

unesp 

CAMPUS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

Biomarcadores de exposição e efeito para avaliação dos efeitos da atrazina a distintos níveis em girinos de anuros neotropicais

Juan Manoel Pérez Iglesias

MESTRADO

PÓS GRADUAÇÃO
EM BIOLOGIA ANIMAL



Biologia
Estrutural

PÓS-GRA



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

Juan Manoel Pérez Iglesias

**Biomarcadores de exposição e efeito para avaliação dos efeitos
da atrazina a distintos níveis em girinos de anuros
neotropicais**

São José do Rio Preto
2015

Juan Manoel Pérez Iglesias

**Biomarcadores de exposição e efeito para avaliação dos efeitos
da atrazina a distintos níveis em girinos de anuros
neotropicais**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre 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”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Classius de Oliveira.
Co-orientador: Dr. Guillermo S. Natale

São José do Rio Preto
2015

Pérez Iglesias, Juan Manuel.

Biomarcadores de exposição e efeito para avaliação dos efeitos da atrazina a distintos níveis em girinos de anuros neotropicais / Juan Manuel Pérez Iglesias. -- São José do Rio Preto, 2015

73 f. : il., tabs.

Orientador: Classius de Oliveira

Coorientador: Guillermo Sebastián Natale

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Ecologia animal. 2. Toxicologia ambiental - São José do Rio Preto, Região de (SP) 3. Herbicidas. 4. Atrazina. 5. Anuro - Efeito da poluição. 6. Marcadores biológicos. I. Oliveira, Classius de. II. Natale, Guillermo Sebastián. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 577.4

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Juan Manoel Pérez Iglesias

Biomarcadores para avaliação dos efeitos da atrazina em girinos de
Rhinella schneideri (Bufonidae) e *Physalaemus nattereri*
(Leiuperidae): utilização de parâmetros tradicionais e pigmentação
visceral

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre 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”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Classius de Oliveira.
Co-orientador: Dr. Guillermo S. Natale

Comissão Examinadora

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

Profa Dra Monica Jones Costa
UFSCar –Sorocaba

Prof(a). Dr(a). Lucilene Regina Maschio
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
12 de Março de 2015

Dedicatória

*“Os meus avos, doadores de vida e colheiteiros de estes
frutos”*

Agradecimentos

Agradeço a Deus e Virgem Maria pela força para atravessar estes novos caminhos com pessoas maravilhosas;

Aos meus pais, Raúl e Delia, por seu amor e carinho, compreensão e apoio incondicional na distancia, pela oportunidade de me formar como pessoa e academicamente;

Aos meus irmãos, José, Mariana, Marcos, Agustina, Mercedes, Gabriel, Victoria, Nicolás e Santiago, meu sobrinho Manuel, por seu amor de todos os dias na distância e ser o incentivos de cada conquista e meus cunhados/as por seu carinho especial em cada momento;

À minha namorada, Nadia Bach, por ser parte de minha vida, todo seu amor, carinho, apoio e companhia em todos os momentos e principalmente nos difíceis,

Ao meu orientador, amigo e grande profissional, Prof. Dr. Classius de Oliveira pela oportunidade, por sempre acreditar e confiar em mim, e principalmente por ensinar como tem que ser orientar e ser pessoa no mesmo tempo;

Ao meu co-orientador, Dr. Guillermo S. Natale por seu apoio incondicional em cada decisão em especial nos momentos de dúvidas, e sua ajuda principalmente no crescimento pessoal e científico;

Agradecer de modo especial à Dra. Lilian Franco-Belussi, por ser uma grande amiga e pessoa, pela disponibilidade em tudo momento, conselhos e atenção quando algum problema acontecia. Muito obrigado!

Aos grandes amigos, Dr. Rodrigo Zieri, Msc Juliane Freitas e Lic. Gabriela Leite pelos momentos vividos, ensinamentos, diversões e risadas e seu apoio desde o princípio. Muito obrigado!

Aos demais amigos do Laboratório de Anatomia Comparativa IBILCE UNESP e todos amigos que me deu minha estadia em São José do Rio Preto, Muito Obrigado!

À Universidad Nacional de San Luis pela ajuda e formação acadêmica, ao Profa. Dra. Susana Tripole e Profa. Lic. Liliana Moreno pela possibilidade para pesquisar no Brasil;

À UNESP por abrir suas portas para meus estudos e todo pessoal da pela boa disposição e ajuda em cada momento especialmente na distância. Muito Obrigado!

A meus avos, meus queridos tios e primos, todos os amigos, familiares e pessoas que estiveram comigo neste longo caminho e incentivaram, ajudaram e contribuíram direta ou indiretamente com palavras e gestos de motivação durante o mestrado... Muito Obrigado!

Sumário

1. Resumo -----	1
2. Abstract -----	3
3. Abreviaturas -----	5
4. Introdução	
O Grupo Animal -----	6
Poluentes aquáticos: A utilização da Atrazina e as conseqüências para os anfíbios -----	6
Biomarcadores como sinais de alerta aos efeitos adversos dos tóxicos -----	10
Biomarcadores individuais -----	12
Biomarcadores genéticos -----	14
Novos biomarcadores: O Sistema Pigmentar Extracutâneo-----	16
Espécies de estudo -----	19
5. Justificativa e Relevância ao tema -----	21
6. Objetivo Geral -----	22
7. Objetivos Específicos -----	23
8. Material e Métodos -----	23
Manejo de organismos -----	23
Ensaio de toxicidade aguda -----	24
Parâmetros toxicológicos tradicionais -----	25
Efeitos letais -----	25
Efeitos subletais clássicos -----	25

Efeitos avaliados na pigmentação extracutânea -----	27
Análise estatística -----	28
9. Resultados -----	30
Efeitos letais -----	30
Efeitos subletais -----	30
Efeitos na atividade natatória -----	30
Efeitos no crescimento -----	32
Efeitos no desenvolvimento -----	33
Efeitos na massa total dos girinos -----	33
Presença de anormalidades morfológicas -----	34
MNs e anormalidades nucleares em eritrócitos -----	36
Pigmentação cutânea (melanóforos) -----	37
Pigmentação hepática (MMCs e agrupações de melanina) -----	37
Relações entre efeitos avaliados -----	38
10. Discussão -----	41
11. Conclusões -----	48
12. Referências Bibliográficas -----	51

Resumo

Atualmente, Brasil é o maior consumidor mundial de herbicidas. Além, o cultivo de cana de açúcar é a prática agrícola com maior extensão no Brasil, acompanhada por o uso de herbicidas como atrazina (ATRZ). A metade de estes poluentes é distribuída pelo só, ar e lagunas, abarcando ampla diversidade de microhabitats. Os efeitos de ATRZ têm sido muito documentados em anuros. O objetivo deste trabalho tem como objetivo avaliar efeito do herbicida atrazina na pigmentação cutânea e hepática como novo biomarcador de efeito e exposição, assim como os parâmetros toxicológicos clássicos (efeitos subletais e letais) em girinos de *R. schneideri* e *P. nattereri*. Foram coletadas desovas nas proximidades da cidade de São Jose do Rio Preto e mantidas em condições controladas de laboratório, posteriormente foram acondicionadas e alimentadas (fotoperíodo 16:8; temperatura 25° C) até alcançar o estágio de desenvolvimento 30 segundo Gosner. Posteriormente os girinos foram expostos durante 48 e 96 h à formulação SIPTRAN (50:100 gr ATRZ) em seis diferentes concentrações entre 1,5 – 25 mg ATRZ/L de acordo as referências bibliográficas. Dez girinos foram expostos por concentração usando três réplicas por grupo exposto, além foi usada água de rede decolorada como controle negativo. Depois de concluídos os ensaios, foram estimadas as curvas dose-resposta e demais parâmetros toxicológicos para os dois tempos de exposição. Foram analisados efeitos letais (mortalidade), subletais (alterações na natação, crescimento, desenvolvimento, massa corporal, MNs e anormalidades nucleares e presença de anormalidades morfológicas) e o novo biomarcador proposto: pigmentação extra-cutânea nos melanóforos e pigmentação hepática com contagem dos MMCs. Os dados foram analisados utilizando o método Probit, ANOVA e post hoc Dunnett, test-t e análises de componentes principais. O valor da CL50 foi 22,18 mg/L ATRZ em *R. schneideri* e 33,71 mg/L ATRZ em *P. nattereri* após de 96 h de exposição.

Os resultados mostraram efeitos subletais na atividade natatória, anormalidades morfológicas, crescimento, aumento na frequência de MNs e aumentos dos MMCs por área do fígado ($p < 0,001$) em *R. schneideri*; em tanto foram encontrados efeitos subletais na atividade natatória, anormalidades morfológicas, crescimento, massa corporal, desenvolvimento e anormalidades nos eritrócitos com células anucleadas em *P. nattereri*. Além disso, não foram observados efeitos nos melanóforos cutâneos de *R. schneideri* ($p > 0,05$). Com estes resultados podemos dizer que os efeitos subletais avaliados são biomarcadores adequados para avaliar os efeitos da exposição de ATRZ em girinos de *R. schneideri* e *P. nattereri*. Além do que os melanóforos não mostraram diferenças, a metodologia ainda está em desenvolvimento e aplicação ao menos para este modelo de estudo. Seria importante continuar a evacuação desta resposta devido a que nos melanóforos viscerais tem a função citoprotectora que já foi provada. Enquanto, confirmamos que para espécies neotropicais ATRZ produz efeitos letais e subletais e isso efeitos são os mesmos encontrados para outras espécies avaliadas em outros trabalhos. Nossos resultados sugerem que ATRZ é citotóxico e genotóxico. Por outro lado, podemos assegurar que os MMCs são biomarcadores de efeito e exposição após da exposição ao herbicida ATRZ. Por último, consideramos necessária melhor regulação das praticas agrícolas no Brasil, principalmente aquelas onde grandes quantidades de herbicidas são jogadas no ambiente porque ta pondo em risco as populações de anfíbios locais.

Palavras chaves: *Rhinella schneideri*, *Physalaemus nattereri*, atrazina, biomarcadores, melanomacrófagos

Abstract

Currently, Brazil is the world's largest consumer of herbicides. Besides, sugar cane cultivation is the agricultural practice with more extension in Brazil, accompanied by the use of herbicides as atrazine (ATRZ). Half of these pollutants is distributed in soil, air and lagoons, covering a wide variety of microhabitats. The effects of ATRZ have been widely documented in anurans. This study aims to evaluate the effect of ATRZ on extra cutaneous pigmentation and liver as a new biomarker of exposure and effect, as well as the classical toxicological parameters (sublethal and lethal effects) in tadpoles of *R. schneideri* and *P. nattereri*. Spawns were collected near the city of Sao Jose do Rio Preto, after preparation were maintained and fed under controlled laboratory conditions (photoperiod 16:8; temperature 25 °C) until reaching the development stage 30 described by Gosner. Later the tadpoles were exposed for 48 and 96 h to SIPTRAN formulation (50: 100 gr ATRZ) in six different concentrations between 1.5 to 25 mg ATRZ / L according references. Ten tadpoles were exposed for concentrations using three replicates per treatment group, in addition were used declorinated water as negative control. Finishing the test, the dose-response curves and other toxicological endpoints for the two exposure times were estimated. Lethal (mortality) and sublethal effects were analyzed (changes in swimming behavior, growth, development, body weight, MN and nuclear abnormalities and presence of morphological abnormalities) and the proposed new biomarker: extra cutaneous pigmentation in cutaneous melanophores and liver pigmentation with counting of MMCs. Data were analyzed using the Probit method, ANOVA and post-hoc Dunnett, t-test and principal components analysis. The LC50 value was 22.18 and 33.71 mg / L ATRZ in *R. schneideri* and *P. nattereri*, respectively after 96 h of exposure. The results showed sublethal effects in the swimming activity, morphological abnormalities, growth,

increased frequency of MN and increased in MMCs by area of the liver in *R. schneideri* ($p < 0.05$). On the other hand, sublethal effects were found on swimming activity, morphological abnormalities, growth, body weight development, and abnormalities in cells in anucleate erythrocytes with *P. nattereri*. In addition, no effects were observed in melanophores cutaneous of *R. schneideri* ($p > 0.05$). With these results we can say that the tested sublethal effects are indicators of ATRZ exposure in tadpoles of *R. schneideri* and *P. nattereri*. Beyond what melanophores were not different, the methodology is still in development and application at least for this study model. Will be important to continue the evaluation of this response because in the visceral melanophores has a cytoprotective function that has already been proven. While we confirmed that for neotropicals species ATRZ produces lethal and sublethal effects and that effects are the same as those for other species evaluated in other studies. Our results suggest that ATRZ is cytotoxic and genotoxic. On the other hand, we can ensure that the MMCs are biomarkers of effect and exposure to ATRZ herbicide. Finally, we consider necessary better regulation of agricultural practices in Brazil especially those where large amounts of herbicides are thrown into the environment because this endangering the populations of local amphibians.

Keywords: *Rhinella schneideri*, *Physalaemus nattereri*, atrazine, biomarkers, melanomacrophages

ABREVIATURAS

ATRZ – Atrazina

USEPA – United States Environmental Protection Agency

SINDAG – Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola

OMS – Organização Mundial da Saúde

IUCN – International Union for Conservation of Nature

CL50 – Concentração Letal 50

CE50 – Concentração Efetiva 50

NOEC – Máxima concentração onde não são visados efeitos

LOEC – Mínima concentração onde são visados efeitos

MMCs – Melanomacrófagos

NN – Natação normal

NL – Narcose leve

IN – Imóveis

MNs – Micronúcleos

BNs – Binucleadas

NLBs – Núcleos lobulados

NEs – Núcleos entalhados

SNs – Eritroplastidos

PCA – Análise dos componentes principais

Introdução

O Grupo Animal

Os anfíbios anuros apresentam ampla distribuição geográfica, ocorrendo em todos os continentes, com exceção da Antártica, sendo a maior diversidade observada nas florestas tropicais (POUGH *et al.* 2008, DUELLMAN e TRUEB 1994). Características específicas, como forte dependência com o meio onde habita, não emigram, permeabilidade cutânea à água e eletrólitos, ovos sem casca, são ectotérmicos, ciclo de vida bifásico (dependente do ambiente aquático e terrestre), role nas cadeias tróficas e modos reprodutivos, torna o grupo bastante vulnerável às alterações ambientais (ex. presença de novos compostos químicos, alterações dos eletrólitos, pH e temperatura, etc. na água) devido às ações antrópicas degradantes como destruição, alteração e fragmentação do habitat, introdução de espécies, cambio climático, ou até uso de poluentes químicos (BLAUSTEIN e KIESECKER 2002, DUELLMAN e TRUEB 1994, RABB 1990). Pelo caráter próprio e declínio populacional de certas espécies, esses animais têm sido reconhecidos como bioindicadores de qualidade ambiental (BLAUSTEIN e KIESECKER 2002, BLAUSTEIN *et al.* 1994, VITT *et al.* 1990, WEYGOLDT 1989).

Poluentes aquáticos: A utilização da Atrazina e as conseqüências para os anfíbios.

O declínio global dos anfíbios tem sido relatado desde 1980; no entanto é relativamente pequeno o conhecimento sobre as populações dos mesmos em países da América do Sul (LIPS *et al.* 2005; YOUNG *et al.* 2001). Igualmente no Brasil, onde se verifica uma grande diversidade e endemismo de espécies, explicados pela grande

dimensão geográfica e elevado número de ecossistemas, pouco se conhece sobre os processos que causam declínio nessas populações (ETEROVICK *et al.* 2005).

A diminuição global de biodiversidade, incluindo os anfíbios, é atualmente uma preocupação mundial (IUCN 2014). Os fatores propostos incluem patógenos, introdução de espécies exóticas, destruição de hábitat, mudança ambiental global e contaminação dos ambientes (SPARLING *et al.*, 2010). A contaminação causada por agroquímicos tem sido um dos fatores considerados como responsáveis pela diminuição numérica mundial dessas populações e dentro das populações sendo uma das causas o uso indiscriminado de pesticidas em agroecossistemas (SPARLING *et al.* 2010, BLAUSTEIN *et al.* 2003). A USEPA define como pesticida uma substância ou mescla de substâncias, usada para prevenir, destruir, repelir ou mitigar alguma praga. Os tipos mais comuns de pesticidas utilizados são os inseticidas, herbicidas, fungicidas e rodenticidas. Particularmente os efeitos adversos dos herbicidas estão recebendo maior atenção como um potente causador do declínio destes nos últimos anos (HAYES *et al.* 2010, JONES *et al.* 2009, ROHR *et al.* 2005, HAYES *et al.* 2002 e 2006, DAVIDSON *et al.* 2002, SPARLING *et al.* 2001). Além disso, os anuros possuem características, tais como um ciclo de vida bifásico (geralmente apresentando girinos aquáticos e adultos terrestres), pele permeável, desenvolvimento indireto, com larvas aquáticas que os tornam particularmente sensíveis à exposição de poluentes aquáticos e constituem importantes elos nas redes tróficas, assim, devido a estas características, estes organismos têm sido propostos como bons indicadores de controle da qualidade ambiental (STEBBINS e COHEN 1995). Os sistemas biológicos, são o alvo para a ação de substâncias tóxicas, que fornecem indicações importantes que não está prontamente disponível a partir da análise química das amostras ambientais e, portanto, podem ser utilizados como ferramentas de diagnóstico para a gestão ambiental integrada. Portanto, é importante

que a avaliação de respostas biológicas na biota natural seja parte integrante das avaliações de risco e perigo (JHA 2008). Dessa maneira, o entendimento de como a contaminação do ambiente afeta comunidades ecológicas é um grande desafio atual (GIAGNESSI e REIGNER 2006 a,b, JONES *et al.* 2004). Na última década, o uso de indicadores biológicos tem aumentado com o intuito de investigar a poluição ambiental (WHITFIELD 2001).

Ainda relacionado às questões ambientais, o ambiente aquático também apresenta uma grande vulnerabilidade, tendo a agricultura papel de destaque como uma das principais atividades humanas que contribuiu para o aumento da poluição, devido à utilização de pesticidas. Essas substâncias, dentre os poluentes ambientais, têm recebido recente atenção pelo seu potencial em alterar populações e o dinamismo entre comunidades (RELYEA e HOVERMAN 2005).

