

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 04/11/2023.

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – RIO
CLARO



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA, EVOLUÇÃO E
BIODIVERSIDADE

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

JULIANA DOS SANTOS MENDONÇA

Rio Claro – SP
2021

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA, EVOLUÇÃO E
BIODIVERSIDADE

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

JULIANA DOS SANTOS MENDONÇA

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

Orientador: Prof. Dr. Denis Otavio Vieira de Andrade

Coorientador: Prof. Dr. André Luiz Quagliatto Santos

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

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

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

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

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

AUTORA: JULIANA DOS SANTOS MENDONÇA

ORIENTADOR: DENIS OTAVIO VIEIRA DE ANDRADE

COORIENTADOR: ANDRÉ LUIZ QUAGLIATTO SANTOS

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



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

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

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

Rio Claro, 04 de novembro de 2021

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus pela determinação, fé e perseverança.

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

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

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

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

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

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

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

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

Obrigada!

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

Resumo

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

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

Abstract

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

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

Lista de Figuras

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

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

Figura 3-5: Retardo no desenvolvimento ósseo de *Podocnemis expansa* expostos ao glifosato e fipronil durante incubação artificial, diafanizados por KOH e corados de vermelho de alizarina (ossos). (A, B e C) Indivíduos Controle; (D, E e F) Indivíduos Tratados. (D) Ossificação nos ossos do crânio com a presença da fontanela (seta) no embrião do grupo tratado exposto ao glifosato 6500µg/L associado ao fipronil 400µg/L; (E) Membros torácicos esquerdos com destaque para os ossos do carpo ainda em início de desenvolvimento (seta) em grupo exposto ao fipronil 4µg/L. (F) Membros pelvicos direitos com destaque para os ossos do tarso em estágio retardatário de desenvolvimento (seta) em grupo exposto ao glifosato 6500µg/L associado ao fipronil 400µg/L. Escala 5mm. 58

Figura 3-6: Ossículos esclerais de embriões de *Podocnemis expansa* expostos a agrotóxicos durante incubação artificial. Análise macroscópica. (A) Grupo controle; (B) e (C) Grupo glifosato 65µg/L e 6500µg/L, respectivamente; (D) Grupo fipronil 4µg/L; (E) e (F) Grupo fipronil 400µg/L; (G) e (H) Grupo glifosato 65µg/L associado ao fipronil 4µg/L; e (I) Grupo glifosato 6500µg/L associado ao fipronil 400µg/L. Observa-se a presença de: ov – sobreposição de ossículos (A); r - ossículos rudimentares (B, C, D); ao - ausência de ossificação (D e F); fo - fusão dos ossículos (E); is - formato irregular (G, H e I). Escala 1mm. 61

Figura 3-7: Cortes histológicos da esclera de embriões de *Podocnemis expansa* expostos a agrotóxicos durante incubação. (A) Grupo controle; (B) Grupo glifosato 65µg/L; (C) Grupo glifosato 6500µg/L (D) Grupo fipronil 4µg/L; (E) Grupo fipronil 400µg/L. As setas apontam para malformações. Observa-se a presença de: os – ossículos (A e B), ov - sobreposição de 62

