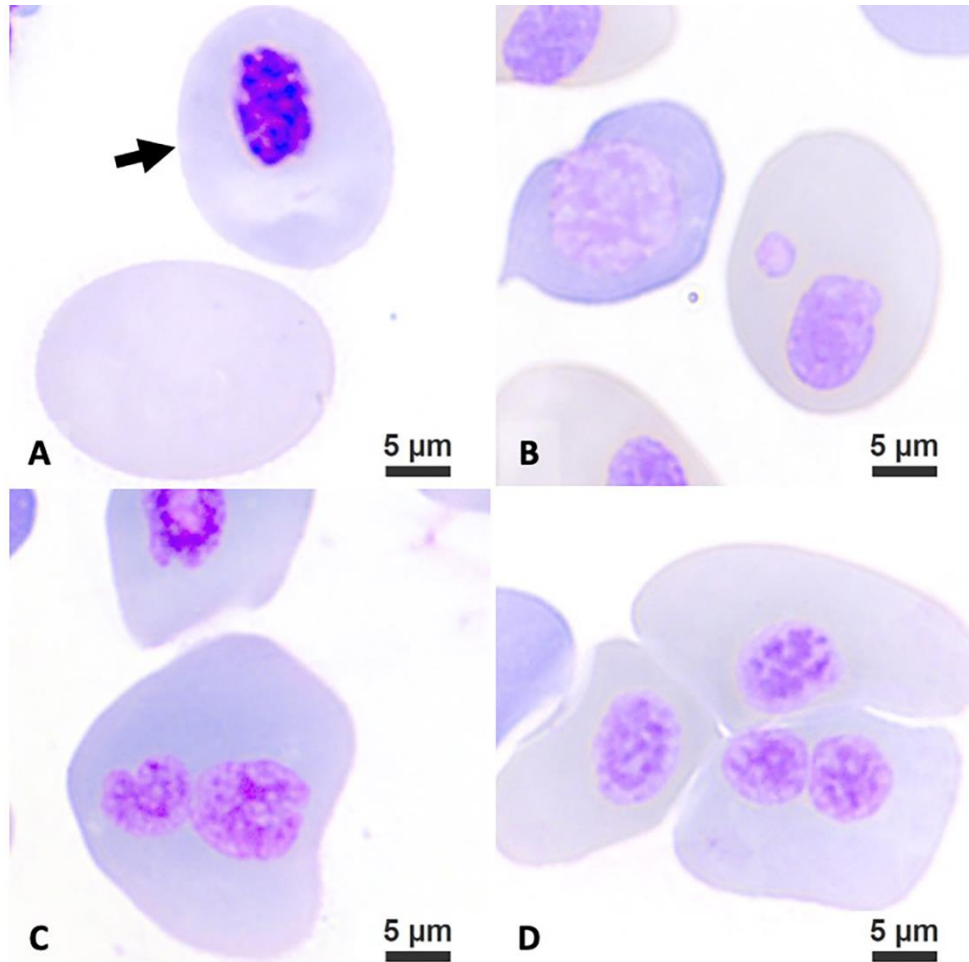


Figure 4: Nuclear Abnormalities. (A) Normal erythrocyte (arrow) and anucleate erythrocyte. (B) Micronucleus. (C) Segmented nucleus. (D) Binucleated erythrocyte. Font: Author

At the 4-day exposure time, it was possible to observe an increase in the nuclear abnormalities in animals exposed to 0.04 and 0.08 mg/L Fipronil ($P < 0.0001$; Table S9); when the time was 8 days, the increase was observed in all the exposed animals ($P < 0.005$; Figure 5; Table S9).