As maiores partes dos herbicidas e inseticidas tornaram-se poluentes comuns nas águas superficiais por causa da sua grande aplicação na agricultura e em zonas habitacionais (LIU *et al.* 2008). Herbicidas, como a atrazina (ATRZ), podem ser encontrados em áreas alagáveis e os dados atuais têm levantado novas preocupações para os anfíbios em relação à presença da ATRZ no ambiente. Particularmente, ATRZ pode ser encontrada em mais de 1 µg/L logo das precipitações em localidades onde não é usada e até 40 ppb na precipitação em áreas agrícolas e estas doses eficazes (0,1 ppb para a produção de hermafroditas e 1 ppb para a redução no tamanho da laringe) são ecologicamente relevante (HAYES *et al.* 2002).

Dentre uma gama de pesticidas utilizados em plantações agrícolas, a ATRZ (2-chloro-4-(ethylamino)-6-(isopropylamino)-s-triazine) é um dos herbicidas mais utilizados no mundo e dos mais comuns poluentes em águas subterrâneas e superficiais (U.S. Environmental Protection Agency (EPA) 1994). A ATRZ é utilizada para controle

de gramíneas e folhas largas em milho, sorgo e mesmo em cana de açúcar em algumas situações (EXTOXNET 1988), monoculturas amplamente exploradas no Brasil.

A utilização desse herbicida em solos agrícolas tem sido alvo de muitas investigações que procuram esclarecer seus efeitos na fauna (EIJSSACKERS e VAN DER DRIFT 1976). Subagja e Snider (1981) e Mola *et al.* (1987) encontraram efeito negativo na reprodução, sensibilidade espécie-específica, e efeitos letais dose-dependentes. Particularmente, os efeitos de herbicidas à base de atrazina já foram mensurados por alguns pesquisadores em diversos anfíbios (SPARLING *et al.* 2010, KLOAS *et al.* 2009, ROHR *et al.* 2005, HAYES *et al.* 2006 e 2010, COADY *et al.* 2004, CARR *et al.* 2003, HAYES *et al.* 2002 e 2003, ALLRAN e KARASOV 2001, HOWE *et al.* 1998). Em tanto os efeitos nas gônadas dos anuros foi amplamente registrado, encontrando presença de múltiplas gônadas e hermafroditismo com múltiplas testes e ovários in *Xenopus laevis* (HAYES *et al.* 2002), anomalias nas gônadas (CARR *et al.* 2003), desenvolvimento gonadal retardado (disgenesia gonadal) e desencadeia a ovogênese testicular (hermafroditismo) em *Lithobates pipiens* (HAYES *et al.* 2003) em tanto *L. clamitans*, nas concentrações de atrazina ambientalmente relevantes, não prejudica o crescimento ou o desenvolvimento reprodutivo (COADY *et al.* 2004). Outros efeitos encontrados em anuros foram no crescimento larval com diminuição do tamanho em aqueles girinos expostos, efeitos no desenvolvimento com retraço no tempo da metamorfose e produz efeitos como desmasculinização dos machos com a castração química e feminização, sendo um importante disruptor endócrino e podendo levar as populações para não completar a diferenciação sexual após da metamorfose (CARR *et al.* 2003; HAYES *et al.* 2006) e outros efeitos incluem testosterona diminuída, espermatogênese reduzida, supressão do comportamento de copulação e diminuição da fertilidade (HAYES *et al.* 2010). Em anos recentes, o uso

generalizado da ATRZ tem levantado algumas preocupações, por diversas razões, incluindo os efeitos adversos nos organismos aquáticos (PAN, 2009, SOLOMON *et al.* 1996). Outro fator preocupante está vinculado ao pico de uso desse herbicida que coincide com o período de reprodução dos anfíbios porque ATRZ é aplicada quando o solo é lavrado, de tal forma que os níveis são mais elevados durante chuvas de primavera. Este padrão de aplicação coloca os anfíbios em grande risco, porque os mais altos níveis de ATRZ têm coincidência com a época de reprodução para os anfíbios que ocorre durante o começo da primavera até finais do verão (HAYES *et al.*, 2002; ALLRAN e KARASOV 2001, HOWE *et al.*, 1998, SOLOMON *et al.*, 1996).

Como resultado do consumo e uso abusivo da ATRZ, alguns estudos têm sido conduzidos para investigar a ação do herbicida no desenvolvimento larval, incluindo alterações no crescimento, metamorfose e diferenciação das gônadas (HAYES *et al.* 2002). No entanto, quase nada se sabe sobre esses efeitos em espécies do Brasil. Os ensaios ecotoxicológicos permitem avaliar os efeitos tóxicos de uma substância ou de uma mistura complexa em organismos aquáticos (WALKER *et al.* 2006, NATALE *et al.* 2006, CASTILLO MORALES 2004, COONEY 1995).

Biomarcadores como sinais de alerta aos efeitos adversos dos tóxicos

As análises com biomarcadores têm sido utilizados com sucesso em programas de biomonitoramento. Eles servem como um sistema de alerta para a presença de compostos poluentes porque as respostas de biomarcadores aparecem antes que os danos irreversíveis ocorram no ecossistema (JOSENDE *et al.* 2015). Os biomarcadores são repostas biológicas a nível molecular-genético, bioquímico, fisiológico e histológico dos organismos para avaliar a exposição aos tóxicos. Estes parâmetros podem ser mensurados para serem utilizados como sinais de alerta inicial que permitam detectar

efeitos negativos nos organismos modelos, induzidos por um poluente aquático em tempos curtos e baixas concentrações, antes que sejam irreversíveis. Sendo então consideradas importantes ferramentas que contribuem para fundamentar a tomada de decisões para gestão e proteção ambiental (SPARLING *et al.* 2010). Normalmente, a crítica da aplicação dos biomarcadores nos diferentes níveis normalmente é pela falta de correlações entre diferentes biomarcadores em condições experimentais individuais. Mesmo assim, é importante utilizar diferentes biomarcadores porque podem não sempre estar vinculados ou correlacionados devido a que poderia haver alguns valores de atenuação ou de umbral nos diferentes níveis de organização biológica, ou seja, cada biomarcador poderia responder diferente segundo o nível de organização biológica que se considere (JHA *et al.* 2008). Particularmente, são conhecidos dois tipos de biomarcadores, efeito e exposição. Os biomarcadores de exposição são aqueles que indicam que ocorreu a exposição e que o poluente está biodisponível. A resposta pode ser devida aos poluentes mesmo ou metabolitos resultantes da interação do poluente com compostos endógenos nos órgãos do organismo. Por outro lado, os biomarcadores de efeitos estão indicando alterações em níveis bioquímicos, fisiológicos ou genéticos e dependendo da magnitude pode provocar danos ou enfermidades. Estes biomarcadores podem revelar o sítio alvo dos poluentes. Por tanto, os biomarcadores de exposição e efeito são uma parte fundamental nas análises das relações entre os poluentes no meio ambiente, na incorporação pelos organismos e na ação tóxica ou efeito sobre eles mesmos. Biomarcadores de exposição, efeito e susceptibilidade são necessários para ligar a presença de poluentes no ambiente com a sua ação em um organismo. Ainda nesse contexto, os biomarcadores podem ajudar a avaliar o estado de saúde das populações de anfíbios, atuando como parâmetros finais e subletais da intoxicação (VENTURINO *et al.* 2003, JHA *et al.* 2008). Ainda bem que existem essas ferramentas

efetivas como são os biomarcadores de efeito e exposição, atualmente é preciso desenvolvimento de novos biomarcadores com maior sensibilidade, precisão e informação rápida após da exposição e ação dos estressores ambientais e particularmente dos pesticidas usados no ambiente (JHA *et al.* 2008). Em função disso tentamos investigar e propor um novo biomarcador para avaliar os efeitos de herbicidas, com a análise do sistema pigmentar extracutâneo e especificamente nos órgãos hematopoiéticos como baço e fígado, onde residem os melanomacrófagos (MMCs).

Biomarcadores individuais

Avaliações da saúde incluem física, pós-morte, e os exames histopatológicos; contagens completas perfis hematológicos e bioquímicos sanguíneos, e as taxas de micronúcleos em eritrócitos; parasitologia; perfis de ADN, conteúdo e variabilidade tamanho do genoma em núcleos de eritrócitos; atividade da colinesterase cerebral; e as concentrações de contaminantes em muitos espécimes (OUELLET *et al.* 1997). Os pesticidas podem causar uma redução da população por um efeito subletal, tal como uma alteração no comportamento, bem como através de uma ação direta letal (COOKE 1970). O estudo do comportamento fornece múltiplas abordagens de quantificar as respostas de organismos contaminados (BROOMHALL 2004; DENÖEL *et al.* 2010). O uso de biomarcadores de comportamento tem-se lentamente integrados em toxicologia aquática porque, até recentemente, houve uma má compreensão sobre como as mudanças no comportamento podem ter correlação com as concentrações ecologicamente relevantes dos poluentes e sobre a sua utilidade na avaliação de risco ecológico. De fato, a contaminação ambiental nos ecossistemas naturais frequentemente ocorre em concentrações inferiores de aqueles que causam mortalidade significativa.

Além, comportamento tem conexão com a função fisiológica até processos ecológicos, os indicadores comportamentais de toxicidade parecem ideais para avaliação dos efeitos dos poluentes sobre populações larvas de anuros aquáticos (PELTZER *et al.* 2013). Recentemente, vários estudos têm enfatizado e demonstrado a importância do uso de efeitos na natação (especificamente comportamentais) como biomarcadores de exposição a pesticidas (BRUNELLI *et al.* 2009, DENÖEL *et al.* 2010, DENÖEL *et al.* 2012, PELTZER *et al.* 2013).

Os pesticidas podem ter muitos efeitos adversos sobre anfíbios, incluindo diminuição do crescimento e as taxas de desenvolvimento, aumento da incidência de anomalias externas, potencial reprodutivo prejudicado e morte. Podem também interagir com outros fatores para alterar a mortalidade (SPARLING E FELLERS 2009). Nesse contexto, outro biomarcador importante avaliado nas pesquisas é massa corporal e conseqüentemente o crescimento dos girinos em contato com os poluentes. Particularmente, a exposição das comunidades aquáticas aos pesticidas aumenta a competição pelo alimento restante, força para girinos recorrer a fontes alimentares potencialmente menos desejáveis, e retarda o crescimento (DIANA *et al.* 2000). Vários estudos avaliaram os efeitos dos pesticidas sobre a massa corporal dos girinos e foi encontrado que produzem efeitos adversos com diminuição da massa corporal e conseqüentemente a diminuição no crescimento (DIANA *et al.* 2000, CARR *et al.* 2003, BRODEUR *et al.* 2009, SPARLING E FELERS 2009). Por outro lado, os efeitos da predação na regulação populações de anuros de larvas são processos substanciais. Portanto, si existe problemas na taxa de crescimento, provavelmente terá um efeito profundo sobre o role nas cadeias tróficas e na aptidão dos anfíbios, o tamanho da população, e estabilidade (DIANA *et al.* 2000).

A ocorrência de excepcionalmente altas frequências de anormalidades morfológicas em populações de anfíbios naturais tem recebido atenção considerável nos últimos anos (PIHA *et al.* 2006). Durante os anos 1990, tornou-se claro que a diversidade e estado de anfíbios foram mudando rapidamente, com declínios substanciais em populações de anfíbios em muitas regiões. Assim houve, também, uma preocupação generalizada em relação a possíveis aumentos na prevalência de anomalias do desenvolvimento e malformações em anfíbios. Neste sentido, as anormalidades em anfíbios poderiam apresentar uma resposta subletais de um produto químico tóxico em seu habitat (SPARLING *et al.* 2010). Grandes avanços foram feitos na compreensão destes problemas desde 1999 e várias anormalidades foram observadas nos experimentos de laboratório e campo de contaminantes aquáticos (PELTZER *et al.* 2011, SPARLING *et al.* 2010, BRUNELLI *et al.* 2009, GURUSHANKARA *et al.* 2007, PIHA *et al.* 2006, HAYES *et al.* 2002, HARRIS *et al.* 2000, BRITSON E THRELKELD 1998, HARRIS *et al.* 1998a, OUELLET *et al.* 1997, ALVAREZ *et al.* 1995, COOKE 1972) e particularmente concentrações relativamente baixas agroquímicos podem ser relacionadas com anomalias em anfíbios (COOKE 1972, OUELLET *et al.* 1997). Neste contexto, há muita evidência para mostrar que os produtos químicos sintéticos têm efeitos profundos graves sobre anfíbios, que podem incluir malformações graves morfológicas, bem como avarias bioquímicas e fisiológicas, que reduzem a aptidão ou levar à morte (LANOO *et al.* 2012).

Biomarcadores genéticos

O ambiente aquático recebe uma grande proporção de pesticidas que possam ser potencialmente genotóxico e carcinogênico. Várias investigações demonstraram que os

compostos aditivos presentes em formulações comerciais de pesticidas têm a capacidade de induzir toxicidade celular, incluindo genotoxicidade e genotoxicidade nos organismos não-alvo que estão expostos. Desde há mais de uma década, vários grupos de pesquisa no mundo foram para avaliar comparativamente os efeitos genotóxicos e citotóxicos exercidos por vários pesticidas (RALPH E PETRAS 1997, 1998, CLEMENTS *et al.* 1997, MOUCHET *et al.* 2006, 2013, YIN 2008, 2009, LARRAMENDY *et al.* 2014). Isso criou um nicho essencial e merecido para toxicologia genética dentro do campo da ecotoxicologia, também chamada ecotoxicologia genética para avaliar os efeitos diretos ou indiretos de poluentes no material genético. Claramente, as avaliações de genotoxicidade em células somáticas e germinativas de biota natural são de suma importância. A troca de cromátides irmãs (SCE), a progressão do ciclo celular (CCP), aberrações cromossômicas estruturais (CA), ensaio de eletroforese em gel de célula única ou cometa (SCGE), micronúcleos e anormalidades nucleares (MN), índice mitótico (MI), e vermelho neutro (NR) são bioensaios utilizados como parâmetros para avaliar geno- e cito-toxicidade. Os efeitos genotóxicos de poluentes podem ocorrer em concentrações de poluentes celulares bem abaixo daqueles que causam toxicidade grave, o que torna este instrumento particularmente útil para detectar os primeiros efeitos de agentes tóxicos ambientais. O teste de micronúcleos (MN) é um ensaio rápido, eficaz e de baixo custo para determinar a mutagenicidade em vários tipos de células. Os micronúcleos são derivados a partir de fragmentos de cromossomas ou de cromossomos inteiros que não migram para o núcleo principal durante a divisão celular processo chamado clastogenesis. Outras anormalidades nucleares decorrentes de uma lesão semelhante e pode ser levado em conta para avaliar a exposição dos organismos a contaminantes genotóxicos (JOSENDE *et al.* 2015). O material genético, se não for reparado ou ocorre perda, o dano genético

terá efeitos sobre a aptidão imediata, bem como sobre o sucesso reprodutivo dos organismos expostos. Isto acabará por levar a efeitos adversos sobre a sobrevivência da população em longo prazo e, portanto, a deterioração da qualidade do ecossistema (JHA 2008). Particularmente, em espécies de anuros neotropicais, algumas pesquisas avaliaram pelo ensaio cometa e de micronúcleos os efeitos dos pesticidas em células circulantes do sangue de girinos (RUIZ-ARCAUTE *et al.* 2014, PEREZ-IGLESIAS *et al.* 2014, NIKOLOFF *et al.* 2014, VERA-CANDIOTI *et al.* 2010, LAJMANOVICH *et al.* 2015, 2014, 2005). Em tanto os anfíbios são verdadeiramente espetaculares na América do Sul, com 95% da fauna de anfíbios do continente, seria importante aumentar o número das pesquisas sob genotoxicidade e da ecotoxicologia, devido a efeitos dos contaminantes ambientais ao fim de vislumbrar os efeitos futuros destes nas populações de anfíbios.

Novos biomarcadores: O Sistema Pigmentar Extracutâneo

Os anfíbios, como demais vertebrados ectotérmicos, compartilham a existência de um sistema pigmentar extracutâneo, constituído por células com o citoplasma repleto de melanina, em vários tecidos e órgãos (GALLONE *et al.* 2002). Há referências dessas células contendo melanina em algumas vísceras de peixes (JORDANOVA *et al.* 2008, AGIUS e ROBERTS 2003, HERRÁEZ e ZAPATA 1991, ZUASTI *et al.* 1990, AGIUS e AGBEDE 1984, AGIUS 1980), em salamandras (PRELOVISEK e BULOG 2003, TREVISAN *et al.* 1991, PEDERZOLI e TREVISAN 1990), em anuros (MORESCO e OLIVEIRA 2009, ZIERI *et al.* 2007, OLIVEIRA *et al.* 2007, OLIVEIRA e ZIERI 2005, OLIVEIRA *et al.* 2003 e 2002, GALLONE *et al.* 2002, BARNI *et al.* 2002 e 1999, ZUASTI *et al.* 1998, AKULENKO 1998) e em répteis

(GOPALAKRISHNAKONE 1986, CICERO *et al.* 1989, CHRISTIANSEN *et al.* 1996, RUND *et al.* 1998, JOHNSON *et al.* 1999). Estes pigmentos melânicos que constituem o sistema pigmentar extracutâneo estão freqüentemente presentes no fígado, baço, rins, peritônio, pulmão, coração, vasos sanguíneos, timo, gônadas e meninges (FRANCO-BELUSSI *et al.* 2009b, MORESCO e OLIVEIRA 2009, ZIERI *et al.* 2007, BAGNARA e MATSUMOTO 2006, GALLONE *et al.* 2002, ZUASTI *et al.* 1998, CHRISTIANSEN *et al.* 1996, ZUASTI *et al.* 1990, AGIUS e AGBEDE 1984, AGIUS 1980). De modo particular para algumas espécies, células pigmentares também podem ser observadas em pequena proporção no órgão de Bidder de *Rhinella ornata* (= *Bufo crucifer*) ou (*Chaunus ornatus*) (Bufonidae) (OLIVEIRA *et al.* 2003), sendo também relatadas em testículos de *Rhinella schneideri* (MORESCO e OLIVEIRA 2009).

Essa pigmentação tem sido utilizada como um importante caráter fenotípico na taxonomia e filogenia de Dendrobatidae (GRANT *et al.* 2006), sendo também utilizada por Franco-Belussi *et al.* (2009) para distinguir representantes das famílias Leptodactylidae e Leiuperidae. Recentemente foi ainda descrito um componente filogenético desta pigmentação visceral em anuros, proposta por Provete *et al.* (2012).