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

- Figura 5-1: Anormalidades nucleares eritrocitárias identificadas em neonatos *P. expansa* expostos ou não ao glifosato e fipronil, isoladamente ou em combinação, em incubação artificial. A- Fotomicrografia representativa dos eritrócitos; B- Eritrócito normal; C- Núcleo com brotamento; D- Eritrócito binucleado; E- Núcleo reniforme; F- Constrição simétrica; G- Constrição assimétrica; H- Núcleo multilobado; I- Núcleo deslocado; J- Núcleo entalhado; K- Núcleo deslocado; L- Eritrócito micronucleado. Escala: 60µm. 88
- Figura 5-2: Frequência total de anormalidades nucleares eritrocitárias em neonatos de *Podocnemis expansa* expostos ou não ao glifosato e fipronil, isoladamente ou em combinação, em incubação artificial. As barras indicam a média + erro padrão. Os tratamentos com letras distintas diferem significativamente a nível de 5% pelo teste de Kruskal-Wallis com comparações entre duas amostras utilizando o teste de Mann-Whitney. Tratamentos: G1- glifosato 65µg/L; G2- glifosato 6500µg/L; F1- fipronil 4µg/L; F2- fipronil 400µg/L; GF1- glifosato 65µg/L associado ao fipronil 4µg/L; GF2- glifosato 6500µg/L associado ao fipronil 400µg/L. 89
- Figura 5-3: Alterações estruturais teciduais em fígado de neonatos de *Podocnemis expansa* expostos ou não ao glifosato e fipronil, isoladamente ou em combinação, em incubação artificial. De acordo com a histopatologia no tecido, foi categorizado quatro estágios de alterações: tecidos sem alteração (1), alteração discreta (2), alteração moderada (3) e alteração acentuada (4). As barras indicam a média + erro padrão. Os tratamentos com letras distintas diferem significativamente a 0,05 pelos testes de Kruskal-Wallis e Dunn. Tratamentos: G1- glifosato 65µg/L; G2- glifosato 6500µg/L; F1- fipronil 4µg/L; F2- fipronil 400µg/L; GF1- glifosato 65µg/L associado ao fipronil 4µg/L; GF2- glifosato 6500µg/L associado ao fipronil 400µg/L. 90
- Figura 5-4: Alterações histológicas em fígado de neonatos de *Podocnemis expansa* expostos ou não ao glifosato e fipronil, isoladamente ou em combinação, em incubação artificial. (A) e (B) - Congestão nos vasos (setas) no grupo F2 (fipronil 400µg/L) e GF1(glifosato 65µg/L associado ao fipronil 91

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

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

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

Lista de Tabelas

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

Lista de abreviaturas

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

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

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

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

Sumário

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

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

Capítulo 1 - Introdução Geral

1.1. Agrotóxicos

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

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

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

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

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

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

1.1.1. Glifosato

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

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

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

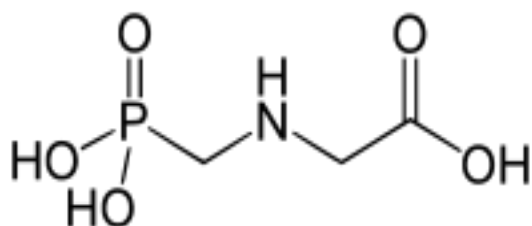


Figura 1-1: Fórmula estrutural do Glifosato. Fonte: ANVISA.

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

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

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

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

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

1.1.2. Fipronil

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

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

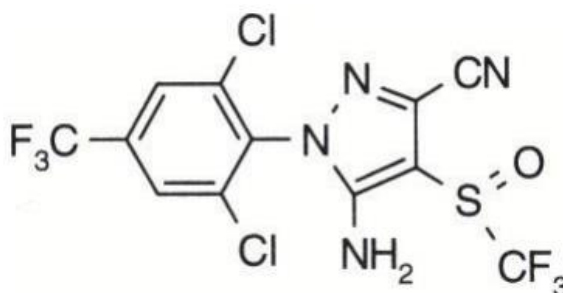


Figura 1-2: Forma estrutural do Fipronil. Fonte: ANVISA.

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

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

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

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

1.2. Ecotoxicologia

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

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

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

1.2.1. Ecotoxicologia em Répteis

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.3. *Podocnemis expansa*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.4. Biomarcadores

