



UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL

CAMPUS ERECHIM

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL

NATANI MACAGNAN

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS LETAIS E SUBLETAIS DOS INSETICIDAS
CIPERMETRINA E FIPRONIL EM GIRINOS DE *PHYSALAEMUS GRACILIS*
(ANURA: LEPTODACTYLIDAE)**

ERECHIM

2018

NATANI MACAGNAN

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS LETAIS E SUBLETAIS DOS INSETICIDAS
CIPERMETRINA E FIPRONIL EM GIRINOS DE *PHYSALAEMUS GRACILIS*
(ANURA: LEPTODACTYLIDAE)**

Dissertação de mestrado, apresentada para o Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Fronteira Sul, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental.

Orientador(a): Marília Teresinha Hartmann

Coorientador: Paulo Afonso Hartmann

ERECHIM

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL

CAMPUS ERECHIM ERS 135 – Km 72, nº 200

CEP: 99700-970

Caixa Postal 764

Erechim – RS

Brasil

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Macagnan, Natani

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS LETAIS E SUBLETAIS DOS
INSETICIDAS CIPERMETRINA E FIPRONIL EM GIRINOS DE
PHYSALAEMUS GRACILIS (ANURA: LEPTODACTYLIDAE) / Natani
Macagnan. -- 2019.

88 f.:il.

Orientadora: Doutora em Ciências Biológicas
(Zoologia) Marília Teresinha Hartmann.

Co-orientador: Doutor em Ciências Biológicas
(Zoologia) Paulo Afonso Hartmann.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da
Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia Ambiental-PPGCTA, Erechim, RS, 2019.

1. Genotoxicidade. 2. Anfíbios. 3. Agrotóxicos. 4.
Inseticidas. 5. Ecotoxicologia. I. Hartmann, Marília
Teresinha, orient. II. Hartmann, Paulo Afonso,
co-orient. III. Universidade Federal da Fronteira Sul.
IV. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

NATANI MACAGNAN

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS LETAIS E SUBLETAIS DOS INSETICIDAS
CIPERMETRINA E FIPRONIL EM GIRINOS DE *PHYSALAEMUS GRACILIS*
(ANURA: LEPTODACTYLIDAE)**

Dissertação de mestrado, apresentada para o Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Fronteira Sul, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental.

Esta dissertação de mestrado foi defendida e aprovada pela banca em:

_____/_____/_____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Marília Teresinha Hartmann
Universidade Federal da Fronteira Sul – *Campus* Erechim – PPGCTA

Prof. Dr. Paulo Afonso Hartmann
Universidade Federal da Fronteira Sul – *Campus* Erechim – PPGCTA

Profa. Dra. Cristiane Funghetto Fuzinato
Universidade Federal da Fronteira Sul – *Campus* Erechim

Prof. Dr. André Luís de Sá Salomão
Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter guiado meus passos e ter me dado a força necessária para chegar até aqui.

A minha família, a minha mãe Jorginha, meu pai Sergio e meu irmão Luan por me permitirem me dedicar ao mestrado. O apoio, amor e dedicação de vocês foi essencial para que eu concluísse mais esta etapa da minha vida. Obrigada por estarem sempre do meu lado em todos os momentos, felizes ou mais difíceis. Amo vocês!

Aos meus orientadores, prof^a Marília e prof Paulo por me acompanharem desde a graduação e me orientarem durante o mestrado. Agradeço em especial a prof^a Marília por dividir comigo as angústias e as vitórias desses dois anos de mestrado e estar sempre disposta a esclarecer dúvidas, auxiliar nos trabalhos e principalmente sempre me incentivando a melhorar como pessoa e como profissional.

Aos colegas do laboratório de Ecologia e Conservação, Alexandre e Vrandrieli pelo auxílio para realização desta pesquisa.

Agradeço em especial a Camila, que foi meu braço direito durante todo o mestrado, dividindo comigo as responsabilidades do laboratório, as dúvidas e angústias da pesquisa e também das aulas. Obrigada Camila por toda ajuda.

Aos técnicos de laboratório, Suzana, Ângela, Flávia, Izabele e Davison por estarem sempre dispostos a ajudar e a solucionar nossos problemas. Sem vocês não conseguiríamos concluir nossas pesquisas!