Essas células, descritas na epiderme e em diversos órgãos são semelhantes à melanócitos (ZUASTI *et al.* 1998, AGIUS e AGBEDE 1984) provenientes da crista neural ectodérmica (SICHEL *et al.* 1997), sendo capazes de produzir e armazenar melanina em seu interior (AGIUS e ROBERTS 2003).

São também encontrados, em órgãos com função hematopoiéticas, outros tipos celulares com atividade fagocítica, semelhantes a macrófagos (AGIUS 1980), originados de células tronco hematopoiéticas (SICHEL *et al.* 1997), os quais freqüentemente se agregam formando nódulos pigmentados denominados de centro de melanomacrófagos (AGIUS 1981). Esses centros são constituintes do sistema

fagocitário mononuclear, possuindo funções relativas à sua estrutura e fisiologia. A principal função está relacionada com a fagocitose de material celular oriundo do catabolismo (ELLIS *et al.* 1976), sugerindo que esses centros são responsáveis pela detoxificação ou reciclagem de produtos tanto endógenos, quanto exógenos (HERRÁEZ e ZAPATA 1986); atuando ainda na resistência contra patógenos bacterianos e esporos parasitas (ROBERTS 1975); sua ação também está relacionada com a estocagem do ferro após a eritrofagocitose (AGIUS e ROBERTS 2003). A presença dos MMCs é relatada no baço, fígado e rins; apresentam grânulos em seus citoplasmas contendo substâncias como melanina, hemosiderina e lipofuscina, as quais são derivadas da degradação de material celular fagocitado (HERRÁEZ e ZAPATA 1991, AGIUS e AGBEDE 1984).

A melanina é um polímero complexo que pode absorver e neutralizar radicais livres, cátions e outros agentes potencialmente tóxicos, derivados da degradação de material celular fagocitado (ZUASTI *et al.* 1989). É importante para os ectotérmicos contra componentes bacterianos devido à ação da hidrogeno-peroxidase e suas quinonas precursoras, as quais agem como bactericida, favorecendo as atividades enzimáticas, que podem ser restritas em baixas temperaturas (CHRISTIANSEN *et al.* 1996).

A hemosiderina é um composto de ferro e proteínas derivadas do catabolismo da hemoglobina dos eritrócitos e, conseqüentemente, um produto metabólico intermediário que ocorre durante a reciclagem dos componentes na eritropoiese (KRANS 1989). Já a lipofuscina é resultante da polimerização oxidativa de ácidos graxos poliinsaturados, sendo acumulada em vertebrados aquáticos como resultados de dietas alimentares deficientes (PICKFORD 1953).

O papel funcional das células pigmentares nos órgãos viscerais dos vertebrados ectotérmicos ainda não está definido, havendo várias hipóteses (GALLONE *et al.*

2002), dentre elas, funções citoprotectoras relacionadas aos radicais livres (MCGRAW 2005) e processos de detoxificação de poluentes (FENOGLIO *et al.* 2005); sendo ainda demonstrado um aumento na quantidade de melanina no fígado, conjuntamente com modificações metabólicas e estruturais das células hepáticas em *Pelophylax lessonae* durante o inverno (BARNI *et al.* 1999). Ainda com relação ao fígado, o aumento da pigmentação pode estar relacionado com a hemocaterese (KALASHNIKOVA 1992, CÍCERO *et al.* 1977); e em salamandras, a ativação da melanogênese hepática pode estar relacionada com a hipóxia (FRANGIONI *et al.* 2000); já com relação aos centros de melanomacrófagos em peixes, o aumento de pigmentos melânicos tem sido relacionado com patologias (ROBERTS 1975).

Os melanomacrófagos podem ainda ser usados como biomarcadores da exposição a poluentes em peixes (COUILLARD e HODSON 1996, KHAN *et al.* 1994), onde há um aumento da densidade desse tipo celular em animais expostos a poluentes, sendo também observado aumento da hemosiderina e lipofuscina no interior dos melanomacrófagos (COUILLARD e HODSON 1996).

Espécies de estudo

Uma das espécies escolhidas foi *Rhinella schneideri* (Anura: Bufonidae), descrita por Werner (1894) (Figura 1a). Está amplamente distribuída por ambientes tipicamente não-florestais, é encontrada em vários biomas, incluindo o Chaco-Pantanal, Cerrado e Caatinga; porém também ocorre em regiões da Floresta Atlântica, ocupando desde pequenos fragmentos até grandes áreas florestais, embora comumente ocorra em agroecossistemas e áreas urbanizadas e as populações não estariam ameaçadas de extinção (IUCN 2014). Distribui-se por todas as regiões brasileiras, exceto na região Norte, além do Paraguai, partes da Argentina, Bolívia e Uruguai (FROST 2014). A

atividade reprodutiva dessa espécie ocorre em açudes e represas perenes ou com grande resistência ao dessecamento (TOLEDO *et al.* 2003). A espécie possui reprodução explosiva, freqüentemente ocorrendo no fim da estação seca e fria e início da estação chuvosa e quente (TOLEDO *et al.* 2003, VASCONCELOS e ROSSA-FERES 2005). Sob as particularidades e classificação dos girinos desta espécie Rossa-Feres e Nomura (2006) fizeram uma descrição detalhada onde girinos em estádios entre 34 e 40 (segundo GOSNER), entre outras coisas, caracterizam-se por ser muito pigmentados, apresentarem um comprimento total $24,31 \pm 1,26$ mm e corpo deprimido.



Figura 1a. Adulto de *R. schneideri* (foto esquerda). Girino de *R. schneideri* (foto direita: tomada de Rossa-Feres e Nomura 2006).

A outra espécie escolhida foi *Physalaemus nattereri* (Anura: Leptodactylidae), descrita por Steindachner (1863). É uma espécie fossorial típica e temporal, com ótima adaptação para o clima continental semi-árido. Habita savana e pastagem no bioma Cerrado, e ocorre no chão perto dos corpos de água permanentes e temporários, tais como lagos e pântanos, onde também elas se reproduzem. Além de ser comum nessas regiões, ela não se adapta bem à perturbação antrópica e, por isso, suas populações têm tendido a uma diminuição (IUCN 2014). Distribui-se pelo centro e sudeste de Brasil, este de Paraguai e Bolívia (FROST 2014). Tem uma reprodução explosiva, os machos agregam-se e vocalizam em arenas, no interior de corpos d'água,

principalmente no início da estação chuvosa. O amplexo é axilar e os ovos são depositados em ninhos de espumas, sobre a água (BASTOS *et al.* 2003). Também, as características morfológicas para descrição e identificação dos girinos em estádios entre 34 e 40 (segundo GOSNER) de *P. nattereri* foram realizadas por Rossa-Feres e Nomura (2006) destacando que o tamanho é aproximadamente $32,64 \pm 1,02$ mm, com corpo globular e apresenta uma coloração marrom translúcida (Figura 1b).



Figura 1b. Adulto de *P. nattereri* (foto esquerda). Girino de *P. nattereri* (foto direita: tomada de Rossa-Feres e Nomura 2006).

Justificativa e Relevância ao Tema

Na última década, o Brasil tem apresentado um quadro assustador no consumo de agrotóxicos (LONDRES 2011), particularmente no uso da ATRZ (KNIGHT 1997). O SINDAG (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola) mostrou que para os últimos anos a venda de poluentes agrícolas aumentou abruptamente no Brasil e tornou-se o maior consumidor mundial (LONDRES 2011). O fato mais preocupante é que, na prática, apenas uma parte dos agrotóxicos aplicados sobre lavouras se deposita sobre as plantas. Segundo pesquisas realizadas pela Embrapa Meio Ambiente, em média apenas metade desses compostos atinge o alvo (CHAIM 2003), o restante é lixiviado para o solo ou segue pelos ares poluído uma diversidade de

microhabitats (KNIGHT 1997), incluindo lagos e lagoas localizadas nas proximidades das lavouras. É justamente nesses hábitats que residem muitas espécies de anfíbios anuros, como e *Rhinella schneideri* e *Physalaemus nattereri*.

Enquanto os pesticidas têm o potencial de afetar ambientes aquáticos, os impactos sobre os anfíbios apresentam particular preocupação na última década, devido ao declínio global aparente de muitas espécies (SPARLING *et al* 2010, KIESECKER *et al* 2001, HOULIHAN *et al.* 2001, STEBBINS e COHENS 1995, ALFORD e RICHARDS 1999, BLAUSTEIN e WAKE 1990). A lista de possíveis causas para o declínio dos anfíbios é numerosa, sendo os pesticidas apontados como maiores contribuintes para esse declínio, uma vez que ocorrem no habitat desse grupo (SPARLING *et al.* 2010, STEBBINS e COHENS 2000, LENOIR *et al.* 1999, HARRIS *et al.* 1998)

Seguindo registros que mencionam a ATRZ como o pesticida mais utilizado mundialmente (STEINBERG *et al.* 1995) e comumente detectado nos solos e em corpos d'água (SOLOMON *et al.* 1995, RUDOLPH e GOSS 1993), esse trabalho visa observar os efeitos do herbicida Atrazina no desenvolvimento larval e na pigmentação visceral dos anuros *R. schneideri* e *P. nattereri*, estabelecendo aos MMCs o status de biomarcadores ambientais para anuros, uma vez que já são utilizados como biomarcadores de contaminação e estresse ambiental para peixes (KHAN *et al.* 1994, COUILLARD e HODSON 1996) e anuros (SANTOS *et al.* 2014).

Objetivo Geral

Avaliar efeito do herbicida atrazina na pigmentação cutânea e hepática, assim como os efeitos subletais e letais clássicos em girinos de *R. schneideri* e *P. nattereri*.

Objetivos Específicos

- ✓ Analisar efeito da atrazina nos melanóforos (pigmentação cutânea) dos girinos das duas espécies.
- ✓ Avaliar histologicamente a resposta dos melanomacrófagos (pigmentação hepática) como biomarcador frente ao uso da atrazina nas duas espécies.
- ✓ Avaliar efeitos toxicológicos clássicos (letais e subletais) como mortalidade, comportamento, crescimento, desenvolvimento e presença de anormalidades, massa dos girinos e genotoxicidade por meio de micronúcleos e anormalidades nucleares.
- ✓ Relacionar os possíveis efeitos na pigmentação com os efeitos toxicológicos clássicos logo da exposição aguda ao atrazina.

Material e Métodos

Todos os animais foram coletados sob licença n.18573-1, autorizada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e eutanasiados de acordo com as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Manejo de organismos. Os girinos foram obtidos de desovas tanto em *Rhinella schneideri* (Bufonidae) como em *Physalaemus nattereri* (Leptodactylidae). Foram coletados em lagoas temporárias e permanentes na região de São José do Rio Preto, SP (20° 47' 07.05" S; 49° 02' 42.09" W) As desovas foram transportadas até o laboratório (Laboratório de Anatomia Comparada do IBILCE – UNESP) e logo aclimatizadas a

16/8 h ciclo luz/obscuro em aquários com 25°C e água de clorinada com areação artificial. Os parâmetros físico-químicos da água foram aproximadamente de temperatura $25.0 \pm 1^\circ\text{C}$; pH 8.0 ± 0.1 ; oxigênio dissolvido, 7.0 ± 0.3 mg/L e condutividade 680 ± 15.0 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Os ovos foram mantidos até alcançar o estágio 25 segundo Gosner, nesse momento os girinos permaneceram alimentados com escamas do peixes (o alimento foi renovado regularmente junto com o acondicionamento dos aquários) até alcançar o estágio 30 (entre 28-30) segundo Gosner onde foram começados os procedimentos experimentais. Depois, os indivíduos foram depositados aleatoriamente nos vidros dos experimentos de acordo com desenho experimental.

Ensaio de toxicidade aguda. Testes de toxicidade aguda foram realizados de acordo com métodos padronizados propostos pela U.S. EPA (1975) com menores modificações. Para cada ponto experimental, foram realizadas experiências utilizando 10 girinos, mantidos em um recipiente de vidro de 500 mL, foram expostas a diferentes concentrações de ATRZ durante 96 h. Para determinar as concentrações utilizadas nos ensaios de toxicidade aguda, foram realizados testes preliminares. Girinos estágio 30 segundo Gosner foram expostos a 1,5; 3,0; 6,0; 12,5; 19,0 e 25,0 mg / L ATRZ. Enquanto o grupo controle negativo consistiu de 10 organismos mantidos em água da torneira sem cloro. Um número de 450 girinos de cada espécie foram submetidos a tratamentos de toxicidade. Para os ensaios, usou-se água, renovada cada 24 h, após o registro dos parâmetros avaliados, e que foi anteriormente desclorificada e oxigenada durante 48 h. Os girinos não foram alimentados durante o ensaio. Os experimentos foram realizados por triplicado e correndo simultaneamente para cada caso experimental. Decorrido o tempo experimental (48 e 96 h), os girinos vivos foram fixados em Karnovsky para avaliação dos efeitos subletais e morfologia hepática.

Parâmetros toxicológicos clássicos

Efeitos letais. A mortalidade foi registrada a cada 24 h até o fim do ensaio (96 h). O critério adotado para estimar a morte do indivíduo foi à falta de qualquer tipo de movimento mediante vários contatos com um bastão de vidro. Com os indivíduos mortos contabilizados, se calcularam os valores de LC50 para atrazina em cada tempo, os limites de confiança e demais parâmetros toxicológicos (LC10, LC90, NOEC e LOEC).

Efeitos subletais. Estes efeitos foram registrados após a exposição por 48 e 96 h em aqueles organismos que permanecerem vivos depois desses tempos. Os seguintes biomarcadores foram avaliados:

- a) Efeitos na atividade natatória. Para esse parâmetro, se agito o meio com um bastão de vidro durante 5 segundos e se observará a atividade natatória. As alterações na atividade natatória foram determinadas mediante experimentos preliminares e definidas como: Natação Normal (NN): Natação com movimentos normais, sem retraço nem tremores, Irritação (I): Movimentos acelerados mantêm se constantes no tempo frente ao estímulo mecânico, Natação Lenta (NL): Natação forçada em resposta tardia ao estímulo mecânico e marcada torção da cauda e Imobilidade (IN): Ausência de natação, só se registra esporadicamente tremores e convulsiones, segundo adaptações do BRUNELLI *et al.* (2009) e RUIZ ARCAUTE *et al.* (2012).
- b) Efeitos no crescimento. Em cada indivíduo foram tomadas medidas do comprimento rostro–cloacal com paquímetro digital de 0.001mm de precisão.

- c) Efeitos no desenvolvimento. Após a conclusão de cada experimento foi identificado o estágio de cada animal exposto utilizando a classificação proposta por Gosner (1960).
- d) Efeitos na massa total dos girinos. Após os dois tempos de exposição foi registrada a massa total (gramas) dos girinos vivos em cada grupo exposto respeito do grupo controle. Esta medição foi registrada em balança analítica de precisão (0,0001g).
- e) Presença de anormalidades morfológicas. Foram descritas tomando as categorias anormalidades morfológicas do eixo, nos olhos, no intestino e edemas propostas por Bantle *et al.* (1991). A análise incluiu somente organismos vivos logo após a exposição; os animais foram observados com microscópio estereoscópico Leica MZ 16 e fotografados com câmera para análises morfométricas.
- f) Micronúcleos (MNs) e anormalidades nucleares. O ensaio para observação de MNs foi realizado com eritrócitos maduros circulantes em sangue de 15 girinos por concentração. A frequência dos MNs foi determinada após 48 e 96 h de exposição à ATRZ. Esfregaço (frotis) de sangue periférico foi realizado em cada girino exposto e o esfregaço foi feito em lâminas, secadas no ar seco, fixadas com 100% (v/v) metanol frio (4°C) por 20 minutos, e posteriormente corados com 5% de solução Giemsa durante 12 minutos. Os dados foram expressos como o número total de MNs presentes por 1000 células. No mesmo contagem de MNs, outras anormalidades nucleares nos eritrócitos foram observadas ao microscópio segundo critérios prévios em outras espécies (NIKOLOFF *et al.* 2014; PÉREZ-IGLESIAS *et al.* 2014). Foram contabilizadas como anormalidades nucleares células com dois núcleos, consideradas como

binucleadas (BNs), também células com o núcleo apresentando uma pequena evaginação da membrana nuclear contendo eucromatina foram classificadas como núcleos lobulados (NLs). Aqueles núcleos com evaginações da membrana nuclear maiores que dos núcleos lobulados e que também têm importantes lóbulos, foram considerados como buds ou brotos (Buds). Núcleos com vacúolos e apreciável profundidade dentro do núcleo e que não contem material nuclear foram registrados como núcleos entalhados (NEs). Finalmente, os eritrócitos com formas anucleadas foram consideradas como eritroplastidos, segundo os critérios de Barny *et al.* (2007) e Lajmanovich *et al.* (2014) (Figura 2).

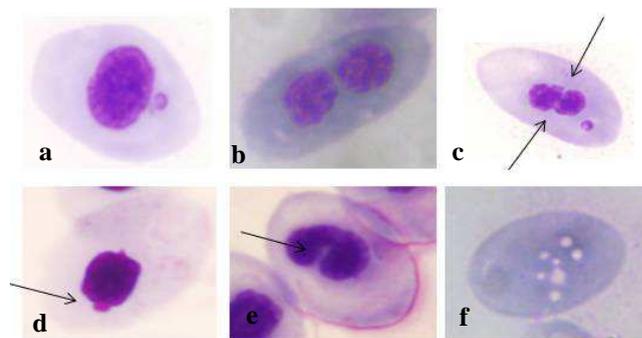


Figura 2. MNs e anormalidades morfológicas em eritrócitos de girinos; a) micronúcleo, b) binucleada, c) núcleos lobulados, d) brotos, e) núcleo entalhado e f) eritroplastido.

Efeitos avaliados na pigmentação extracutânea

Pigmentação cutânea (externa). Após da fixação dos girinos, 10 girinos por concentração foram fotografados e as imagens foram capturadas com câmara (Leica DFC295) acoplada ao em microscópio estereoscópico Leica MZ 16. Foi escolhida a seção da cauda para quantificação dos melanóforos. Após de fotografar cada girino, a foi quantificada a área da cauda com software Image Pro-Plus e por diferença de cor foram quantificados os melanóforos da cauda de cada girino exposto e posteriormente comparada como o grupo controle. Os resultados foram expressos em área dos

melanóforos por área da cauda. Os efeitos foram medidos após cada procedimento experimental de 48 e 96 h só em girinos de *R. schneideri*.