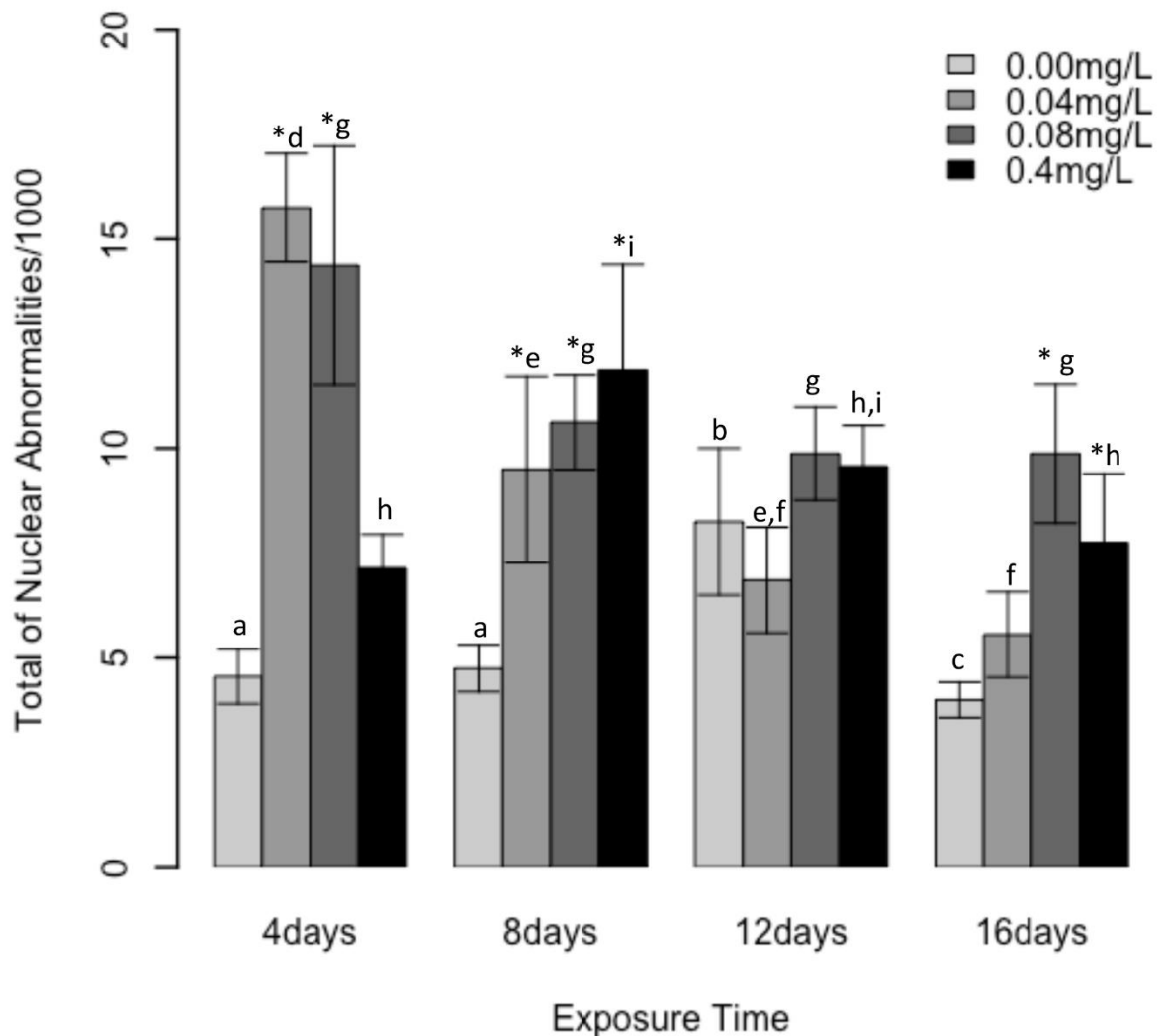


Figure 5: Total nuclear abnormalities. Different letters indicate differences between the same treatments at different exposure times. (*) Represents differences between control and treatment at the same exposure time ($p < 0.05$). Mean \pm SE.

Font: Author

For 16 days exposure, the increase in nuclear abnormality frequency was observed at the concentrations of 0.08 and 0.4 mg/L ($P < 0.01$; Figure 6; Table S9) showing a dependency of time and treatment.