Aos professores do PPGCTA que se esforçam ao máximo para que o programa continue crescendo e se torne cada vez melhor.

Agradeço também as minhas colegas Suéllen e Marluci por tornarem esse período mais leve. Agradeço pelas conversas e pelas risadas. Vocês, juntamente com a Camila, são pessoas especiais que fiquei muito feliz em conhecer.

Aos meus amigos, que sempre me deram força para continuar. Obrigada por estarem sempre comigo e perdoarem minhas ausências.

Muito obrigada a todos, esse trabalho tem um pedaço de cada um de vocês!

RESUMO

Os agrotóxicos são transferidos e transportados no ambiente de diversas maneiras podendo atravessar diferentes compartimentos ambientais, atingindo o solo e principalmente a água. A presença de agrotóxicos no ambiente pode provocar efeitos deletérios em organismos não-alvo, como anfíbios, alterando a dinâmica das populações e desestruturando as comunidades. Declínios na população de anfíbios devido a presença de agrotóxicos foram registrados em todo o mundo e ameaçam o desenvolvimento das espécies e sua função dentro do ecossistema. Neste estudo, foram avaliados os efeitos letais e subletais de duas formulações comerciais de inseticidas muito usados na agricultura: cipermetrina e fipronil para *Physalaemus gracilis*. O ensaio agudo teve duração de 96 horas e o ensaio crônico teve duração de 7 dias. No ensaio crônico, efeitos de concentrações ambientalmente relevantes desses inseticidas ($\mu\text{g/L}$) foram avaliados sobre *P. gracilis*. A cipermetrina apresentou $\text{CL}_{50;96\text{h}}$ de 273,41 $\mu\text{g/L}$ para *P. gracilis*, indicando alta toxicidade aguda para a espécie. No ensaio crônico, a cipermetrina provocou um aumento na mortalidade que atingiu mais de 50% dos girinos na concentração de 20 $\mu\text{g/L}$. Provocou também um aumento na frequência de micronúcleos e de anormalidades nucleares de eritrócitos, atingindo 20% do total de células avaliadas na maior concentração (20 $\mu\text{g/L}$). O risco da cipermetrina para *P. gracilis* foi alto, indicando que concentrações já registradas na natureza podem provocar efeitos sérios a curto e longo prazo para a espécie. Já para o fipronil não foram verificados efeitos de toxicidade aguda. O fipronil não provocou alteração na atividade natatória e malformações na boca. No entanto, provocou malformações significativas no intestino. No teste de micronúcleo e de anormalidades nucleares, o fipronil também provocou um aumento na presença de micronúcleos e de anormalidades nucleares de eritrócitos, mostrando que tem potencial genotóxico para *P. gracilis*. Apesar disso, a formulação comercial avaliada para o fipronil apresentou baixo risco crônico para *P. gracilis*. Ao final deste estudo, os anfíbios provaram ser bioindicadores úteis e sugerimos que girinos de diferentes espécies podem ser usados para determinar os impactos ambientais dos agrotóxicos sobre ecossistemas aquáticos.

Palavras-chave: Agrotóxicos. Formulação comercial. Anfíbios. Genotoxicidade.

ABSTRACT

Agrochemicals are transferred and transported in the environment in several ways and can cross different environmental compartments, reaching the soil and especially water. The presence of pesticides in the environment can have deleterious effects on non-target organisms, such as amphibians, altering population dynamics and disrupting communities. Declines in the amphibian population due to the presence of pesticides have been recorded worldwide and threaten the development of species and their function within the ecosystem. In this study, the lethal and sublethal effects of two commercial formulations of insecticides widely used in agriculture were evaluated: cypermethrin and fipronil for *Physalaemus gracilis*. The acute assay lasted 96 hours and the chronic assay lasted 7 days. In the chronic trial, effects of environmentally relevant concentrations of these insecticides ($\mu\text{g.L}^{-1}$) were evaluated on *P. gracilis*. Cypermethrin showed $\text{LC}_{50;96\text{h}}$ of $273.41 \mu\text{g.L}^{-1}$ for *P. gracilis*, indicating high acute toxicity for the species. In the chronic study, cypermethrin caused an increase in mortality reaching more than 50% of tadpoles at a concentration of $20 \mu\text{g.L}^{-1}$. It also caused an increase in the frequency of micronuclei and nuclear erythrocyte abnormalities, reaching 20% of the total cells evaluated at the highest concentration ($20 \mu\text{g.L}^{-1}$). The risk of cypermethrin to *P. gracilis* was high, indicating that concentrations already recorded in nature may have serious short- and long-term effects on the species. Acute toxicity effects were not observed for fipronil. Fipronil did not cause changes in swimming activity and malformations in the mouth. However, it caused significant malformations in the gut. In the micronucleus test and nuclear erythrocyte abnormalities, fipronil also caused an increase in the presence of micronuclei and nuclear erythrocyte abnormalities, showing that it has genotoxic potential for *P. gracilis*. Despite this, the commercial formulation evaluated for fipronil presented a low chronic risk for *P. gracilis*. At the end of this study, amphibians proved to be useful bioindicators and we suggest that tadpoles of different species can be used to determine the environmental impacts of agrochemicals on aquatic ecosystems.