Pigmentação hepática. Para os procedimentos morfológicos, foram retirados fragmentos do fígado, fixados em solução Karnovsky por 24 h, e encaminhado à rotina histológica para desidratação em série alcoólica e inclusão em historesina. Secções de 2 µm foram coradas com hematoxilina-eosina (H-E) e as imagens foram capturadas com câmara (Leica DFC295) acoplada ao microscópio Leica DM 4000B. Para a análise morfométrico do tecido hepático foram aleatorizadas dez secções histológicas para cada animal. Destes, um total de 25 campos histológicos foram analisados, onde foi realizada a quantificação da pigmentação hepática. Análises histoquímicas foram realizadas para a detecção de lipofuscina e hemosiderina. Os efeitos serão medidos após cada procedimento experimental de 48 e 96 h só em girinos de *R. schneideri*.

Análise estatística. Para os experimentos de toxicidade foi realizada análise de Probit para dados dependentes de dose-efeito; para efeitos letais, os valores de LC 10, 50 e 90 e seus intervalos de confiança de 95% foram calculados a partir das curvas concentração-resposta (C-R) estimados para cada caso e também o software Probit Analysis (versão 1.5) foi utilizado para obter as curvas concentração-resposta (FINNEY 1972). Para comparar as respostas para todos os efeitos entre espécies, foi feita análise de regressão e ANOVA one-way. As mesmas análises ANOVA e posterior teste de Dunnett foram realizados para determinar os pontos subletais e os valores NOEC/LOEC para cada efeito (ZAR 1999). A proporção de indivíduos afetados por câmara de teste (n = 5) foi calculada para pontos finais letais e subletais (efeitos na atividade natatória, desenvolvimento, crescimento, massa total e presença de anormalidades). Para testar se

a área ocupada por sistema pigmentar externo na cauda e cada substância pigmentar (melanina - variável resposta) aumentava com o tempo e às concentrações do herbicida (variável preditora). Cada proporção foi angularmente transformada usando arco seno quadrada para assumir o pressuposto de homogeneidade e normalidade e cumprir as suposições ANOVA foram corroborados com o teste de Barlett para homogeneidade das variâncias e χ^2 teste de normalidade. Nos casos em que não foram aceitos os pressupostos da normalidade foi feito um teste de Kruskal- Wallis e o *post-hoc* teste correspondente (ZAR 1999). O *test-t* foi realizado para realizar comparações entre os parâmetros toxicológicos das duas espécies e entre os dois tempos de exposição nos valores NOEC, EC50 e CL50 (ZAR 1999). As relações entre mortalidade, atividade natatória, crescimento, desenvolvimento, massa total, anormalidades morfológicas, MNs, anormalidades nucleares e MMCs frente às concentrações do herbicida foram avaliados com a matriz de correlação usando o coeficiente de correlação de Pearson e as análises dos componentes principais usando a concentração como variável de agrupação. A significância das correlações foi avaliada por uma regressão linear simples e análises de correlação. Os níveis de significância escolhidos foram $\alpha = 0.05$ para todos os testes. Todas as análises serão realizadas no software R versão 2.11.1 (R Development Core Team, 2010).

Resultados

Efeitos letais: mortalidade

As análises Probit da mortalidade mostraram incremento significativo concentração-dependente ($p < 0,05$) nos grupos expostos à ATRZ para *R. schneideri* e *P. nattereri* logo de 48 e 96 h de exposição. Nas duas espécies, foram obtidos os valores de CL50 de ATRZ logo das 48, 72 e 96 h de exposição e os valores NOEC LOEC para 48 e 96h de exposição (Tabela 1). Finalmente, pelo *t-test*, nas duas espécies, os valores de CL50 não foram afetados pelo tempo de exposição ($p > 0,05$), as espécies não tiveram diferenças ao comparar os valores CL50 ($p > 0,05$) e similarmente não foram observadas diferenças entre os valores LOEC nas duas espécies ($p > 0,05$).

Tabela 1. Parâmetros toxicológicos de mortalidade para as duas espécies logo da exposição aguda ao ATRZ. NC: não calculado, o ANOVA não mostrou diferencia significantes.

Espécie	<i>Rhinella schneideri</i>		<i>Physalaemus nattereri</i>	
	48h	96h	48h	96h
CL50	31,095	22,185	34,602	33,713
<i>p</i>	0,050	0,026	0,010	0,043
<i>r</i>	0,943	0,973	0,989	0,956
<i>a</i>	1,412	2,603	-0,305	-2,265
<i>b</i>	1,764	1,545	3,019	5,265
NOEC	19	19	25	6
LOEC	25	25	NC	12,5

Efeitos subletais

Efeitos na atividade natatória. A categoria I não foi observada, em tanto o ANOVA revela que ATRZ produz NL e IN nos girinos das duas espécies avaliadas ($p < 0,05$). Em *R. schneideri*, tanto nas 48 como 96 h de exposição foi observada a categoria NL com diferenças significantes entre grupo controle e os expostos à ATRZ. Nos dois tempos avaliados os valores NOEC e LOEC foram 12,5 e 19 mg/L ATRZ ($p < 0,001$), respectivamente (Tabela 2). Por outro lado para categoria IN foram detectadas

diferenças significantes somente após 48 h ($p < 0,0001$) com valores NOEC e LOEC de 19 e 25 mg/L, respectivamente (Tabela 2). Em tanto, para *P. nattereri*, o ANOVA só revelou diferenças significantes na categoria NL após 96 h de exposição sendo 19 e 25 mg/L ATRZ os valores NOEC e LOEC, respectivamente.

Por meio do método Probit foi possível detectar em *R. schneideri* que a categoria NL é concentração-dependente nos dois tempos de exposição avaliados ($r_{48} = 0,681$; $p_{48} = 0,0002$ e $r_{96} = 0,666$; $p_{96} = 0,018$) e também IN resulto ser concentração-dependente nas 48 h ($r = 0,678$; $p = 0,0003$). Para girinos de *P. nattereri* a categoria NL resulto ser concentração-dependente ($r = 0,601$; $p = 0,012$) após 96 h de exposição. Estes efeitos concentração-dependentes permitiram em girinos *R. schneideri* obter os valores CE50 de 21,501 mg/L ATRZ em NL após 48 h, posteriormente CE50 de 24,310 mg/L ATRZ em NL após 96 h e uma CE50 de 30,871 mg/L ATRZ para IM após 48 h. Para o caso de *P. nattereri* o valor EC50 para NL foi 22,542 mg/L ATRZ após 48 h.

Tabela 2. Resumo dos efeitos subletais produzidos pela atrazina em duas espécies de anuros brasileiros após os tempos de exposição avaliados. Os valores LC50/EC50 estão expressos em mg/L de atrazina.

Biomarcadores nas espécies / tempo de exposição			48h				96h					
			LC50/EC50	p	r	NOEC	LOEC	LC50/EC50	p	r	NOEC	LOEC
<i>Rhinella schneideri</i>	Atividade natatória	NL	21,50	0,00	0,68	12,5	19	24,3	0,02	0,67	12,5	19
		IN	30,87	0,00	0,69	19	25	ND	-	-	ND	ND
	Crescimento		-	-	-	25	-	2,05	0,00	-0,36	12,5	19
	Desenvolvimento		-	-	-	25	-	-	-	-	25	-
	Peso corporal		-	-	-	25	-	-	-	-	25	-
	Anormalidad morfológica	Eixo	NC	-	-	0	1,5*	NC	-	-	25	-
		Boca	NC	-	-	25	-	NC	-	-	19	25
		Retr. Corp.	NC	-	-	12,5	19	NC	-	-	12,5	19
		Edema	NC	-	-	ND	ND	NC	-	-	25	-
	Totais		11,17	0,00	0,59	12,5	19	-	-	-	25	-
	MNs		em andamento								1,5	3
	NEs		em andamento				28,17		0,00	0,45	6	12,5*
	NLBs		em andamento								25	-
	BNs		em andamento								25	-
	Buds		em andamento								25	-
	SN		em andamento								19	25
	MMCs		NC	0,00	0,43	0	1,5	63,40	0,00	0,56	0	1,5
	N° grânulos de melanina		NC	0,00	0,18	0	1,5	47,01	0,00	0,59	0	1,5

Physalaemus nattereri	Atividade natatória	NL	-	0,49	-	25	-	22,54	0,01	0,60	19	25
		IN	-	0,16	-	25	-	-	-	-	25	-
	Crescimento		0,76	0,00	-0,43	3	6	1,31	0,00	-0,41	3	6
	Desenvolvimento		2,95	0,00	-0,54	3	6	-	0,10	-	1,5	3
	Peso corporal		-	0,25	-	6	12,5	2,28	0,00	-0,72	0	1,5
	Anormalidad Morfológica	Eixo	NC	-	-	19	25	NC	-	-	25	-
		Boca	NC	-	-	6	12,5*	NC	-	-	19	25
		Retr. corp.	NC	-	-	25	-	NC	-	-	12,5	19
		Edema	NC	-	-	25	-	NC	-	-	25	-
		Totais		29,81	0,00	0,68	12,5	19	-	-	-	25
	MNs					em andamento		NC	-	-	25	-
	HNs					em andamento		NC	-	-	25	-
	NLBs					em andamento		NC	-	-	25	-
BNs					em andamento		NC	-	-	25	-	
Buds					em andamento		NC	-	-	25	-	
SN					em andamento		NC	-	-	3	6	

ND: o efeito não foi detectado. NC: não calculado. * o efeito só foi detectado nessa concentração.

Efeitos no crescimento. O análise pelo ANOVA não revelou efeitos no crescimento pela exposição ao ATRZ em girinos de *R. schneideri* após 48 h ($p = 0,121$), porém uma diminuição significativa ($p = 0,029$) do tamanho dos girinos após 96 h. Os valores NOEC e LOEC segundo o teste *a posteriori* foram 12,5 e 19 mg/L ATRZ, respectivamente. Por outro lado, a análise revelou uma diminuição significativa no crescimento de girinos de *P. nattereri*, tanto 48 como 96 h após exposição ao herbicida ($p_{48} = 0,00026$; $p_{96} = 0,0021$). Os valores NOEC e LOEC obtidos para esta espécie foram 3 e 6 mg/L ATRZ, respectivamente e foram os mesmos valores nos dois tempos de exposição (Figura 3).

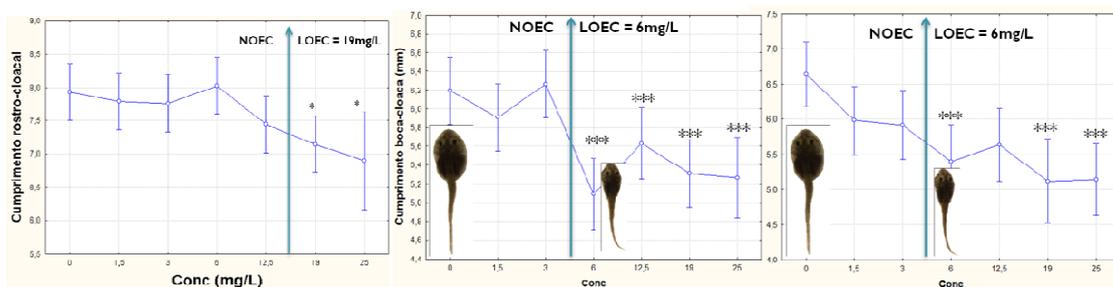


Figura 3. Efeitos no crescimento das duas espécies após exposição ao ATRZ. a) *R. schneideri* após 96h exposição. b) *P. nattereri* após 48h exposição. c) *P. nattereri* após 96h exposição.

Posteriormente, com o método Probit foi demonstrado que o crescimento em girinos de *R. schneideri* é concentração-dependente após 96 h de exposição ($r_{96} = -$

0,361; $p_{96} = 0,003$) e para girinos de *P. nattereri* nos dois tempos de exposição a diminuição do crescimento resulto ser concentração–dependente ($r_{48} = -0,425$; $p_{48} = 0,001$; $r_{96} = -0,408$; $p_{96} = 0,004$) logo de 96 h de exposição. Estes efeitos concentração – dependentes permitiram em girinos *R. schneideri* obter os valores CE50 de 2,048 mg/L ATRZ após 96 h. Posteriormente para 48 e 96 h de exposição em girinos de *P. nattereri*, os valores CE50 foram 0,763 e 1,305 mg/L ATRZ, respectivamente (Tabela 2).

Efeitos no desenvolvimento. Os análises do ANOVA não revelaram efeitos induzidos por ATRZ no desenvolvimento nos dois tempos de exposição (48 e 96 h) para girinos de *R. schneideri*. Em tanto, em *P. nattereri*, o ANOVA demonstrou que ATRZ afeta desenvolvimento para 48 e 96 h de exposição ($p_{48}=0,0005$ e $p_{96}=0,006$). Os valores NOEC e LOEC para cada tempo de exposição foram obtidos, 3 e 6 mg/L ATRZ após 48 h, respectivamente e 1,5 e 3 mg/L ATRZ após 96 h, respectivamente. Os resultados permitiram com o método Probit demonstrar que o crescimento em girinos de *P. nattereri* é concentração – dependente somente após 48 h exposição com um atraso do desenvolvimento ($r_{48} = -0,530$; $p_{48} = 0,0002$). Estes efeitos concentração – dependentes permitiram em girinos de *P. nattereri* obter os valores CE50 para 48 h de exposição, o qual foi 2,950 mg/L ATRZ (Tabela 2).

Efeitos na massa total dos girinos. Os análises do ANOVA não revelaram efeitos induzidos por ATRZ na massa total dos girinos de *R. schneideri* nos dois tempos de exposição (48 e 96 h). No outro lado, análise de ANOVA revelo que ATRZ produz diminuição significativa na massa total de girinos de *P. nattereri* tanto 48 como 96 h após exposição ao herbicida ($p_{48} = 0,008$; $p_{96} = 0,0008$). Os valores NOEC e LOEC

obtidos para esta espécie foram 6 e 12 (48 h) e 0 e 1,5 mg/L ATRZ (96 h) respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3. Média da massa total dos girinos nas duas espécies. ^a diferencia altamente significativa ($p < 0,0001$). Cor verde indica a sobrevivência de um girino nessa concentração.

Subletais. Massa girinos	Tempo	Concentrações						
		0	1,5	3	6	12,5	19	25
<i>R. schneideri</i>	48	0,066	0,054	0,069	0,056	0,062	0,065	0,085
	96	0,057	0,052	0,055	0,059	0,071	0,094	0,054
<i>P. nattereri</i>	48	0,083	0,063	0,051	0,049	0,042 ^a	0,062	0,069
	96	1,072	0,585 ^a	0,393 ^a	0,433 ^a	0,181 ^a	0,181 ^a	0,135 ^a

O método Probit demonstra que a massa total em girinos de *P. nattereri* não é concentração-dependente após 48 h em tanto si existe dependência da massa total dos girinos com a concentração após 96 h ($r_{96} = -0,724$; $p_{96} = 0,0007$). Estes efeitos concentração-dependentes permitiram em girinos de *P. nattereri* obter os valores CE50 para 96 h de exposição, o qual foi 2,278 mg/L ATRZ.

Presença de anormalidades morfológicas. Qualitativamente, detectou-se duas categorias de anormalidades definidas de acordo com Bantle et al. (1991): anormalidades do eixo e reduzindo estruturas orais (Figura 4a). Além disso, encontrou-se um novo tipo de anomalias, não definidas previamente, a qual se chamou retração corporal (Figura 4b) caracterizado por compressão nas áreas laterais da porção meio inferior e, em alguns casos, chegam até o disco oral. Esta alteração observada não esteve presente nas categorias definidas a partir de anormalidades de Bantle et al. (1991).

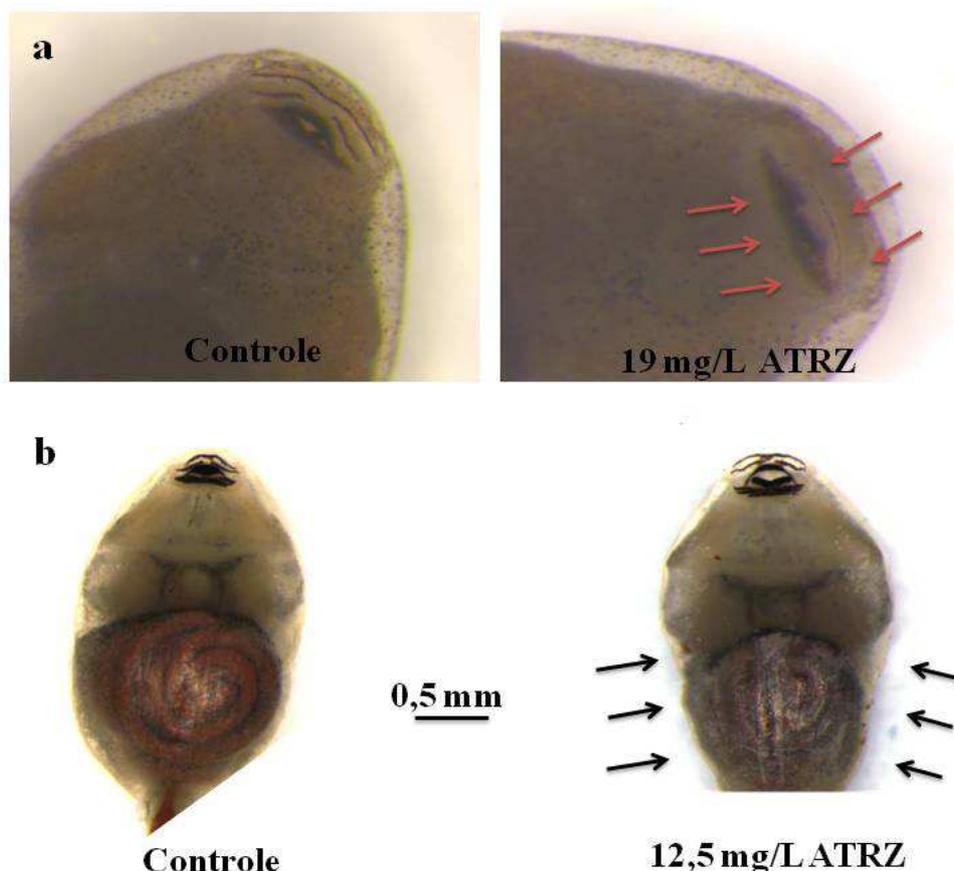
De todas as anormalidades morfológicas analisadas, o análise ANOVA demonstrou que em *R. schneideri*, a partir de 1,5 mg/L ATRZ (LOEC), tem efeitos significativos sobre o eixo axial ($p < 0,01$) e produz dobras na pele quando são expostos

ao 19 mg ATRZ/L (LOEC) ($p < 0,01$) tanto 48 h como logo de 96 h de exposição. Enquanto que após 96 h, observou-se efeitos com diferenças significativas sobre as estruturas orais, como a perda total ou parcial dos queratodontes ($p < 0,01$) e também o de dobras na pele ($p < 0,05$) foram registradas em 19 mg ATRZ/L (LOEC), mas no ocorreu isso logo das 48 h de exposição (Tabela 2).