Compared Analysis between Nuclear Abnormalities and Melanin

Although significant, the frequency of nuclear abnormalities is weakly correlated with both hepatic melanin area ($r = -0.23$; $P = 0.03$), and cutaneous melanin ($r = -0.22$; $P = 0.04$).

Discussion

Exposure to the commercial insecticide Regent® 800 wg caused a decrease in the individual's weight (4 days – 0.04 mg/L) and liver mass (4 days – 0.04, 0.08 mg/L), whereas the total length and hepatosomatic index did not suffer significant effects when comparing control and treatment groups. *Physalaemus nattereri* tadpoles exposed to the same insecticide (0.5-1.5 mg/L) had an accelerated development (Boscolo et al. 2017), which may result in individuals with a lower mass (Cauble and Wagner 2005) and size (Denver and Crespi 2006). Similar results have been observed for the insecticide Endosulfan, which caused a weight decrease in *Bufo bufo* (Brunelli et al. 2009). In turn, the insecticides Carbaryl, Malathion and Permethrin have led to an increase in the mass of *Bufo americanus* and *Rana clamitans*; moreover, there was a developmental delay (Boone 2008), which was also observed for Endosulfan (Brunelli et al. 2009).

Even though there were effects regarding the biometric parameters of *L. catesbeianus*, those responses were occasional, nonlinear and they may be related to the intrinsic properties of each animal, which have then culminated in body weight and liver mass reduction. Considering that there was no mortality and that animals after 16 days had biomass gain (Table 1), we assume that a normal development of the tadpoles occurred. However, other effects at morphological and cellular levels were observed in this study.

Fipronil caused the agglomeration of melanin granules, which decreased the skin pigmentation of the head and tail of *L. catesbeianus*. The dispersion of granules, which led to a darkening of the body, was observed for tadpoles exposed to different contaminants, such as insecticides (Pandey and Tomar 1985), herbicides (Pérez-Iglesias et al. 2019) and endocrine disruptors (Scaia et al. 2019). Fish exposed to nitrate/phenol/hexachlorocyclohexane had decreased pigmentation (Daiwile et al. 2015). This difference may be explained due to the mechanism of action of the compounds and the physiological responses of each species. Another determining factor in the response of chromatophores is the exposure time. Fish treated with arsenic suffered an initial reduction in their pigmentation (i.e. 7-60 days of exposure), followed by an increase during longer periods (i.e. 90 days), suggesting a physiological adaptation mechanism of melanophores (Allen et al. 2004). Therefore, pigmentation is an important biomarker and once conserved within the various animal groups, can

provide an intrinsic characteristic to their cells and/or melanin. The conservation of pigmentation has been reported for some amphibian taxa. (Provete et al. 2012).

Hepatic melanin was also responsive to Fipronil exposure, with a decrease after 4 days and subsequent increase after 8 and 12 days. Hence, time is a relevant factor, because the same concentration (0.04 mg/L) resulted in an inverse response as days advanced. Alterations in this hepatic pigment occur as a response to different chemical compounds and to contrasting land use patterns, i.e. agriculture activities (Franco-Belussi et al. 2020); in which there may be an increase (Pérez-Iglesias et al. 2016; De Oliveira et al. 2017; Pérez-Iglesias et al. 2019) or a decrease (Regnault et al. 2014; Fanali et al. 2017; 2018). MMs are associated with detoxifying pollutants (Pérez-Iglesias et al. 2016) and neutralizing free radicals (Agius and Roberts 2003; Barni et al. 1999); hence, the decrease in melanin may be an initial stress caused by Fipronil, whereas the increase may be a physiological adaptation of the cell - trying to reestablish the normal condition of the organ. This fact is, corroborated by the 16-day group, which did not present any significant difference in the melanin area.