Keywords: Agrochemicals. Commercial formulation. Amphibians. Genotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: A - *Physalaemus gracilis* adulto. Foto: Gilcinéia dos Santos; B – Desovas de *P. gracilis* em ambiente natural; C – Girino de *P. gracilis*. Fonte: Elaborado pelo autor, 2018..30
- Figura 2: Mortalidade cumulativa (%) de girinos de *P. gracilis* expostos a diferentes concentrações da formulação comercial de cipermetrina durante o ensaio agudo. Fonte: Elaborado pelo autor, 2018..... 35
- Figura 3: Mortalidade cumulativa (%) de girinos de *P. gracilis* expostos a diferentes concentrações da formulação comercial de cipermetrina durante o ensaio crônico. Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.....36
- Figura 4: Micronúcleo e Anormalidades Nucleares de Eritrócitos encontradas em girinos de *P. gracilis* expostos a concentrações da formulação comercial de cipermetrina. (A) Células com núcleos normais, (B) Célula com Micronúcleo; (C) Células com Apoptose; (D) Célula Binucleada; (E) Célula com Bolha ou Broto Nuclear; (F) Células com Cariólise; (G) Célula Entalhada; (H) Células Lobadas; (I) Células com Microcitose; (J) Célula Vacuolizada. Fonte: Elaborado pelo autor, 2018..... 37
- Figura 5: Número de micronúcleos e ANE's encontrados no teste de micronúcleo, de acordo com cada concentração avaliada para a formulação comercial de cipermetrina em girinos de *P. gracilis*. Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.....38
- Figura 6: Micronúcleos e Anormalidades Nucleares de Eritrócitos em diferentes concentrações da formulação comercial de cipermetrina, em girinos de *P. gracilis*. Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.....40
- Figura 7: Frascos de vidro referentes ao ensaio agudo de *P. gracilis* expostos a formulação comercial do inseticida fipronil, com aeração artificial - Laboratório de Ecologia e Conservação da Universidade Federal Fronteira Sul, campus Erechim. Fonte: Elaborado pelo autor, 2018..... 61
- Figura 8: Frascos de vidro referentes ao ensaio crônico de *P. gracilis* expostos a formulação comercial do inseticida fipronil, com aeração artificial - Laboratório de Ecologia e Conservação da Universidade Federal Fronteira Sul, campus Erechim. Fonte: Elaborado pelo autor, 2018..... 62
- Figura 9: Girinos de *P. gracilis* que apresentaram malformação no intestino devido a exposição a formulação comercial de fipronil em um período de 7 dias. Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.....66