Na outra espécie, produz efeitos com diferenças significativas nos girinos de *P. nattereri*. No primeiro tempo de exposição (48 h), foram observadas anomalias sobre o eixo axial em 19 mg/L ATRZ (LOEC) ($p < 0,05$) e sobre as estruturais orais em 12,5 mg/L ATRZ (LOEC) ($p < 0,01$) só após 48 h de exposição; enquanto após 96 h de exposição de ATRZ começa ocorrer outro efeito significativo, dobras sobre a pele em 19 mg/L ATRZ (LOEC) ($p < 0,01$) (Tabela 2).

Para obter valores de EC50 pelo método Probit neste efeito, foi considerada a soma total das anormalidades em cada espécie. Em *R. schneideri* foi possível obter valor de EC50 após 48 h, sendo o mesmo 11,170 mg/L ATRZ ($p < 0,01$; $r = 0,580$), mais não foi possível obter esse parâmetro após 96 h devido a que não foi concentração dependente ($p > 0,05$). Em *P. nattereri*, ocorre o mesmo, foi possível obter valor de EC50 após 48 h, sendo o mesmo 29,808 mg/L ATRZ ($p < 0,001$; $r = 0,676$) mas não foi possível obter esse parâmetro após 96 h, devido a que não foi concentração dependente ($p > 0,05$) (Tabela 2).

Figura 4. Anormalidades morfológicas em girinos das duas espécies expostas á ATRZ. a) anormalidades na boca por perda dos queratodontes, b) nova anormalidade, retração corporal.



MN e anormalidades nucleares em eritrócitos. Em girinos de *R. schneideri* após 96 h houve um aumento significativo dos MNs ($p < 0,05$). Os valores NOEC e LOEC obtidos foram 1,5 e 3 mg/L ATRZ, respectivamente. Quando foram analisadas a outras anormalidades nucleares, somente após 96 h foi observado incremento nos NEs ($p < 0,01$) em girinos expostos ao 12,5 mg/L ATRZ (Figura 5). Por outro lado, para girinos de *P. nattereri*, as análises do ANOVA não revelaram alterações na frequência dos MNs, NEs, BNs, NLs e buds ($p > 0,05$) por exposição ao herbicida no tempo de exposição avaliado (96 h), mas foi encontrado um aumento significativo ($p < 0,05$) nas células SN após 96 h a partir de 6 mg/L ATRZ (LOEC) (Tabela 2).

Em geral, o método Probit demonstrou um incremento na frequência de MN dependente da concentração do herbicida em girinos de *R. schneideri* e, desta maneira,

permite obter o valor EC50 de 28,170 mg/L ($p = 0,0046$; $r = 0,445$) ATRZ após 96 h (Tabela 2).

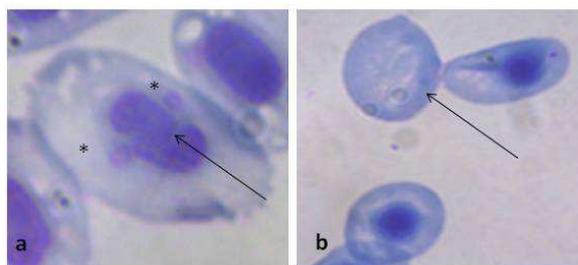
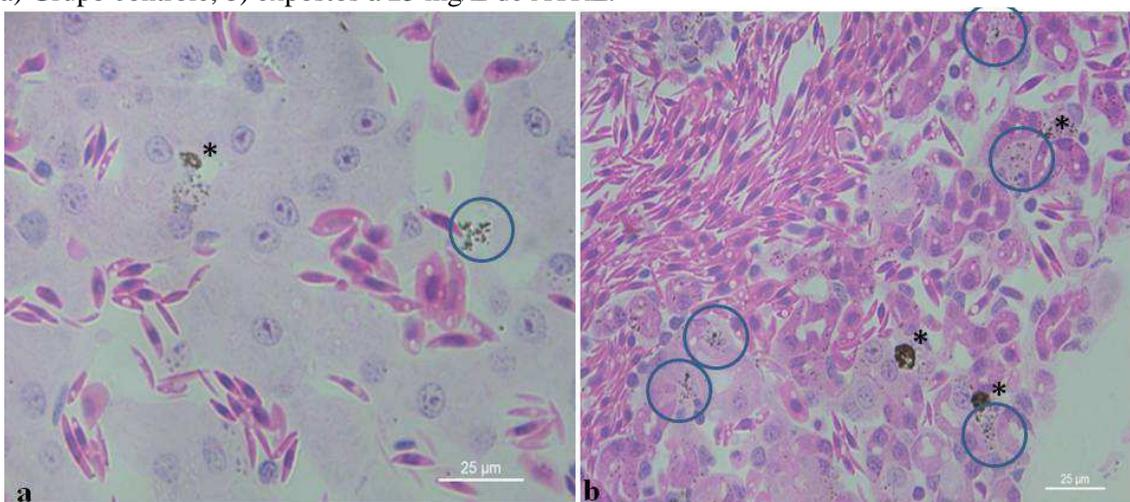


Figura 5. Efeitos da ATRZ nas células sanguíneas (eritrócitos) dos girinos nas duas espécies. a) A seta mostra núcleos entalhados, em tanto os asteriscos mostram MNs em *R. schneideri*, b) A seta mostra células sem núcleos (eritroplástidos) em *P. nattereri*.

Pigmentação cutânea (melanóforos). Este novo biomarcador proposto foi avaliado primeiramente na cauda de girinos de *R. schneideri*. Os resultados da análise de variância não mostraram diferenças significativas ($p > 0,05$) ao analisar a pigmentação externa por meio da quantificação de melanóforos em girinos expostos a diferentes concentrações de ATRZ após 48 e 96 h de exposição.

Pigmentação hepática (MMCs e agrupações de melanina). Os resultados da análise de variância mostraram diferenças altamente significativas ($p < 0,001$) para analisar a pigmentação hepática por meio da quantificação dos MMCs por área do fígado em girinos de *R. schneideri* após a exposição de 48 e 96 h (Figura 6). O ANOVA mostrou que tanto após 48 e 96 h de exposição houve aumento tanto dos MMCs ($p < 0,0001$) como das agrupações de melanina ($p < 0,0001$). Com estas diferenças significativas foi possível obter o valor NOEC e LOEC que foi o mesmo após 48 e 96 h tanto em MMCs como nas agrupações de melanina sendo o valor 0 e 1,5 mg/L ATRZ, respectivamente.

Figura 6. MMCs (asteriscos) e agrupações de melanina (círculos) em girinos de *R. schneideri*. a) Grupo controle, b) expostos á 25 mg/L de ATRZ.



Finalmente, o método Probit demonstrou um incremento dos MMCs e das agrupações de melanina dependente da concentração do herbicida em girinos de *R. schneideri* após 96 h de exposição. Desta maneira permite obter o valor EC50 para MMCs de 63,402 mg/L ATRZ ($p = 0,0001$; $r = 0,559$) e 47,014 mg/L ATRZ ($p = 0,0002$; $r = 0,587$) para agrupações de melanina (Tabela 2).

Relações entre efeitos avaliados

O análise dos componentes principais (PCA) em *R. schneideri* após 48 h, revelaram que a mortalidade, atividade natatória, crescimento e MMCs estão se correlacionando entre elas e negativamente respeito à concentração. Além disso, são variáveis que, por sua distribuição, separam altas e baixas em grupos bem definidos. Também, estes grupos são separados significativamente do grupo controle, sendo explicado todo pelo fator 1 (62,50%). Em tanto, após 96 h de exposição o PCA mostra uma significativa correlação positiva em sete de nove efeitos (variáveis de resposta) analisados (Tabela 4). A distribuição, magnitude e direção das variáveis de resposta analisadas nos gráficos definidos por o PCA demonstram que os efeitos letais, morfo-

anatômicos (anormalidades), genotóxicos (MN), e fisiológicos: histológicos (MMCs e grânulos de melanina), crescimento, desenvolvimento e atividade natatória são efeitos importantes que contribuem ao principal fator (fator 1: 75,01%) para uma diferenciação dos girinos expostos ao ATRZ com aqueles do grupo controle, ao menos nesta espécie. Também os efeitos são negativos aumentam quando as concentrações de exposição são maiores, permitindo diferenciar pelos biomarcadores girinos expostos de aqueles que não foram expostos.

Similarmente, somente após 96 h, em *P. nattereri* as concentrações são agrupadas em altas e baixas separadamente e com as maiores concentrações afetando de maneira negativa ao fator 1 (61,72%) respeito do controle que tem um aporte positivo para esse fator. As variáveis que explicam esta agrupação são a mortalidade, o crescimento e o peso dos girinos as quais estão altamente correlacionadas. Finalmente, este análise do PCA revela que os biomarcadores avaliados ajudaram a distinguir os diferentes grupos expostos e também destacou a importância do usar diferentes variáveis (biomarcadores) para avaliar os efeitos do herbicida.

Tabela 4. Correlação das variáveis (biomarcadores) analisadas por o análise dos componentes principais após 96 h. Os valores em vermelho estão mostrando as correlações dos biomarcadores.

<i>R. schneideri</i>	MORTALIDAD	ACT. NAT.	ANOR. MORF.	CRES.	DESEN.	PESO	MMCs	Nº AGRUP MELANIN	MNs
MORTALIDAD	1.00	0.85	0.85	0.65	0.79	-0.26	0.97	0.96	0.90
ACT. NAT.	0.85	1.00	0.74	0.58	0.66	-0.26	0.70	0.68	0.86
ANORM. MORF.	0.85	0.74	1.00	0.90	0.81	-0.26	0.83	0.85	0.96
CRESCIMENTO	0.65	0.58	0.90	1.00	0.85	-0.07	0.64	0.63	0.84
DESEN.	0.79	0.66	0.81	0.85	1.00	-0.34	0.80	0.77	0.83
PESO	-0.26	-0.26	-0.26	-0.07	-0.34	1.00	-0.28	-0.29	-0.32
MMCs	0.97	0.70	0.83	0.64	0.80	-0.28	1.00	1.00	0.83
Nº AGR MELANIN	0.96	0.68	0.85	0.63	0.77	-0.29	1.00	1.00	0.84
MNs	0.90	0.86	0.96	0.84	0.83	-0.32	0.83	0.84	1.00

<i>P. nattereri</i>	MORTALIDAD	ACT. NAT.	ANORM. MORE.	CRESCIMIENTO	DESEN.	PESO
MORTALIDAD	1.00	0.73	-0.01	0.58	0.34	0.77
ACT. NAT.	0.73	1.00	-0.03	0.45	0.43	0.63
ANOR.	-0.01	-0.03	1.00	0.71	0.60	0.48
CRESCIMIENTO	0.58	0.45	0.71	1.00	0.59	0.93
DESEN.	0.34	0.43	0.60	0.59	1.00	0.60
PESO	0.77	0.63	0.48	0.93	0.60	1.00

Discussão

R. schneideri e *P. nattereri* são espécies de ampla distribuição e abundância no Brasil porém as pesquisas sobre os efeitos dos estressores ambientais nestas espécies foram avaliados somente em adultos (SANTOS *et al.* 2014, FRANCO-BELUSSI *et al.* 2014 e 2013, FRANCO-BELUSSI e OLIVEIRA 2011) mais para o caso dos girinos não foram encontrados registros. Particularmente no território brasileiro, algumas pesquisas têm sinalado os efeitos nocivos dos pesticidas sobre girinos de anuros autóctones (FIGUEREIDO e RODRIGUES 2014, SIMIONI *et al.* 2013, MARGARIDO *et al.* 2013, DA SILVA *et al.* 2013, COSTA *et al.* 2008). Atualmente somente uma pesquisa avalio o efeito da ATRZ em *Lithobates catesbeianus*, espécie introduzida no Brasil (DORNELLES e OLIVEIRA 2013) e, similarmente a nosso estúdio, Figueredo e Rodrigues (2014) avaliaram o efeito de quatro pesticidas em *R. marina* e *P. centralis* (espécies da mesmo grupo, escolhendo da família Bufonidae e Leptodactylidae, que nossa pesquisa) tendo encontrado similar resposta, mesma sensibilidade das espécies ao tóxico quando são comparadas.

Focados nos valores de CL50 após 96 h de exposição ao ATRZ e baseados nos reportes de letalidade em outras pesquisas de anuros, os girinos de *R. schneideri* em estagio 30 (Gosner) mostraram ser menos sensíveis 0,018; 0,09 e 0,248 vezes que *L. catesbeianus* (BIRGE *et al.* 1983), *Hyla versicolor* (DIANA *et al.* 2000), *Rana boylei* (KERBY *et al.* 2006), respectivamente e valores de LC50 semelhantes que em *X. laevis*, *X. tropicalis* (FORT *et al.* 2004), *Lithobates sylvaticus* (KIESECKER 2002) e *R. arenarum* (BRODEUR *et al.* 2009). Entretanto, os girinos de *P. nattereri*, para o estagio avaliado, nesta pesquisa mostraram ser menos sensíveis 0,012; 0,059; 0,163; 0,575 e 0,593 vezes que em girinos de *L. catesbeianus*, *H. versicolor*, *R. boylei*, *X. tropicalis*, *L. sylvaticus*; e valores de CL50 semelhantes que em *R. schneideri*, *X. laevis*, *R. arenarum* e

Ptychadena bibroni (EZEMONYE e TONGO 2009). Por outro lado os girinos de *R. schneideri* resultaram 1,488; 1,520; 2,119; 2,164 e 9,062 vezes com maior sensibilidade ao ATRZ que *P. bibroni*, *L. pipiens* (HOWE *et al.* 1998), *Anaxyrus americanus* (BIRGE *et al.* 1983) e *L. clamitans* (COADY *et al.* 2004). Em tanto, *P. nattereri* resulto-se 1,394; 1,424 e 5,963 vezes com maior sensibilidade ao herbicida do que *L. pipiens*, *A. americanus* e *L. clamitans*. Finalmente, podemos dizer que as duas espécies avaliadas neste trabalho são sensíveis usando a ordem de magnitude da CL50 para categorias de sensibilidade e comparando com todas as CL50 de espécies de anuros expostas á ATRZ (Tabela 3). Visando estas comparações da sensibilidade nas espécies de acordo aos valores de CL50 podemos afirmar a grande importância das avaliações em espécies locais dos herbicidas ate em qualquer um pesticida devido às mudanças na sensibilidade de cada espécie. Seria interessante em novas pesquisas intentar responder a pergunta de por que as espécies mostram diferentes sensibilidades a ATRZ e a outros pesticidas. Atualmente, as hipóteses sugerem que estas mudanças nas sensibilidades das espécies podem estar relacionadas com a história de vida; podendo ocorrer por “local adaptation” (MIAUD *et al.* 2011) ou pela tolerância própria de cada família devido a sua filogenia (HAMMOND *et al.* 2012, JONES *et al.* 2009). Aparentemente, nestas espécies estudadas o fator importante é a história de vida na região, tendo pressões semelhantes no ambiente das espécies, pelo com aumento das atividades relacionadas com o cultivo da cana de açúcar. Posteriormente, isso leva a semelhantes respostas na sensibilidade das espécies frente à exposição da ATRZ mais sendo necessárias diferentes respostas fisiológicas (pelas características particulares de cada espécie) que ajudem para sua supervivência e adaptação.

Tabela 3. Comparação da sensibilidade nas espécies de anuros expostas a ATRZ considerando os valores de CL50

ESPECIE	CL50 (mg/L)	AUTOR	CATEGORIA
<i>Lithobates catesbeianus</i>	0.41	Birge et al., 1983	MUITO SENSIVEL
<i>Pseudacris regilla</i>	1.69		MUITO SENSIVEL
<i>Hyla versicolor</i>	2.00	Diana et al 2000	SENSIVEL
<i>Leptodactylus latrans</i>	5.22	Bach et al. 2013 (<i>no publicado</i>)	SENSIVEL
<i>Rana boylei</i>	5.51	Kerby, 2006	SENSIVEL
<i>Leptodactylus podicipinus</i>	13.66	<i>No publicado</i>	SENSIVEL
<i>Dermatonotus muelleri</i>	19.31	<i>No publicado</i>	SENSIVEL
<i>Xenopus tropicalis</i>	19.40	Fort et al., 2004	SENSIVEL
<i>Lithobates sylvaticus</i>	20.00	Kiesecker 2002	SENSIVEL
<i>Rhinella schneideri</i>	22.18	O NOSSO ESTUDO	SENSIVEL
<i>Xenopus laevis</i>	24.50		SENSIVEL
<i>Rhinella arenarum</i>	27.16	Brodeur et al 2009	SENSIVEL
<i>Ptychadena bibroni</i>	33.00	Ezemonye e Tongo 2009	SENSIVEL
<i>Physalaemus nattereri</i>	33.71	O NOSSO ESTUDO	SENSIVEL
<i>Lithobates pipiens</i>	47.00	Howe et al., 1998	SENSIVEL
<i>Anaxyrus americanus</i>	48.00	Birge et al., 1983	SENSIVEL
<i>Lithobates clamitans</i>	201.00	Coady et al 2004	TOLERANTE

De acordo com o registro do produto de emergência, o produto é classificado como moderadamente tóxico (Classe III). Nossos resultados nas espécies avaliadas e com a toxicidade de acordo com os valores de CL50 sugerem que ATRZ é um tóxico de categoria Classe III (perigoso para os organismos aquáticos) segundo Mazzatorta *et al.* (2002), levemente tóxico para organismos aquáticos segundo EPA (2014) e Categoria Aguda III (perigoso para a vida aquática) segundo OMS (2009).