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.5. Objetivos Gerais

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

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

1.6. Hipótese

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

1.7. Referências

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- CARNEIRO, I.V.; VIEIRA, L.G.; MENDONÇA, J.M.; HIRANO, L.Q.L.; VALDES, S.A.C.; MENEZES - REIS, L.T.; SANTOS, A.Q. Development of scleral ossicles in *Podocnemis expansa* (Testudines: Podocnemididae) embryos exposed to atrazine. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 14, p. 1-6. 2019.
- CARPENTER, J.K.; MONKS, J.M.; NELSON, N. The effect of two glyphosate formulations on a small, diurnal lizard (*Oligosoma polychroma*). **Ecotoxicology**, v. 25, p. 548–554, 2016.
- CARVALHO, A.V.; LOPES, T.K.M.; MALVASIO, A. importância social de *Podocnemis expansa*, tartaruga-da-amazônia, no rio Javaés, Tocantins, Brasil, Amazônica. **Revista de Antropologia**. v.12, n. 2. p.609 – 620, 2020.
- CASTRO, B.B.; SOBRAL, O.; GUILHERMINO, L.; RIBEIRO, R. An in situ bioassay integrating individual and biochemical responses using small fish species. **Ecotoxicology**, v.13, p. 667-681, 2004.
- CHAGURI, J.L. **Efeitos da exposição ao pesticida fipronil nas alterações pressóricas em ratos acordados**. 49p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia e Biotecnologia) - Instituto de Biociências, Unesp, Campus de Botucatu, São Paulo, 2016.
- CHANG, J., LI, J.; WANG, H.; WANG, Y.; GUO, B.; YIN, J.; HAO, W.; LI, W.; LI, J.; XU, P. Tissue distribution, metabolism and hepatic tissue injury in Chinese lizards (*Eremias argus*) after a single oral administration of lambda-cyhalothrin. **Environ. Pollut.** v.218, p.965–972, 2016.
- CHAULET, F.C.; BARCELLOS, H.H.A.; FIOR, D.; POMPERMAIER, A.; KOAKOSKI, G.; ROSA, J.G.S.; FAGUNDES, M.; BARCELLOS, L.J.G. Glyphosate- and Fipronil-Based Agrochemicals and Their Mixtures Change Zebrafish Behavior. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.77, n.3, p.443-451, 2019.
- CHEN, L.; WANG, D.; ZHOU, Z.; DIAO, J. Comparing alpha-cypermethrin induced dose/gender-dependent responses of lizards in hepatotoxicity and nephrotoxicity in a food chain. **Chemosphere**, v.256, 127069, 2020.
- CITES - CONVENTION ON INTERNATIONAL TRADE IN ENDANGERED SPECIES OF WILD FAUNA AND FLORA. Appendices I, II and III. 2017. Disponível em <<https://cites.org/eng>>. Acesso em: 20 setembro 2021.
- COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v.31, n.7, p.1820-1830, 2008.
- COSTA, H. C.; BÉRNIL, S. R. S. Répteis do Brasil e suas Unidades Federativas: Lista de espécies. **Herpetologia Brasileira**, v.7, n.1, p.11-57, 2018.
- CONNELLY, P. Environmental Fate of Fipronil. **Calif. Environ. Protec. Ag.** California, EUA, 2001.
- COX, N.A., TEMPLE, H.J. **European Red List of Reptiles**. IUCN - International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, Gland, Luxembourg. 2009.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- GRANZOTO, M.R. **Toxicidade do fipronil sobre *Enchytraeus crypticus* em solo natural tropical: teste multigeracional**. 69p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia na área Ambiente) - Faculdade de Tecnologia da Universidade Estadual de Campinas, Limeira, São Paulo, 2018.
- GUNASEKARA, A. S.; TRUONG, T.; GOH, K. S.; SPURLOCK, F.; TJEERDEMA, R. S. Environmental fate and toxicology of Fipronil. **J. Pest. Sci.** v.32, n.3, p.189-199, 2007.
- GUPTA, R. C. Chapter 1: Introduction. In: Gupta. R. C. (Ed.). **Biomarkers in Toxicology**. Kentucky, USA, Elsevier, p. 3-5, 2014.
- HALL, R. J. Effects of environmental contaminants on reptiles: a review, Washington DC, US Fish and Wildlife Service, Spec. **Sci. Rept. Wildl.**, v.1, n.128, 1980.
- HANSON, N.; LARSSON, Å. Biomarker analyses in caged and wild fish suggest exposure to pollutants in an urban area with a landfill. **Environmental Toxicology**, v.26, p.315-324, 2011.
- HARTLEY, W. R.; WHITE, L.E.; THIYAGARAJAH, A.; MENDLER, J.M.; GEORGE, W.J. History and risk assessment of triazine herbicides in the lower Mississippi River. In: JOHNSTON, J. J. **Pesticides and Wildlife**. Washington, DC: American Chemical Society, p.225-239, 2001.
- HAYES-JR, W. H. Introduction. In: LAWS JR., E. R. **Handbook of pesticide toxicology**. California: Academic Press, Inc. v.1, n.3, p. 1-37, 1991.
- HELFRICH, L.A.; WEIGMANN, D.L.; HIPKINS, P.; STINSON, E.R. **Pesticides and aquatic animals: a guide to reducing impacts on aquatic systems**. 1996. Disponível em: <www.ext.vt.edu/pubs/waterquality/420-013/420-013.pdf>. Acesso em 20 de setembro 2021.