Figura 10: Número de micronúcleos e ANE's encontrados no teste de micronúcleo, de acordo com cada concentração avaliada para a formulação comercial de fipronil em girinos de <i>P. gracilis</i> . Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.	70
Figura 11: Micronúcleo e Anormalidades Nucleares de Eritrócitos encontradas em girinos de <i>P. gracilis</i> expostos a concentrações da formulação comercial de fipronil. (A) Célula com núcleos normal, (B) Célula com Micronúcleo; (C) Célula Anucleada; (D) Célula com Apoptose; (E) Célula Binucleada; (F) Célula com Bolha ou Broto Nuclear; (G) Célula Entalhada; (H) Células Lobadas; (I) Célula Vacuolizada. Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.	72
Figura 12: Micronúcleos e Anormalidades Nucleares de Eritrócitos em diferentes concentrações da formulação comercial de fipronil em girinos de <i>P. gracilis</i> . Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Número de girinos de <i>Physalaemus gracilis</i> mortos a cada 24 horas, durante o ensaio agudo expostos a diferentes concentrações da formulação comercial de cipermetrina e determinação da CL ₅₀	34
Tabela 2: Mortalidade de girinos de <i>P. gracilis</i> expostos a formulação comercial de cipermetrina no período de 7 dias.....	36
Tabela 3: Número de micronúcleos detectados em eritrócitos de <i>P. gracilis</i> expostos a formulação comercial do inseticida cipermetrina.....	37
Tabela 4: Anormalidades nucleares de eritrócitos (ANE's) encontradas no controle e nas concentrações para a formulação comercial de cipermetrina em girinos de <i>P. gracilis</i> . Média ± desvio padrão (mínimo e máximo).....	39
Tabela 5: Resultados da ANOVA e teste de Dunnett para cada anormalidade nuclear de eritrócitos em girinos de <i>P. gracilis</i> expostos a diferentes concentrações da formulação comercial de cipermetrina	40
Tabela 6: Valores de NOEC, LOEC, MATC e CHQ determinados para Micronúcleo e Anormalidades Nucleares de Eritrócitos calculados para girinos de <i>P. gracilis</i> submetidos a formulação comercial de cipermetrina.	41
Tabela 7: Concentração Letal Média (CL ₅₀) da cipermetrina paraa diferentes espécies de anfíbios anuros.....	42
Tabela 8: Número de girinos de <i>P. gracilis</i> mortos a cada 24 horas, durante o ensaio agudo expostos a diferentes concentrações da formulação comercial de fipronil	65
Tabela 9: Mortalidade de girinos de <i>P. gracilis</i> expostos a formulação comercial de fipronil no período de 7 dias.....	65
Tabela 10: Girinos de <i>P. gracilis</i> que apresentaram alterações na atividade natatória durante o tempo de exposição ao fipronil de 7 dias. Os padrões estabelecidos foram: (0) atividade natatória igual ao controle, (1) atividade natatória inferior ao controle, (2) atividade natatória maior que o controle, e (3) contrações espasmódicas.	66
Tabela 11: Malformações registradas em girinos de <i>P. gracilis</i> devido a exposição as diferentes concentrações de fipronil	66
Tabela 12: Girinos de <i>P. gracilis</i> com anormalidades no intestino devido a exposição a diferentes concentrações de fipronil em um período de 7 dias.	68
Tabela 13: Número de micronúcleos detectados em eritrócitos de <i>P. gracilis</i> expostos a formulação comercial do inseticida fipronil.....	69

Tabela 14: Anormalidades nucleares de eritrócitos (ANE's) encontradas no controle e nas concentrações para a formulação comercial de fipronil em girinos de <i>P. gracilis</i> . Média \pm desvio padrão (mínimo e máximo).....	71
Tabela 15: Resultados da ANOVA e teste de Dunnett para cada anormalidade nuclear de eritrócitos em girinos de <i>P. gracilis</i> expostos a diferentes concentrações da formulação comercial de fipronil.....	72
Tabela 16: Valores de NOEC, LOEC, MATC e CHQ determinados para Micronúcleo e Anormalidades Nucleares de Eritrócitos calculados para girinos de <i>P. gracilis</i> submetidos a formulação comercial de fipronil	74

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	13
2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
CAPÍTULO I – TOXICIDADE AGUDA E GENOTOXICIDADE DE UMA FORMULAÇÃO COMERCIAL DE CIPERMETRINA EM GIRINOS DE PHYSALAEMUS GRACILIS	24
1 INTRODUÇÃO	26
2 OBJETIVOS	29
2.1 OBJETIVO GERAL	29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 AGROTÓXICO	29
3.2 ORGANISMO-TESTE	30
3.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	31
3.3.1 Ensaio Agudo	31
3.3.2 Ensaio Crônico	31
3.3.3 Micronúcleo e Anormalidades Nucleares de Eritrócitos	32
3.3 ANÁLISE DE RISCO ECOLÓGICO	33
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
4 RESULTADOS	34
4.1 ENSAIO AGUDO	34
4.2 ENSAIO CRÔNICO	35
4.3 MICRONÚCLEO E ANORMALIDADES NUCLEARES DE ERITRÓCITOS	36
4.4 ANÁLISE DE RISCO ECOLÓGICO	41
5 DISCUSSÃO	41
6 CONCLUSÃO	45
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
CAPÍTULO II – O INSETICIDA FIPRONIL É TÓXICO PARA ANFÍBIOS? AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE UMA FORMULAÇÃO COMERCIAL DO INSETICIDA FIPRONIL EM GIRINOS DE PHYSALAEMUS GRACILIS	53
1 INTRODUÇÃO	55
2 OBJETIVOS	58
2.1 OBJETIVO GERAL	58
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	58
3 MATERIAIS E MÉTODOS	59
3.1 AGROTÓXICO	59
3.2 ORGANISMO-TESTE	59
3.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	60