Os resultados mostrarem que foram encontradas anormalidades nas duas espécies estudadas e particularmente as anormalidades encontradas neste trabalho são mencionadas pela primeira vez após 48 h de exposição ao ATRZ. Isso pode ser devido a uma diminuição na sobrevivência dos girinos afeitados pelas anormalidades, como sugere Diana *et al.* (2000). O aparecimento de anormalidades produzidas por exposição à ATRZ foram referidas a anormalidades nos olhos, nas patas, presença de edemas, alterações nas gônadas e alguns na laringe em estudos anteriores (SVARTZ *et al.* 2012; HAYES *et al.* 2006, COADY *et al.* 2005, CARR *et al.* 2003, HAYES *et al.* 2002,

ALLRAN e KARASOV 2001, BRITSON e THRELKELD 1998) com girinos e jovens de anuros. Por outro lado, observo se que ATRZ produz efeitos na atividade natatória nas duas espécies e estes resultados concordam com o encontrado em peixes (NIEVES-PUIGDOLLER *et al.* 2007, SAGLIO E TRIJASSE 1998, HUSSEIN *et al.* 1996, STEINBERG *et al.* 1995) mais em anuros concorda com o encontrado por Ezemonye e Tongo (2009) não em tanto com Britson e Threlkeld (1998). Neste estudo, as anormalidades morfológicas e as alterações da natação encontradas podem ter o significado ecológico, sendo que estes girinos podem ser menos ativos, mais visíveis para os predadores, aumentando o risco de predação e tendo também à aptidão (*fitness*) reduzida devido a uma escassa nutrição (ex. pela perda de peças bucais), podendo levá-los à morte. De acordo como isso, os distúrbios na natação e na aptidão ou *fitness* do animal devido aos efeitos subletais do herbicida podem causar interrupções nas interações entre espécies de anfíbios e no rol funcional das comunidades devido a que esta afeitando seu rol nas cadeias tróficas por desaparecimento de predadores e presas (PELTZER *et al.* 2013, JUNGES *et al.* 2012, HOWE *et al.* 1998).

Por outro lado, os efeitos subletais encontrados em girinos de *P. nattereri* no crescimento, desenvolvimento e peso corporal pela ação de ATRZ são conhecidos e foram já descritos por outros autores (BRODEUR *et al.* 2009, COADY *et al.* 2004, CARR *et al.* 2003, DIANA *et al.* 2000), bem como a diminuição na alimentação (ALLRAN e KARASOV 2001), que sugerem também que estes efeitos podem tender o mesmo cenário anteriormente mencionado, com aumento do risco de predação, bem como a diminuição da aptidão ou *fitness*.

Os estudos sobre a genotoxicidade da ATRZ em anuros têm diferentes resultados. Clements *et al.* (1997) tem demonstrado o que ATRZ produz efeitos genotóxicos em *L. catesbeianus* avaliados pelo ensaio cometa consistente o aumento

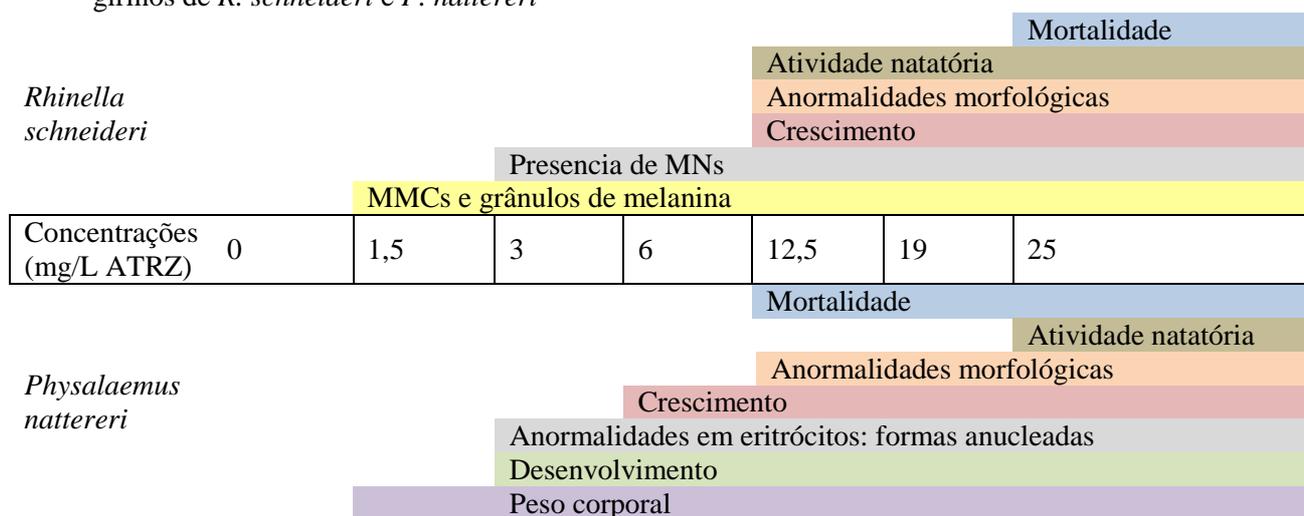
encontrado na frequência de MNs encontrado em nosso estudo em girinos de *R. schneideri*. Por outro lado, Freeman e Rayburn (2004) demonstraram que a ATRZ em girinos de outro bufonídeo (*A. americanus*) e *X. laevis* não é genotóxico. Ainda assim, os autores não descartam a possibilidade de outras espécies ser altamente sensíveis a este herbicida. Entretanto, o presente estudo foi o primeiro em avaliar a frequência de MNs em eritrócitos circulantes pela exposição ao ATRZ em girinos, encontrando-se o aumento da frequência dos MNs após 48 e 96 h na faixa de 3 até 25 mg/L ATRZ em girinos de *R. schneideri*. Também o incremento na frequência dos MNs demonstrou ser dependente da concentração, após 96 h. Particularmente, a presença de eritroplastos encontradas como formas anucleadas das células em *P. nattereri*, pode representar uma resposta fisiológica para o incremento do transporte de oxigênio, especificamente em condições de contaminação da água, aumentando a superfície celular (LAJMANOVICH *et al.* 2014, BARNI *et al.* 2007). Seria de interesse avaliar se esta resposta pode estar relacionada com a diminuição da taxa de ventilação provocada após a exposição aguda à ATRZ (produzindo condição de hipóxia), baseados nos resultados encontrados em girinos de *L. sylvaticus*, *L. pipiens* e *A. americanus* por Allran e Karasov (2001). Finalmente, segundo o proposto por ÇAVAS e ERGENE-GOZUKARA (2003) e JOSENDE *et al.* 2015, considerando as anormalidades nucleares encontradas como biomarcadores de citotoxicidade e os MNs como bioindicadores mutagênicos e de genotoxicidade, nossos resultados demonstram que a ATRZ produz efeitos citotóxicos e genotóxicos em eritrócitos de *R. schneideri* e *P. nattereri* esta informação adicionada aos efeitos teratogênicos já encontrados por BIRGE *et al.* (1983) que produz ATRZ em peixes e anuros os quais exibem cifose, lordoescolioses, rigidez extrema com enrolamento da coluna vertebral, escolioses com entrelaçamento (cefalodiprosopus), entrelaçamento cefálico (cefalodidimus), e entrelaçamento simétrico conjugado.

Por outro lado, analisando a resposta dos MMCs no fígado dos girinos de *R. schneideri*, observamos uma resposta similar ao encontrado por HAYES *et al.* (2002) e BRODKIN *et al.* (2007), com ATRZ em concentrações ambientais de 0,1 até 10 µg/L atuando como disruptor do sistema imune inato. Particularmente, BRODKIN *et al.* (2007) apontam que as células fagocíticas tem um papel fundamental na desintoxicação de ATRZ e, neste sentido, nossos resultados demonstram que os MMCs estariam cumprindo suas funções citoprotectoras e atuando na resposta imunológica destes anuros. Além disso, os resultados de MELA *et al.* (2013) sugerem que pela resposta encontrada dos MMCs e atividade de enzimas hepáticas frente à exposição à ATRZ, o fígado no peixe *Rhamdia quelem*, assim como no resto dos vertebrados aquáticos, é o órgão primário para o metabolismo e detoxificar substâncias perigosas incluindo ATRZ. Neste ponto pela ação dos MMCs encontrada em nossa pesquisa, o fígado nos girinos dos anuros torna-se o órgão mais importante na ação contra o herbicida. Considerando a sua função citoprotectora e detoxificadora dos MMCs no fígado dos girinos de *R. schneideri* pela exposição ao ATRZ podemos dizer que são biomarcadores de efeito e exposição.

É interessante destacar que a informação obtida pelos biomarcadores de efeito e exposição para cada espécie foi diferente, mas no final das 96 h as duas espécies acabam com os mesmos valores de mortalidade, o que pode ser indicativo do modo de ação não específico do herbicida e por tanto as duas espécies estão respondendo distinto e com uma sensibilidade diferente à ATRZ. Por outro lado, o PCA demonstra a validade e utilidade no uso de diferentes biomarcadores de efeito e exposição a diferentes concentrações de ATRZ e em diferentes espécies de girinos para avaliar os efeitos de ATRZ tanto nas primeiras 48 h como após 96 h de exposição. Somado a estes resultados, que o PCA claramente mostra uma progressão de efeitos com os

biomarcadores usados nestas espécies de girinos; permitindo visar que em baixas concentrações os efeitos são hepáticos e genéticos como presença de MNs ou eritroplastidos, e aumento dos MMCs. Em tanto, nas meias e altas concentrações os efeitos observados são no nível indivíduo (diminuição do peso, e atraso no desenvolvimento e crescimento, anormalidades morfológicas, atividade natatória) produzindo uma situação irreversível nos efeitos e que culmina com a morte dos girinos. O resumo dos efeitos encontrados com os biomarcadores usados em função das concentrações de ATRZ é apresentado graficamente na figura 7.

Figura 7. Representação gráfica da progressão dos efeitos produzidos por herbicida ATRZ em girinos de *R. schneideri* e *P. nattereri*



O presente estudo demonstra que a exposição experimental ao ATRZ pode causar estresse fisiológico por perda de peso relacionada com a diminuição na ingestão de alimento devido às anormalidades e atividade natatória, redução do tamanho, atraso no tempo de desenvolvimento, alterações nas células sanguíneas e hepáticas em girinos de anuros neotropicais concordando com estudos de ATRZ em anuros de NIEVES-PUIGDOLLER *et al.* (2007). Por tanto, consideramos que a presença de anormalidades morfológicas, diminuição do crescimento, alterações da

atividade natatória, a presença de MNs e os problemas hepáticos visados pelo aumento de MMCs em girinos de *R. schneideri*, e a diminuição do peso, crescimento, desenvolvimento, alterações da atividade natatória, presença de anormalidades morfológicas, e a presença de eritroplastidos em girinos de *P. nattereri*, são biomarcadores que estão indicando que a exposição a ATRZ produz diminuição da aptidão nas espécies avaliadas.

Por ultimo, por nossos resultados poderíamos considerar que as espécies de anuros neotropicais estariam em risco pela aplicação direta dos pesticidas. Outras pesquisas tem encontradas concentrações de ATRZ nos ambientes aquáticos brasileiros (DE ARMAS *et al.* 2007, DORES *et al.* 2006, CERDEIRA *et al.* 2004, LANCHOTE *et al.* 2000) por acima dos níveis permitidos pelo governo do Brasil (2 µg/L ATRZ segundo a resolução CONAMA 357/05). Além, a ATRZ pode ser tão alta dos níveis permitidos quanto na água do solo, vinte vezes maior nas águas de superfície e em bacias hidrográficas em áreas agrícolas, cem vezes maior dos níveis em riachos, e até mil vezes maiores em poços de água em áreas agrícolas. Pode ser encontrado em excesso de precipitação em localidades onde não é usado e até quarenta vezes mais dos níveis permitidos logo de chuvas em algumas áreas agrícolas, o risco nas populações de anuros autóctones será maior.

Conclusões

- Os bioensaios de exposição à ATRZ em girinos de *R. schneideri* e *P. nattereri* permitiu detectar efeitos letais e subletais na faixa de concentrações avaliadas entre 1,5 - 25 mg/L ATRZ. Esses primeiros resultados demonstram os efeitos letais e subletais da atrazina sobre girinos das espécies de anfíbios neotropicais estudadas.

- Para o caso dos melanóforos consideramos que novas e melhoradas pesquisas devem ser propostas visando sua função e ação frente à exposição dos poluentes ambientais para ser avaliados como biomarcadores. Enquanto aos MMCs, podemos dizer que são biomarcadores de efeito e exposição (dão informação precisa, são sinais de alerta respondendo em baixas concentrações e nos dois tempos de exposição e tem alta sensibilidade à ATRZ) ao menos em girino de *R. schneideri*.
- A resposta observada de cada biomarcador nas duas espécies demonstra que o herbicida não é específico, tendo-se em vista que os biomarcadores utilizados não respondem da mesma forma. Entretanto, a ATRZ, em sua formulação comercial SIPTRAN 500SC, mostrou-se hepato-, cito- e genotóxico.
- Pode-se afirmar que as duas espécies podem ser utilizadas para avaliar estes e novos biomarcadores tanto em ensaios toxicológicos de laboratório como no ambiente podendo fornecer importantes informações sobre ação dos poluentes em anuros em sítios com problemáticas ambientais.
- Os biomarcadores avaliados permitiram estimar os efeitos letais e subletais tanto nas primeiras 48 h como nas 96 h de exposição mostrando uma importante correlação entre eles. Particularmente, é importante destacar que cada biomarcador avaliado forneceu uma informação particular sobre a resposta fisiológica e sensibilidade de cada espécie frente à ação do tóxico. Devido a essa relação entre os biomarcadores, destacamos a importância também da utilização de todos os biomarcadores nos ensaios de toxicidade ao fim de tirar a maior informação possível e precisa sobre os efeitos dos tóxicos na sobrevivência dos anuros.

- Assim, a persistência da atividade agrícola como a cana de açúcar e associada ao uso do herbicida ATRZ coloca em risco as populações de anuros no Brasil, ao menos nos seus estádios larvais, tanto com pulverizações direitas nos sítios de reprodução dos anuros como o posterior *run off* na zona cultivada. Assim, as piscinas vernais, tanques de agroecossistemas, e outros locais de reprodução adjacentes a campos agrícolas podem ser sumidouros de pesticidas pelo *run off*. Anuros adultos podem entrar em contacto com ambientes terrestres contaminados quando a migração ocorre em zonas agrícolas onde a ATRZ foi aplicada até alcançar lagoas de reprodução. Então, machos cantando e casais em amplexo dos anuros neotropicais podem estar expostos as altas concentrações de ATRZ e essas superfícies de águas contaminadas.

Referências bibliográficas

- ALFORD, R.A.; RICHARDS, S.J. 1999. Global Amphibian Declines: A Problem in Applied Ecology. *Annual Review of Ecology and Systematics* 30: 133-165.
- ALVAREZ, R. HONRUBIA, M.P., HERRÁEZ, M.P. 1995. Skeletal malformations induced by the insecticides ZZ-Aphox® and Folidol® during larval development of *Rana perezii*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 28 (3): 349-356.
- AGIUS, C. 1980. Phylogenetic development of melano-macrophage centers in fish. *Journal of Zoology*. 191: 11-31.
- AGIUS, C. 1981. Preliminary studies on the ontogeny of the melanomacrophages of teleost hematopoietic tissues and age-related changes. *Dev. Comp. Immunol.* 5: 597–606.
- AGIUS, C.; AGBEDE, S.A. 1984. An electron microscopical study on the genesis of lipofuscin, melanin and haemosiderin in the haemopoietic tissues of fish. *Journal of Fish Biology*. 24(4): 471-488.
- AGIUS, C.; ROBERTS, R.J. 2003. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *J. Fish Biol.* 26: 499–509.
- AKULENKO, N.M. 1998. Topography and structure of the pigment cell aggregation in the liver of the frog (*Rana ridibunda*). *Vestnik Zoologii*. 32(3): 49-53.
- ALLAN, J.W.; KARASOV, W.H. 2001. Effects of atrazine on embryos, larvae, and adults of anuran amphibians. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20 (4): 769-775.

- BAGNARA J.T.; MATSUMOTO J. 2006. Comparative anatomy and physiology of pigment cells in nonmammalian tissues p.11-59. In: The Pigmentary System. Oxford University Press. 2ª ed. 1229p.
- BANTLE, J.A.; DUMONT, J.N.; FINCH, R.A.; LINDER, G. 1991. Atlas of abnormalities: a guide for the performance of FETAX. Oklahoma State University Publications.
- BARNI, S.; BERTONE, V.; CROCE, A.C.; BOTTIROLI, G.; BERNINI, F.; GERZELI, G. 1999. Increase in liver pigmentation during natural hibernation in some amphibians. *Journal of Anatomy*. 195: 19-25.
- BARNI, S.; VACCARONE, R.; BERTONE, V.; FRASCHINI, A.; BERNINI, F.; FENOGLIO, C. 2002. Mechanisms of changes to the liver pigmentary component during the annual cycle (activity and hibernation) of *Rana esculenta* L. *Journal of Anatomy*. 200: 185-194.
- BARNI, S.; BONCOMPAGNI, E.; GROSSO, A.; BERTONE, V.; FREITAS, I.; FASOLA, M.; FENOGLIO, C. 2007. Evaluation of *Rana snk esculenta* blood cell response to chemical stressors in the environment during the larval and adult phases, *Aquat. Toxicol.* 81: 45–54.
- BASTOS, R.P., MOTTA, J.A.O., LIMA, L.P.; GUIMARÃES, L.D. 2003. Anfíbios da Floresta Nacional da Silvânia, Estado de Goiás. Stylo Gráfica e Editora, Goiânia.
- BIRGE, W.J.; BLACK, J.A.; WESTERMAN, A.G.; RAMEY, B.A. 1983. Fish and Amphibian Embryos — A Model System for Evaluating Teratogenicity. *Fundamental and Applied Toxicology* 3: 237-242.
- BLAUSTEIN, A.R.; WAKE, D.B. 1990. Declining amphibian populations: a global phenomenon? *Trends in Ecology and Evolution* 5:203.