- HÉRITIER, L.; DUVAL, D.; GALINIER, R.; MEISTERTZHEIM, A.L.; VERNEAU, O. Oxidative stress induced by glyphosate-based herbicide on freshwater turtles. **Environ. Toxicol. Chem.** v.36, p.3343–3350, 2017.
- HIRANO, L.Q.L.; ALVES, L.S.; MENEZES-REIS, L.T.; MENDONÇA, J.S.; SIMÕES, K.; SANTOS, A.L.Q.; VIEIRA, L.G. Effects of egg exposure to atrazine and/or glyphosate on boné development in *Podocnemis unifilis* (Testudines, Podocnemididae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.182, 109400, 2019.
- HOPKINS, W.A., Reptile toxicology: challenges and opportunities on the last frontier in vertebrate ecotoxicology, **Environ. Toxicol. Chem.**, v.19, n.2391, 2000.
- HOPKINS, W.A.; WINNE, C.T., Influence of body size on swimming performance of four species of neonatal natricine snakes acutely exposed to a cholinesterase inhibiting pesticide. **Environ. Toxicol. Chem.** v.25, 1208, 2006.
- HUEY, R.B. Temperature, physiology, and the ecology of reptiles. In: GANS, C., POUGH, F.H. (Eds.), **Biology of the Reptilia**. Academic Press, New York, p. 25–91, 1982.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- MILLER, T.H.; NG, K. T.; BURY, S.T.; BURY, S.E.; BURY, N.R.; BARRON, L.P. Biomonitoring of pesticides, pharmaceuticals and illicit drugs in a freshwater invertebrate to estimate toxic or effect pressure. **Environment International**, v.129, p.595-606, 2019.
- MINGO, V.; LEEB, C.; FAHL, A.K.; LÖTTTERS, S.; BRÜHL, C.; WAGNER, N. Validating buccal swabbing as a minimal-invasive method to detect pesticide exposure in squamate reptiles. **Chemosphere**, v.229, p.529-537, 2019.
- MINGO, V.; LÖTTTERS, S.; WAGNER, N. The impact of land use intensity and associated pesticide applications on fitness and enzymatic activity in reptiles - A field study. **Environment International**, v.124, p.284-293, 2017.
- MLADINIC, M.; BEREND, S.; VRDOLJAK, A. L.; KOPJAR, N.; RADIC, B.; ZELJEZIC, D. Evaluation of genome damage and its relation to oxidative stress induced by glyphosate in human lymphocytes in vitro. **Environmental and molecular mutagenesis**, New York, v.50, n.9, p.800-807, 2009.
- MOZETO, A. A; ZAGATTO, P. A. Ecotoxicologia aquática - Princípios e Aplicações. In ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Introdução de agentes químicos no ambiente**. São Carlos: Rima Editora. p.15-38. 2006.
- NIELSEN, J. B.; NIELSEN, F.; SORENSEN, J. A. Defense against dermal exposures is only skin deep: significantly increased penetration through slightly damaged skin. **Archives of dermatological research**, Berlin, v.299, n.9, p.423-431. 2007.
- OLIVEIRA, A.B.; HENRIQUES, M. **Guia dos produtos fitofarmacêuticos**. Lista dos produtos com venda autorizada. MADRP. DGADR, 2011.
- OLIVEIRA, P.R.; BECHARA, G.H.; DENARDI, S.E.; OLIVEIRA, R.J.; MATHIAS, M.I.C. Genotoxic and mutagenic effects of fipronil on mice. **Exp Toxicol Pathol**. v.64, n.6, p.569-573, 2012.
- PARK, H.; LEE, J.Y.; PARK, S.; SONG, G.; LIM, W. Developmental toxicity of fipronil in early development of zebrafish (*Danio rerio*) larvae: disrupted vascular formation with angiogenic failure and inhibited neurogenesis. **Journal of Hazardous Materials**, v.385, 121531, 2020.
- PEVELING, R.; DEMBA, S. A. Toxicity and pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (Deuteromycotina, Hyphomycetes) and fipronil to the fringe-toed lizard *Acanthodactylus dumerili* (Squamata: Lacertidae). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.22, n.7, p.1437-1447, 2003.
- POCHINI, K.M.; HOVERMAN, J.T. Reciprocal effects of pesticides and pathogens on amphibian hosts: The importance of exposure order and timing. **Environ Poll**. v.221, p.359-366, 2017.
- PORTELLI, M. J.; BISHOP, C. A. **Ecotoxicology of organic contaminants in reptiles: a review of the concentrations and effects of organic contaminants in reptiles**. In: Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles, Sparling, D.W., LINDER, G.; BISHOP, C. A., Eds., SETAC Press, Pensacola, FL, p. 495-544, 2000.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

6. Considerações finais

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

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

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

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

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

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