3.3.1 Ensaio Agudo	60
3.3.2 Ensaio Crônico.....	61
3.3.3 Micronúcleo e Anormalidades Nucleares de Eritrócitos.....	62
3.4 ANÁLISE DE RISCO ECOLÓGICO	63
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	64
4 RESULTADOS	64
4.1 ENSAIO AGUDO	64
4.2 ENSAIO CRÔNICO	65
4.3 MICRONÚCLEO E ANORMALIDADES NUCLEARES DE ERITRÓCITOS	69
4.4 ANÁLISE DE RISCO ECOLÓGICO	73
5 DISCUSSÃO	74
6 CONCLUSÃO.....	77
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	85

1 INTRODUÇÃO GERAL

O atual modelo de produção agrícola do Brasil é dependente do uso em larga escala de agrotóxicos. Com cerca de 80 milhões de hectares de área plantada (safra 2017; IBGE, 2018) o Brasil está entre os maiores consumidores de agrotóxicos no mundo (MMA, 2018). Segundo o IBAMA (2018), foram vendidas 551.313,25 toneladas de ingrediente ativo em todo o país no ano de 2016, destas 35.284,58 toneladas se referem as vendas do estado do Rio Grande do Sul.

As possibilidades de interações dos agrotóxicos no ambiente são amplas, complexas e ainda carentes de compreensão. Os agrotóxicos podem atravessar diferentes compartimentos ambientais, acumular nos elementos dos ecossistemas e dispersar para além das áreas de aplicação (DOMINGUES, 2005). Podem atingir o solo e as águas, devido aos ventos e a chuva que promovem a deriva, lixiviação, erosão (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2018), volatilização e escoamento desses químicos (SPADOTTO *et al.*, 2004; BIANCHI; CABRAL-DE-MELLO; MARIN-MORALES, 2015). Uma única chuva pode provocar a perda de até 2% da dose aplicada de agrotóxico, que como consequência pode ser carregada para o ambiente aquático (BIANCHI; CABRAL-DE-MELLO; MARIN-MORALES, 2015).

A quantidade de agrotóxicos presentes na água tem aumentado devido ao uso inadequado e o descarte incorreto de embalagens de agrotóxicos (VASCONCELOS, 2014). O excesso de agrotóxico em relação a capacidade de assimilação pelo meio aquático (SPADOTTO *et al.*, 2004; MONTANHA *et al.*, 2012) pode alterar a sobrevivência, crescimento e reprodução da fauna aquática (MONTANHA *et al.*, 2012). Agrotóxicos podem penetrar em organismos aquáticos através de diferentes portas de entrada e seu grau de acumulação é dependente do tipo de cadeia alimentar, da disponibilidade e persistência do agrotóxico na água e de suas características físicas e químicas (AMÉRICO *et al.*, 2015).

O principal objetivo dos agrotóxicos é controlar ou eliminar insetos, microrganismos, animais ou plantas através de diversas reações bioquímicas. Essas reações bioquímicas não são exclusivas dos organismos alvo, fazendo com que nesse processo outros organismos não-alvo também sejam atingidos (SPADOTTO *et al.*, 2004). Os organismos podem acumular contaminantes através de processos como a bioconcentração, bioacumulação e biomagnificação (COSTA *et al.*, 2008). A absorção dos agrotóxicos pelos organismos pode gerar efeitos deletérios como alterações nas características e na dinâmica das populações (reprodução, migração e mortalidade), na estrutura e função comunidades (alteração na diversidade de espécies, modificações na relação predador-presa) (COSTA *et al.*, 2008; SILVA; CAMPOS;

BOHM, 2013) e na função do ecossistema (alterações nos processos de respiração e no fluxo de nutrientes) (COSTA *et al.*, 2008; SILVA; CAMPOS; BOHM, 2013).