- BLAUSTEIN, A.R.; WAKE, D.B.; SOUSA, W.P. 1994. Amphibian Declines: Judging Stability, Persistence, and Susceptibility of populations to local and global extinctions. *Conserv. Biol.* 8 (1): 60–71.
- BLAUSTEIN, A.R.; WAKE, D.B. 1995. Declive de las poblaciones de anfibios. *Investigación e Ciencia*: 8–13.
- BLAUSTEIN, A.R.; KIESECKER, J.M. 2002. Complexity in conservation: Lessons from the global decline of amphibian populations. *Ecology Letters* 5: 597-608.
- BLAUSTEIN, A.R.; ROMANSIC, J.M.; KIESECKER, J.M. AND HATCH, A.C. 2003. Ultraviolet radiation, toxic chemicals and amphibian population declines. *Divers. Distrib.* 9: 123–140.
- BRITSON, C.A.; THRELKELD, S.T. 1998. Abundance, metamorphosis, developmental, and behavioral abnormalities in *Hyla chrysoscelis* tadpoles following exposure to three agrichemicals and methyl mercury in outdoor mesocosms. *Bull Environ Contam Tox*–161.
- BRUNELLI, E.; BERNABÓ, I.; BERG, C.; LUNDSTEDT-ENKEL, K.; BONACCI, A.; TRIPEPI, S. 2009. Environmentally relevant concentrations of endosulfan impair development, metamorphosis and behaviour in *Bufo bufo* tadpoles. *Aquatic Toxicology* 91: 135–142.
- BRODKIN, M.A.; MADHOUN, H.; RAMESWARAN, M.; VATNICK, I. 2007. Atrazine is an immune disruptor in adult northern leopard frogs (*Rana pipiens*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 26 (1): 80–84.
- BROOMHALL, S.D. 2004. Egg temperature modifies predator avoidance and the effects of the insecticide endosulfan on tadpoles of an Australian frog. *Journal of Applied Ecology* 41: 105–113.

- CARR, J.A.; GENTLES, A.; SMITH, E.E.; GOLEMAN, W.L.; URQUIDI, L.J. THUETT, K.; KENDALL, R.J.; GIESY, J.P.; GROSS, T.S.; SOLOMON, K.R.; VAN DER KRAAK, G. 2003. Response of larval *Xenopus laevis* to atrazine: assesment of growth, metamorphosis, and gonadal and laryngeal morphology. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22 (2): 369-405.
- CASTILLO MORALES, G. 2004. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Gabriela Castillo (ed.). - México: IMTA. pp. 189.
- ÇAVAS, T.; ERGENE-GOZUKARA, S. 2003. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silverstained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cytogenotoxicity indicatorsin *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. *Mutat. Res.* 538 (1–2): 81–91.
- CERDEIRA, A.L.; SANTOS, N.A.G.; UETA, J.; SHUHAMA, I.K.; PESSOA, M.C.P.Y.; SMITH JR., S.; LANCHOTE, V. L. 2004. Atrazine in Water and Biodegradation in a Recharge Area of Guarany Aquifer in Brazil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 73:117–124
- CHAIM, A.; BOTTON, M.; SCRAMIN, S.; PESSOA, M.C.Y.; SANHUEZA, R.M.V.; KOVALESKI, A. 2003. Spraying deposition of pesticide on apple crop. *Pesq. agropec. bras.* 38 (7): 889-892.
- CHRISTIANSEN, J.L.; GRZYBOWSKI, J.M.; KODAMA, R.M. 1996. Melanomacrophage aggregations and their age relationships in the yellow mud turtle, *Kinosternon flavescens* (Kinosternidae). *Pigm. Cell Res.* 9: 185–190.
- CICERO, R., SCALIA, M., SINATRA, F., ZAPPALA, C. 1977. Changes in the melanin content in the Kupffer cells of *Rana esculenta* L. induced by parenteral

- administration of heme. *Bollettino della Societa Italiana di Biologia Sperimentale*. 53: 764-769.
- CICERO, R.; MALLARDI, A.; MAIDA, I.; GALLONE, A.; PINTUCCI, G. 1989. Melanogenesis in the pigment cells of *Rana esculenta* L. liver: evidence for tyrosinase like activity in the melanosome protein fraction. *Pigment Cell Research*. 2: 100-108.
 - CLEMENTS, C.; RALPH, S.; PETRAS, M. 1997. Genotoxicity of Select Herbicides in *Rana catesbeiana* Tadpoles Using the Alkaline Single-Cell Gel DNA Electrophoresis (Comet) Assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 29:277-288.
 - COADY, K.K.; MURPHY, M.B.; VILLENEUVE, D.L.; HECKER, M.; JONES, P.D.; CARR, J.A.; SOLOMON, K.R.; SMITH, E.E.; VAN DER KRAAK, G., KENDALL, R.J.; GIESY, J.P. 2004. Effects of atrazine on metamorphosis, growth, laryngeal and gonadal development, aromatase activity, and sex steroid concentrations in *Xenopus laevis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62: 160-173.
 - CONAMA, Conselho Nacional do Meio Ambiente Brasil. 2005. Ministério do Meio Ambiente. Resolução n.357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.
 - COOKE, A.S. 1970. The effect of pp'-DDT on tadpoles of the common frog (*Rana temporaria*). *Environ. Pollut.* 1, 57–71.
 - COOKE, A.S. 1972. The effects of DDT, dieldrin and 2,4-D on amphibian spawn and tadpoles. *Environ. Pollut.* 3: 51–68.

- COONEY, J.D. 1995. Freshwater tests. In: Rand, G.M. (ed) Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate And Risk Assessment. CRC, New York, pp. 71-102.
- COSTA, M.J.; MONTEIRO, D.A.; OLIVEIRA-NETO, A.L.; RANTIN, F.T, KALININ, A.L. 2008. Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original[®]. *Ecotoxicology* 17:153–163.
- COUILLARD, C.M. AND HODSON, P.V. 1996. Pigmented macrophage aggregates: a toxic response in fish exposed to bleached-kraft mill effluent? *Environmental Toxicology and Chemistry* 15 (10): 1844–1854
- DA SILVA, H.S.V.P.; LOIOLA, C.; FERREIRA PEREIRA, S.R.; SANTOS, R.L.; DE ANDRADE, G.V.; SILVA NUNES, G. 2013. Toxicidade aguda e genotoxicidade do agrotóxico comercial Folisuper 600br a girinos de *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leiuperidae). *Pesticidas: r. ecotoxicol. e meio ambiente*, Curitiba, v. 23.
- DAVIDSON, C.; SHAFFER, H.B.; JENNINGS, M.R. 2002. Spatial tests of the pesticide drift, habitat destruction, UV-B, and climate-change hypothesis for California amphibian declines. *Conserv. Biol.* 16(6):1588-1601.
- DE ARMAS, E.D., MONTEIRO, R.T.R., ANTUNES, P.M., DOS SANTOS, M.A.P.F., DE CAMARGO, P.B., ABAKERLI, R.B. 2007. Diagnóstico espaço-temporal da ocorrência de herbicidas nas águas superficiais e sedimentos do rio Corumbataí e principais afluentes. *Quim. Nova* 30 (5): 1119-1127
- DENOËL, M.; D'HOOGHE, B.; FICETOLA, G.F.; BRASSEUR, C.; DE PAUW, E.; THOMÉ, J.P.; KESTEMONT, P. 2012. Using sets of behavioral biomarkers to assess short-term effects of pesticide: a study case with endosulfan on frog tadpoles. *Ecotoxicology* 21 (4): 1240-1250.

- DENOËL, M.; BICHOT, M.; FICETOL, G.F.; DELCOURT, J.; YLIEFF, M.; KESTEMONT, P.; PONCIN P. 2010. Cumulative effects of road de-icing salt on amphibian behavior. *Aquatic Toxicology* 99: 275–280.
- DORES, E.F.G.C.; NAVICKIENE, S.; CUNHA, M.L.F.; CARBO, L.; RIBEIROC, M.L.; DE-LAMONICA-FREIRED, E.M. 2006. Multiresidue Determination of Herbicides in Environmental Waters from Primavera do Leste Region (Middle West of Brazil) by SPE-GC-NPD. *J. Braz. Chem. Soc.* 17 (5): 866–873.
- 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*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 66 (3): 415–429.
- DUELLMAN, W.E., TRUEB, L. 1994. *Biology of Amphibia*. McGraw-Hill Book Company, New York. 670p.
- EIJSACKERS, H.; VAN DER DRIFT, J. 1976. Effects on the soil fauna In: L. J. Audus (ed.), *Herbicides*. Academic Press, New York, pp.149-174.
- ELLIS A.E., MUNROE A.L.S., ROBERTS R.J. 1976. Defense mechanisms in fish. 1. A study of the phagocytic system and the fate of intraperitoneally injected particulate material in the plaice (*Pleuronectes platessa* L.). *J Fish Biol* 8:67–78.
- ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). 2014. Technical Overview of Ecological Risk Assessment Analysis Phase: Ecological Effects Characterization: http://www.epa.gov/oppefed1/ecorisk_ders/toera_analysis_eco.htm. Appendix I. Toxicity Categories and LOCs: <http://www.epa.gov/espp/litstatus/effects/redleg-frog/naled/appendix-i.pdf>

- ETEROVYCK, P.C.; CARNAVAL, A.C.O.Q.; BORGES-NOJOSA, D.M.; SILVANO, D.L.; SEGALLA, M.V.; SAZIMA, I. 2005. Amphibian Declines in Brazil: An Overview. *Biotropica* 37 (2): 166–179 2005
- EXTTOXNET. 1998. Extension Toxicology Network InfoBase. Atrazine and alachlor pesticide information profiles. Oregon State University, 1998.
- FENOGLIO, C.; BONCOMPAGNI, E.; FASOLA, M.; GANDINI, C.; COMIZZOLI, S.; MILANESI, G. AND BARNI, S. 2005. Effects of environmental pollution on the liver parenchymal cells and Kupffer-melanomacrophagic cells of the frog *Rana esculenta*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60: 259–268.
- FIGUEREIDO, J.; RODRIGUES, D.J. 2014. Effects of four types of pesticides on survival, time and size to metamorphosis of two species of tadpoles (*Rhinella marina* and *Physalaemus centralis*) from the southern Amazon, Brazil. *Herpetological Journal* 24: 7–15.
- FINNEY D.J. 1971. Probit Analysis. Cambridge Univ. Press, London.
- FRANCO-BELUSSI, L.; ZIERI, R.; SANTOS, L.R.S.; MORESCO, R.M.; OLIVEIRA, C. 2009. Pigmentation in Anuran Testes: Anatomical Pattern and Variation. *The Anatomical Record* 292: 178–182.
- FRANCO-BELUSSI, L., CASTRUCCI, A.M.L.; OLIVEIRA, C. 2013 Responses of melanocytes and melanomacrophages of *Eupemphix nattereri* (Anura: Leiuperidae) to Nle4, D-Phe7- α -melanocyt stimulating hormone and lipopolysaccharides. *Zool.* 116: 316-324.
- FRANCO-BELUSSI, L.; OLIVEIRA, C. 2011. Lipopolysaccharides induce changes in the visceral pigmentation of *Eupemphix nattereri* (Anura: Leiuperidae). *Zool.* 114: 298-305.

- FRANCO-BELUSSI, L.; BARONI LEITE, G.; SILBERSCHMIDT FREITAS, J.; OLIVEIRA, C. 2014. Morphological effects of bacterial compounds on the testes of *Eupemphix nattereri* (Anura). *Animal Biology* 64 (3): 261 – 275.
- FRANGIONI G, BORGIOLI G, BIANCHE S, PILLOZZI S. 2000. Relationships between hepatic melanogenesis and respiratory conditions in the newt, *Triturus carnifex*. *Journal of Experimental Zoology*. 287: 120-127.
- FREEMAN, J.L.; RAYBURN, A.L. 2004. In vivo genotoxicity of atrazine to anuran larvae. *Mutation Research* 560: 69–78.
- FROST, D.R. 2014. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0 (*Date of access*). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA.
- GALLONE, A; GUIDA, G.; MAIDA, I; CÍCERO, R. 2002. Spleen and liver pigmented macrophages of *Rana esculenta* L. A new melanogenic system? *Pigment Cell Research*. 15: 32-40.
- GIAGNESSI, L.; REIGNER, N. 2006a. Pesticide Use in U.S, Crop Production: 2002 With Comparison to 1992 & 1997, Fungicides and Herbicides. Croplife Foundation, Washington, DC.
- GOPALAKRISHNAKONE, P. 1986. The structure of the pigment cells in the turtle *Trionyx sinensis*. *Arch. Histol. Jpn.* 49: 421–435.
- GOSNER, K.L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae. *Herpetol.* 16:183-190.
- GRANT, T.; FROST, D.R.; CALDWELL, J.P.; GAGLIAROD, R.; HADDAD, C.F.B.; KOK, P.J.R.; MEANS, D.B.; NOONAN, B.P.; SCHARGEL, W.E.; WHEELER, W.C. 2006. Phylogenetic Systematics of Dart-Poison Frogs and

their Relatives (Amphibia: Athesphatanura: Dendrobatidae). Bulletin of the American Museum of Natural History. p. 299-362.

- GURUSHANKARA, H.P., KRISHNAMURTHY, V. VASUDEV, S.V. 2007. Morphological abnormalities in natural populations of common frogs inhabiting agroecosystems of central Western Ghats. Applied Herpetology 4: 39–45.
- HARRIS, M.L.; BISHOP, C.A.; STRUGER, J.; RIPLEY, B.; BOGART, J.P. 1998. The functional integrity of northern leopard frog (*Rana pipiens*) and green frog (*Rana clamitans*) populations in orchard wetlands. ii. Effects of pesticides and eutrophic conditions on early life stage development. Environmental Toxicology and Chemistry 17 (7): 1351–1363.
- HARRIS, M.L.; CHORA, L., BISHOP, C.A.; BOGART, J.P. 2000. Species- and Age-Related Differences in Susceptibility to Pesticide Exposure for Two Amphibians, *Rana pipiens*, and *Bufo americanus*. Bull. Environ. Contam. Toxicol.: 64:263-270.
- HAYES, T.B.; COLLINS, A.; LEE, M.; MENDOZA, M.; NORIEGA, N.; STUART, A.A.; VONK, A. 2002a. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazina at low ecologically relevant doses. PNAS 99 (8): 5476-5480.
- HAYES, T.B.; HASTON, K.; TSUI, M.; HOANG, A.; HAEFFELE, C.; VONK, A. 2002b. Feminization of male frogs in the wild: water-borne herbicide threaten amphibian populations in parts of the United States. Nature 419: 895-896.
- HAYES, T.B.; HASTON, K.; TSUI, M.; HOANG, A.; HAEFFELE, C.; VONK, A. 2003. Atrazine-Induced hermaphroditism at 0.1ppb in American Leopard frogs (*Rana pipiens*): Laboratory and field evidence. Environ. Health Perspect. 111: 568-575.

- HAYES, T.; STUART, A.A.; MENDOZA, M.; COLLINS, A. NORIEGA, N. VONK, JOHNSTON, G.; LIU, R; KPODZO, D. 2006a. Characterization of atrazina-induced gonadal malformations in African Clawed frogs (*Xenopus laevis*) and comparisons with effects of an androgen antagonist (cyproterone acetate) and exogenous estrogen (17 β -Estradiol): Support for the demasculinization/feminization hypothesis. *Environ. Health Perspec.* 114 (1): 134-141.
- HAYES, T.; KHOURY, V.; NARAYAN, A.; NAZIR, M.; PARK, A.; BROWN, T.; ADAME, L.; CHAN, E.; BUCHHOLZ, D.; STUEVE, T.; GALLIPEAU, S. 2010. Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African Clawed frogs (*Xenopus laevis*). *PNAS* 107 (10): 4612-4617.
- HERRÁEZ, M.P.; ZAPATA, A.G. 1991. Structural characterization of the melanomacrophage centres (MMC) of goldfish *Carassius auratus*. *European Journal of Morphology* 29(2): 89-102.
- HOULIHAN, J.E.; FINDLAY, C.S.; SCHMIDT, B.R.; MEYERS, A.H.; KUZMIN, S.L. 2001. Quantitative evidence for global amphibian population declines. *Nature* 404:752–755.
- HOWE, G.E.; GILLIS, R.; MOWBRAY, R.C. 1998. Effect of chemical synergy and larval stage on the toxicity of atrazina and alachlor to amphibian larvae. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17 (3): 519-525.
- IUCN 2014. *The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.3.* <<http://www.iucnredlist.org>>. Downloaded on 17 November 2014.
- JHA, A.N. 2008. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis* 23 (3): 207–221.

- JOHNSON, J.C.; SCHWIESOW, T.; EKWALL, A.K.; CHRISTIANSEN, J.L. 1999. Reptilian melanomacrophages function under conditions of hypothermia: observations on phagocytic behavior. *Pigment Cell Res* 12: 376–382.
- JONES, R.; LEAHY, J.; MAHONEY, M.; MURRAY, L.; ODENKRICHEN, E.; PETRIE, R. 2004. Overview of the Ecological Risk Assessment Process in the Office of Pesticide Programs. U.S. Environmental Protection Agency, Washington.
- JONES, D.K.; HAMMOND, J.I.; RELYEA, R.A. 2009. Very highly toxic effects of endosulfan across nine species of tadpoles: lag effects and family-level sensitivity. *Environmental Toxicology Chemistry* 28 (9): 1939-1945.
- JOSENDE, M.E.; TOZETTI, A.M.; ALALAN, M.T.; FILHO, V.M.; DA SILVA XIMENEZ, S. 2015. Genotoxic evaluation in two amphibian species from Brazilian subtropical wetlands. *Ecological Indicators* 49: 83–87.
- Flavio Manoel Rodrigues da Silva Júnior a, Samantha Eslava Martins
- HAMMOND, J.I., JONES, D.K., STEPHENS, P.R., RELYEA, R.A. 2012. Phylogeny meets ecotoxicology: evolutionary patterns of sensitivity to a common insecticide. *Evolutionary Applications* 5: 593–606.
- JORDANOVA, M.; MITEVA, N.; ROCHA, E. 2008. A qualitative and quantitative study of the hepatic pigmented macrophage aggregates during the breeding cycle of the brown trout, *Salmo letnica* Kar. (Teleostei, Salmonidae). *Microsc. Res. Tech.* 71: 822–830.
- JUNGES, C.M.; PELTZER, P.M.; LAJMANOVICH, R.C.; ATTADEMO, A.M.; CABAGNA ZENKLUSEN, M.C.; BASSO, A. 2012 Toxicity of the

- fungicide trifloxystrobin on tadpoles and its effect on fish–tadpole interaction. *Chemosphere* 87: 1348–1354.
- KALASHNIKOVA, M.M. 1992. Erythrophagocytosis and pigment cells of the amphibian liver. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 113: 82-84.
 - KHAN, R.A.; BARKER, D.E.; HOOPER, R. 1994. Histopathology in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) living adjacent to a pulp and paper mill. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 26: 95–102.
 - KIESECKER, J.M.; BLAUSTEIN, A.R.; BELDEN, L.K. 2001. Complex causes of amphibian population declines. *Nature* 410:681–684.
 - KLOAS, W.; LUTZ, I.; URBATZKA, R.; SPRINGER, T.; KRUEGER, H.; WOLF, J.; HOLDEN, L.; HOSMERE, A. 2009. Does atrazina affect larval development and sexual differentiation of South African Clawed frogs? *Trends in comparative endocrinology and neurobiology. Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1163: 437-440.
 - KNIGHT, D. (1997) Who Benefits, Who Suffers? The global politics of pesticide use in Brazil. *Z Magazine*, <http://www.zmag.org/ZMag/articles/jan97knight.htm>
 - KRANZ, H. 1989. Changes in splenic melano-macrophage centres of dab. *Limanda limanda* during and after infection with ulcer disease. *Dis. Aquat. Organ.* 6: 167–173.
 - LAJMANOVICH, R.C., CABAGNA, M., PELTZER, P.M., STRINGHINI, G.A., ATTADEMO, A.M. 2005. Micronucleus induction in erythrocytes of the *Hyla pulchella* tadpoles (Amphibia: Hylidae) exposed to insecticide endosulfan. *Mutation Research* 587: 67–72.