Blood cells reflect all the physical and chemical alterations in organisms, which are exposed to insecticides and pesticides (Ambali et al. 2011). The *L. catesbeianus* tadpoles exposed to Fipronil had an increase in the total rate of nuclear abnormalities after 4 (0.04 - 0.08 mg/L), 8 (0.04 - 0.08 - 0.4 mg/L), and 16 days (0.08 - 0.4 mg/L). Some studies also evaluated the systemic effects of both an acute and a chronic exposure of aquatic vertebrates to Fipronil. In the experiment carried out by Ghisi et al. (2011) in the catfish (*Rhamdia quelen*), the results suggest that only the highest concentrations of Fipronil cause damage in erythrocytes, but none of the concentrations (0.05 - 0.23 µg/L) were sufficient to alter the DNA or the morphology of the gill cells. The authors suggest the need for studies using higher concentrations, other exposure times and other tissues. Further studies in carp fish (*Cyprinus carpio*) exposed for 96 h to sub-lethal concentrations of Fipronil (400 µg/L) reported morphological injuries (Qureshi et al. 2016). These injuries in carp fish included erythrocyte abnormalities, which included necrosis, micronucleus and hyperchromatosis; histopathological changes in the gills, liver, and kidney. Particularly, in the liver these effects occur as karyorrhexis, hepato-cellular hypertrophy, nuclear hypertrophy, melanomacrophage aggregates and central vein contraction. The toxicity in fish (concentrations of 0.3 - 0.4 mg/L) was also reported by Fredianelli et al. (2019), which included a clinical condition of anemia, alterations in liver enzyme levels, nuclear

erythrocyte changes and liver, gill and kidney damage. In this study, the rate of abnormalities was higher for the 4-day group and decreased as the experiment advanced. Such results highlight the recycling dynamics of erythrocytes with alterations at short time intervals, which makes it difficult to observe the genotoxic effects during prolonged times at low concentrations of Fipronil.

Based on our data, we demonstrated that the higher the melanin quantity, both in the skin and the liver, the lower the rate of nuclear abnormalities observed in erythrocytes. This comparative approach between genotoxic responses and morphological properties of visceral (hepatic) and somatic (cutaneous) melanin is in accordance with the assumptions by De Oliveira et al. (2017), who identified melanin as having a protective role for tissues, due to the toxicity of environmental chemical contaminants.

Our experimental design, particularly the concentrations of the compound, was, based on the most recent studies of these aquatic vertebrates. In addition to the LC50 for these aquatic vertebrates, was to obtain systemic effects comparable with the data in the literature on amphibians. There are some studies with tadpoles of Neotropical anurans having been exposed to higher concentrations of Fipronil (0.5 and 1.5 mg/L); these are related to biochemical biomarkers in *Scinax fuscovarius* (Margarido et al. 2013) and related to antioxidant enzyme responses and the metamorphosis in *Physalaemus nattereri* (Boscolo et al. 2017). Some studies are very close to our contamination levels of Fipronil (0.04, 0.08, 0.4 mg/L). showing oxidative stress and neurotoxic effects (at concentrations 0.026, 0.05, 0.1, 0.5, 1.5 mg/L), in *Physalaemus gracilis* tadpoles (Rutkoski et al. 2020) and lipid peroxidation and enzymatic antioxidant defense in *Eupemphix nattereri* tadpoles exposed to intermediary concentrations in water and sediment (0.035, 0.12, 0.18 mg/Kg) (Gripp et al. 2017).

For Neotropical amphibians, evidence showed that the higher concentrations of Fipronil (0.5 and 1.5 mg/L) was responsible for alterations in antioxidant enzymes of both *Scinax fuscovarius* tadpoles (Margarido et al. 2013) and *Physalaemus nattereri* tadpoles (Boscolo et al. 2017). As both direct and indirect effects, there are increases in the levels of oxidative damage of the cellular components due to an increase of the susceptibility of the animals to oxidative stress. Gripp et al. (2015) reported similar conclusions about Fipronil and its degradation products promoting oxidative stress in *Eupemphix nattereri* tadpoles exposed to environmentally relevant concentrations (0.035 to 0.18 mg/Kg), which decreased physiological performance in the long-term.

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

Conclusion

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

References

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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