Os anfíbios estão entre as formas de vida aquática que mais sofrem com a presença de agrotóxicos na água (VASCONCELOS, 2014). Segundo FROST (2018), 7.857 espécies de anfíbios são conhecidas em todo o mundo e cerca de 90% (6.929 espécies) são de anuros. De acordo com a *International Union for Conservation of Nature* (IUCN), em 2008, data da última avaliação realizada pelo órgão, das 6.260 espécies de anfíbios avaliadas, 32,4% estão extintas ou globalmente ameaçadas (IUCN, 2018).

Um sinergismo de fatores é responsável pelo declínio das espécies de anfíbios em todo o mundo (HAYES *et al.*, 2010). Junto com doenças emergentes, perda e alteração de habitat e espécies invasoras (WAKE; VREDENBURG, 2008; HOSKINS; BOONE, 2016), o uso crescente de agrotóxicos aparece como um dos fatores que implicam no declínio global dos anfíbios (BEEBEE, GRIFFITHS, 2005; JOHNSON; WELCH; WHITFIELD, 2013), tornando esse grupo de vertebrados o mais ameaçado do planeta (STUART *et al.*, 2004; HOSKINS; BOONE, 2016).

Declínios são ainda mais preocupantes quando ocorrem nas regiões de alta riqueza e endemismo de espécies do planeta. Este é o caso do Brasil, detentor absoluto do maior número de espécies de anfíbios, abrigando aproximadamente 17% da diversidade global, e o maior número de espécies endêmicas do mundo (TOLEDO *et al.* 2010; FROST, 2018). Segundo Segalla *et al.* (2016), até julho de 2016, foram registradas no Brasil 1.080 espécies de anfíbios, das quais 1.039 são anuros, 36 gymnophiona e 5 caudata. No Brasil, segundo avaliação do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) em 2014, através da publicação da Portaria nº 445 de 17 de dezembro de 2014, das 973 espécies de anfíbios avaliadas, 41 estão classificadas como ameaçadas de extinção (BRASIL, 2014).

Estudos envolvendo anfíbios são importantes para detectar espécies indicadoras de mudanças ambientais e sua sensibilidade pode explicar as causas dos declínios populacionais em todo o mundo (STUART *et al.*, 2004, GONÇALVES, 2015). Nos estudos de ecotoxicologia, organismos representativos do ambiente são expostos a várias concentrações de uma substância potencialmente tóxica a ser avaliada (COSTA *et al.*, 2008) e podem ser indicadoras do nível de contaminação ambiental e de modificações no ecossistema através de seu comportamento (COELHO, 2006). Desta forma, selecionam-se determinadas espécies, para que suas respostas fisiológicas e comportamentais sejam estudadas e relacionadas com a exposição direta dos organismos aos poluentes (COELHO, 2006). As respostas dos organismos podem ser

letalidade, carcinogênese, mutagênese, teratogênese, desordens comportamentais, efeitos fisiológicos cumulativos, antagonísticos e sinérgicos (RODRIGUES, 2007).

Os ensaios ecotoxicológicos consistem em fornecer informações relevantes e confiáveis sobre os efeitos de produtos químicos e biológicos sobre essas comunidades (ARCY; SILVA; CUNHA, 2014). Nos ensaios de ecotoxicologia aquática, é possível usar algas, protozoários, bactérias, peixes e invertebrados como organismos-teste (ARCY; SILVA; CUNHA, 2014). Geralmente são avaliados diferentes níveis tróficos, porque o comportamento das espécies é diferente com relação ao mesmo poluente e é necessário avaliar o organismo mais sensível para que seja possível, estimar com maior segurança os impactos de determinada substância tóxica (COELHO, 2006).