- LAJMANOVICH, R.C.; CABAGNA-ZENKLUSEN, M.C.; ATTADEMO, A.M.; JUNGES, C.M.; PELTZER, P.M.; BASSÓ, A.; LORENZATTI, E. 2014. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in tadpoles of the common toad (*Rhinella arenarum*) treated with the herbicides Liberty® and glufosinate-ammonium, *Mutat. Res.: Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2014.04.009>.
- LAJMANOVICH, R.C.; JUNGES, C.M.; CABAGNA-ZENKLUSEN, M.C.; ATTADEMO, A.M.; PELTZER, P.M.; MAGLIANESE, M.; MÁRQUEZ, V.E.; BECCARIA, A.J. 2015. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in aqueous suspension on the South American common frog *Leptodactylus latrans* (Anura: Leptodactylidae) tadpoles. *Environmental Research* 136: 205 – 212.
- LANCHOTE, V.L.; BONATO, P.S.; CERDEIRA, A.L.; GUINAIN SANTOS, N.A.; CARVALHO, D.; GOMES, M.A. 2000. HPLC screening and GC-MS confirmation of triazine herbicides residues in drinkingwater from sugar cane area in Brazil. *Water, Air, and Soil Pollution* 118: 329–337.
- LENOIR, J.S.; MCCONNELL, L.L.; FELLERS, G.M.; CAHILL, T.M.; SEIBER, J.N. 1999. Summertime transporte of current-use pesticides from California's central valley to Sierra Nevada mountain range, USA. *Environmental Toxicology Chemistry* 18: 2715-2722.
- LIPS, K.R.; BURROWES, P.A.; MENDELSON III, J.R.; PARRA-OLEA, G. 2005. Amphibian Declines in Latin America: Widespread Population Declines, Extinctions, and Impacts. *Biotropica* 37(2): 163–165.

- LONDRES, F. 2011. Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida. – Rio de Janeiro: AS-PTA Assessoria e serviços a projetos em agricultura alternativa. Rede Brasileira de Justiça Ambiental. 188p.
- LIU, S.S.; SONG, X.Q.; LIU, H.L.; ZHANG, Y.H.; ZHANG, J. 2009. Combined photobacterium toxicity of herbicide mixtures containing one insecticide. *Environment International* 34: 773–781.
- MARGARIDO, T.C.S.; FELÍCIO, A.A.; ROSSA-FERES D.C.; ALMEIDA, E.A. 2013. Biochemical biomarkers in *Scinax fuscovarius* tadpoles exposed to a comercial formulation of the pesticide fipronil. *Marine Environmental Research* 1-7.
- MAZZATORTA, P.; BENFENATI, E.; NEAGU, D.; GINI, G. 2002. The importance of scaling in data mining for toxicity prediction. *J. Chem. Inf. Model.* 42, 1250–1255.
- MCGRAW, K.J. 2005. The antioxidant function of many animal pigments: are there consistent health benefits of sexually selected colourants? *Review Animal Behavior* 69: 757-764
- MELA, M.; GUILOSKI, I.C.; DORIA, H.B.; RANDI, M.A.F.; DE OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; PEREIRA, L.; MARASCHI, A.C.; PRODOCIMO, V.; FREIRE, C.A.; SILVA DE ASSIS, H.C. 2003. Effects of the herbicide atrazina in neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 93: 13 – 21.
- MIAUD, C., OROMÍ, N., NAVARRO, S., SANUY, D. 2011. Intra-specific variation in nitrate tolerance in tadpoles of the Natterjack toad. *Ecotoxicology* 20(6): 1176-1183.

- MOLA, L.; SABATINI, M.A.; FRATELLO, B.; BERTOLANI, R. 1987. Effects of atrazine in two species of Collembola (Onychiuridae) in laboratory tests. *Pedobiologia*, 30: 145-149.
- MORESCO, R.M.; OLIVEIRA, C. 2009. A comparative study of the extracutaneous pigmentary system in three anuran amphibian species evaluated during the breeding season. *South American Journal of Herpetology* 4(1): 1-8.
- NATALE, G.S; AMMASSARI, L.L; BASSO, N.G; RONCO, A.E. 2006. Acute and chronic effects of Cr (VI) on *Hypsiboas pulchellus* embryos and tadpoles. *Dis Aquat Org.* 72: 261-267.
- NIEVES-PUIGDOLLER, K.; BJÖRNSSON, B.T.; MCCORMICK, S.D. 2007. Effects of hexazinone and atrazine on the physiology and endocrinology of smolt development in Atlantic salmon. *Aquatic Toxicology* 84: 27–37.
- NIKOLOFF, N.; NATALE, G.S.; MARINO, D.; SOLONESKI, S.; LARRAMENDY, M., 2014. Flurochloridone-based herbicides induced genotoxicity effects on *Rhinella arenarum* tadpoles (Anura: Bufonidae). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 100: 275–281.
- OLIVEIRA, C.; ZIERI, R. 2005. Pigmentação testicular em *Physalaemus nattereri* (Steindachner) (Amphibia, Anura) com observações anatômicas sobre o sistema pigmentar extracutâneo. *Revista Brasileira de Zoologia* 22(2): 454-460
- OLIVEIRA, C., ZANETONI, C., ZIERI, R. 2002. Morphological observations on the testes of *Physalaemus cuvieri* (Amphibia, Anura). *Revista Chilena de Anatomia* 20(3): 263-268.
- OLIVEIRA, C.; SANTANNA, A.C.; OMENA, P.M.; SANTOS, L.R.S.; ZIERI, R. 2003. Morphological considerations on the seminiferous structures and testes

of anuran amphibians: *Bufo crucifer*, *Physalaemus cuvieri* and *Scinax fuscovarius*. *Biociências*. 11(1): 39-46.

- OLIVEIRA, C.; SANTOS, L.R.S.; ZIERI, R. 2007. Variações anatômicas no aparelho reprodutor masculino de *Chaunus ornatus* (Wied-Neuwied, 1821) (Anura, Bufonidae). *Biota Neotropica* 7(1): 43-48.
- OUELLET, M., BONIN, J., RODRIGUE, J., DESGRANGES, J., LAIR, S. 1997. Hindlimb deformities (ectromelia, ectrodactyly) in free-living anurans from agricultural habitats. *Journal of Wildlife Disease* 33(1): 95-104.
- PESTICIDE ACTION NETWORK UK. 2009. The List of Lists: A catalogue of lists of pesticides identifying those associated with particularly harmful health or environmental impacts. 3rd edition. http://www.pan-uk.org/attachments/077_List%20of%20Lists_2009.pdf
- PEDERZOLI, A.; TREVISAN, P. 1990. Pigmentary system of the adult alpine *Salamander atra aurorae*. *Pigment Cell Res* 3: 80–89.
- PELTZER, P.M., LAJMANOVICH, R.C., SANCHEZ, L.C., ATTADEMO, A.M., JUNGES, C.M., BIONDA, C.L. MARTINO, A.L., BASSÓ, A. 2011. Morphological abnormalities in amphibian populations from the Mid-eastern region of Argentina. *Herpetological Conservation and Biology* 6 (3): 432–442.
- PELTZER, P.M.; JUNGES, C.M.; ATTADEMO, A.M.; BASSÓ, A.; GRENÓN, P.; LAJMANOVICH, R.C. 2013. Cholinesterase activities and behavioral changes in *Hypsiboas pulchellus* (Anura: Hylidae) tadpoles exposed to glufosinate ammonium herbicide. *Ecotoxicology* 22: 1165–1173.
- PÉREZ-IGLESIAS, J.M., RUIZ DE ARCAUTE, C.; NIKOLOFF, N.; DURY, L.; SOLONESKI, S.; NATALE, G.S.; LARRAMENDY, M.L. 2014. The genotoxic effects of the imidacloprid-based insecticide formulation Glacoxan

Imida on Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae).
Ecotoxicology and Environmental Safety 104: 120-126.

- PICKFORD, G.W. 1953. Fish endocrinology. A study of the hypophysectomized male killifish, *Fundulus heteroclitus* (L.). Bull. Bingham Oceanogr. Coll. 14: 5–41.
- PIHA H., PEKKONEN, M., MERILÄ, J. 2006. Morphological abnormalities in amphibians in agricultural habitats: A case study of the common frog *Rana temporaria*. Copeia 4: 810–817.
- POUGH, F.H.; JANIS, C.M.; HEISER, J.B. 2008. A vida dos vertebrados. 4 ed.. Atheneu, São Paulo. 699p.
- PRELOVISEK, P.; BULOG, B. 2003. Biogenesis of melanosomes in kupffer cells of *Proteus anguinus* (Urodela, Amphibia). Pigment Cell Research. 16: 345-350.
- PROVETE, D.B.; FRANCO-BELUSSI, L.F.; SANTOS, L.R.S.; ZIERI, R.; MORESCO, R.M.; MARTINS, I.A.; DE ALMEIDA, S.C.; OLIVEIRA, C. 2012. Phylogenetic signal and variation of visceral pigmentation in eight anuran families. Zoologica Scripta 41 (6): 547-556.
- RABB, G.B. 1990. Declining amphibian population. Species. (13-14): 33-34.
- RELYEA, R.A.; DIECKS, N. 2008. An unforeseen chain of events: lethal effects of pesticides on frogs at sublethal concentrations. Ecol Appl.18(7): 1728-1742.
- RELYEA, R.A., SCHOEPNER, N.M.; HOVERMAN, J.T. 2005. Pesticides and amphibians: the importance of community context. Ecol. Appl. 15:1125-1134.

- ROBERTS, R.J. 1975. Melanin-containing cells of teleost fish and their relation to disease. *In*: Ribelin WR, Mikagi G. *Anatomic Pathology of Teleost Fish*. Madison: University of Wisconsin press. 339-342 p.
- ROSSA-FERES, D.C.; NOMURA, F. 2006. Caracterização e chave taxonômica para girinos (Amphibia: Anura) da região noroeste do estado de São Paulo, Brasil. *Biota Neotrop.* 5(2): <http://www.biotaneotropica.org.br/v6n1/pt/abstract?identification-key+bn00706012006>.
- ROHR, J.R.; CRUMRINE, P.W. 2005. Effects of an herbicide and an insecticide on pond community structure and processes. *Ecological Applications* 15(4): 1135–1147.
- RUDOLF, D.; GOSS, M.J. 1993. Ontario Farm Groundwater Quality Survey— Summer 1992. Guelph, Ontario, CN: Agriculture Canada, Agri-Food Development Branch.
- RUIZ-ARCAUTE, C.; COSTA, C.S.; DEMETRIO, P.M.; NATALE, G.S.; RONCO, A.E. 2012. Influence of existing site contamination on sensitivity of *Rhinella fernandezae* (Anura, Bufonidae) tadpoles to Lorsban® 48E formulation of chlorpyrifos. *Ecotoxicology*. 21(8):2338-2348.
- RUND, C.R.; CHRISTIANSEN, J.L.; JOHNSON, J.C. 1998. In vitro culture of melanomacrophages from the spleen and liver of turtles: comments on melanomacrophage morphology. *Pigment Cell Res* 11: 114–119.
- SANTOS, L.R.S.; FRANCO-BELUSSI, L.F.; ZIERI, R., BORGES, R.E.; OLIVEIRA, C. 2014. Effects of Thermal Stress on Hepatic Melanomacrophages of *Eupemphix nattereri* (Anura). *The Anatomical Record* 297 (5): 864–875.

- SICHEL, G.; SCALIA, M.; MONDIO, F.; CORSARO, C. 1997. The amphibian Kupffer cells build and demolish melanosomes: an ultrastructural point of view. *Pigment Cell Research*. 10: 271-287.
- SIMIONI, F.; DA SILVA, D.F.N.; MOTT, T. 2013. Toxicity of Glyphosate on *Physalaemus albonotatus* (Steindachner, 1864) from Western Brazil. *Ecotoxicol. Environ. Contam.* 8: 55-58.
- SOLOMON, K.R.; BAKER, D.B.; DIXON, K.R.; GIDDINGS, J.M.; GIESY, J.P.; HALL, L.W.JR.; KLAINE, S.J.; LA POINT, T.W.; RICHARDS, R.P.; WEISSKOPF, C.P.; WILLIAMS, W.M.; KENDALL, R. J. 1995. Ecological Risk Assessment of Atrazine in North American Surface Waters. Rep. of the Atrazine Ecol. Risk Assess. Panel Ciba Crop Prot., Greensboro, NC 234 p.
- SOLOMON, K.; BAKER, D.; RICHARDS, R.; DIXON, K.; KLAINE, S.; LAPOINT, T. 1996. Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters. *Environ Toxicol Chem.* 15: 31–76.
- SPARLING, D.W.; FELLERS, G.M. 2009. Toxicity of two insecticides to California, USA, anurans and its relevance to declining amphibian populations. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28 (8): 1696–1703.
- SPARLING, D.W.; FELLERS, G.M.; MCCONNELL, L.L. 2001. Pesticides and amphibian population declines in California, USA. *Environ. Toxicol. Chem.* 20(7):1591-1595.
- SPARLING, D. W; LINDER, G.; BISHOP, C. A.; KREST S. K. 2010. *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles*. CRC Press. SETAC Books. Second Edition. pp. 916.
- STEBBINS, R.C., COHEN, N.W. 1995. *A Natural History of Amphibians*. Princeton Univ. Press, Princeton, New Jersey. pp.368

- STEINBERG, C.E.W; LORENZ, R.; SPIESER, O.H. 1995. Effects of atrazine on swimming behavior of zebrafish, *Brachydanio rerio*. Water Research 29 (3) 981-985.
- SUBAGJA, J.; SNIDER, R.J. 1981. The side effects of the herbicides atrazine and paraquat upon *Folsomia candida* and *Tullbergia granulata* (Insecta: Collembola). Pedobiologia 22, 141-152.
- SVARTZ, G.V.; HERKOVITS, J.; PÉREZ-COLL, C. 2012. Sublethal effects of atrazine on embryo-larval development of *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae). Ecotoxicology 21:1251-1259.
- TREVISAN, P.; PEDERZOLI, A.; BAROZZI, G. 1991. Pigmentary system of the adults alpine salamander *Salamandra atra atra*. Pigment Cell Res 4: 151-157.
- TOLEDO, L.F., ZINA, J.; HADDAD, C.F.B. 2003. Temporal and Spatial Distribution in an Anuran Community in Municipality of Rio Claro, São Paulo, Brazil. Holos Environ. 3(2):136-149.
- USEPA. 1975. Methods for acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates, and amphibians, USEPA, 660/3-75-009 62.
- VASCONCELOS, T.S.; ROSSA-FERES, D.C. 2005. Diversidade, distribuição espacial e temporal de anfíbios anuros (Amphibia, Anura) na região noroeste do estado de São Paulo. Biota Neotrop. 5(2): <http://www.biotaneotropica.org.br/v5n2/pt/abstract?article+BN01705022005>
- VENTURINO, A.; ROSENBAUM, E.; CABALLERO DE CASTRO, A.; ANGUIANO, O.L.; GAUNA, L.; FONOVICH DE SCHROEDER, T.; PECHEN D'ANGELO, A.M. 2003. Biomarkers of effect in toads and frogs. Biomarkers 8 (3-4):167-186.

- VITT, L.J.; CALDWELL, J.P.; WILBUR, H.M.; SMITH, D.C. 1990. Amphibians as Harbingers of Decay. *Bioscience*. 40: 418.
- WALKER, C.H.; HOPKIN, S.P.; SIBLY, R.M.; PEAKALL, D. B. 2006. *Principles of Ecotoxicology*. Taylor & Francis, London. Third Edition. pp. 315.
- WEYGOLDT, P. 1989. Changes in the composition of mountain stream frog communities in the Atlantic mountains of Brazil: Frogs as indicators of environmental deteriorations? *Stud. Neotrop. Fauna Env.* 243: 249–255.
- WHITFIELD, J. 2001. Vital signs. *Nature* 411: 989 – 990.
- WHO 2002. *The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to the Classification 2000–2002*. World Health Organization, Geneva, pp. 1–58.
- YOUNG, B.E.; LIPS, K.R.; REASER, J.K.; IBAÑEZ, R.; SALAS, A.W.; CEDEÑO, J.R.; COLOMA, L.A.; RON, S.; LA MARCA, E.; MEYER, J.R.; MUÑOZ, A.; BOLANOS, F.; CHAVES, G.; ROMO, D. 2001. Population declines and priorities for amphibian conservation in Latin America. *Conserv. Biol.* 15: 1213–1223.
- ZAR, J.H. 1999. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, New Jersey.
- ZIERI, R.; TABOGA S.R.; OLIVEIRA C. 2007. Melanocytes in the Testes of *Eupemphix nattereri* (Anura, Leiuperidae): Histological, Stereological, and Ultrastructural Aspects. *The Anatomical Record* 290: 795–800.
- ZUASTI, A.; JARA, J.R.; FERRER, C.; SOLANO, F. 1989. Occurrence of melanin granules and melanosynthesis in the kidney of *Sparus auratus*. *Pigm. Cell Res.* 2: 93–100.

- ZUASTI, A.; FERRER, C.; AROCA, P.; SOLANO, F. 1990. Distribution of extracutaneous melanin pigment in *Sparus auratus*, *Mugil cephalus*, and *Dicentrarchus labrax* (Pisces, Teleostei). *Pigm. Cell Res.* 3: 126–131.
- ZUASTI, A.; JIMÉNEZ-CERVANTES, C.; GARCÍA-BORRÓN, J.C; FERRER, C. 1998. The melanogenic system of *Xenopus laevis*. *Archives of Histology and Cytology* 61(4): 305-316.