Estudos que exploram a resposta dos anfíbios a poluentes ambientais mostram que são altamente sensíveis e apropriados para realização de ensaios com produtos químicos (HERKOVITS; PEREZ-COLL; HERKOVITS, 2002; PALENSKE; NALLANI; DZIALOWSKI, 2010) devido ao seu ciclo de vida com desenvolvimento aquático e uma pele altamente permeável que permite absorver rapidamente substâncias tóxicas (HERKOVITS; PEREZ-COLL; HERKOVITS, 2002; MARQUES; GONÇALVES; PEREIRA, 2008; PALENSKE; NALLANI; DZIALOWSKI, 2010; MACAGNAN *et al.*, 2017; RUTKOSKI *et al.*, 2018; WRUBLESWSKI *et al.*, 2018).

As exposições às substâncias químicas são realizadas utilizando diferentes concentrações em períodos determinados de tempo (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008). Essa exposição pode ser aguda ou crônica, de acordo com sua duração e efeitos avaliados (RODRIGUES, 2007). O ensaio agudo avalia uma resposta severa e rápida do organismo-teste a um estímulo que se manifesta em curtos períodos de tempo em relação ao período de vida do organismo-teste, variando de 0 a 96 horas de exposição (ALMEIDA, 2004; MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008) e pode ser conduzido sob sistema estático, semi-estático ou de fluxo contínuo. Normalmente os efeitos observados neste ensaio são letalidade ou imobilidade, ou seja, determina-se a concentração do agente tóxico que causa 50% de letalidade (CL_{50}) ou imobilidade (CE_{50}) à espécie-teste (MASSARO, 2006).

Os testes crônicos são dependentes dos resultados obtidos nos testes de toxicidade aguda, uma vez que as concentrações subletais são calculadas a partir da CL_{50} (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008; MASSARO, 2006). O organismo-teste responde a estímulos que podem durar longos períodos, podendo afetar todo seu ciclo de vida. De um modo geral, as concentrações a que os organismos-teste são expostos são subletais, permitindo a sobrevivência do organismo (CASTRO, 2008). O período de realização do teste crônico varia de horas até

meses dependendo do organismo-teste utilizado e pode incluir estudos de ciclo de vida completo ou parcial (JARDIM, 2004; MASSARO, 2006). A exposição pode afetar suas funções biológicas, interferindo, por exemplo, na reprodução, desenvolvimento de ovos, crescimento, maturação e/ou comportamento em geral (CASTRO, 2008; MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008; RODRIGUES, 2007; JARDIM, 2004), além de alterações na fisiologia, bioquímica (JARDIM, 2004) e histologia (RODRIGUES, 2007). Nos anfíbios, os efeitos subletais incluem atraso do crescimento e desenvolvimento e potencial reprodutivo alterado (GIBBLE; BAER, 2011; BAKER; BANCROFT; GARCIA, 2013) além de perturbações endócrinas, alteração da função imunológica, alterações comportamentais e mortalidade (POCHINI; HOVERMAN, 2017).

A exposição crônica a contaminantes como produtos químicos pode ainda induzir efeitos genéticos como danos do DNA (ARCAUTE *et al.*, 2014). A presença de poluentes químicos pode provocar a formação de micronúcleos (FANALI *et al.*, 2018). O teste ou ensaio de micronúcleo (MN) é utilizado como um marcador desses efeitos genéticos ao nível de DNA induzidos por diversos poluentes e fornece informações sobre o potencial citogenotóxico (FARAG; ALAGAWANY, 2018). O teste é considerado uma medida de genotoxicidade em anfíbios em condições laboratoriais e de campo e mostrou potencial para monitoramento *in situ* da qualidade da água (LAJMANOVICH *et al.*, 2005).

O teste MN é um teste rápido e confiável que permite avaliar alterações cromossômicas causadas por perda de cromossomos inteiros ou por quebras cromossômicas (ARANHA, 2013). Tem sido amplamente utilizado para avaliar ação genotóxica induzida por agentes químicos ou físicos em diversos ambientes (GALINDO; MOREIRA, 2009). Quando comparado com outras técnicas de detecção de dano ao DNA, o teste MN apresenta algumas vantagens como: pode ser realizado rapidamente, não é complexo ou caro (LAJMANOVICH *et al.*, 2014; JOSENDE *et al.*, 2015), e a sua preparação e análise são mais simples e mais rápidas do que outros testes para aberrações cromossômicas (LAJMANOVICH *et al.*, 2014).

O micronúcleo pode ser definido como uma pequena porção de DNA delimitada por membrana que se encontra separada do núcleo principal (CORT; GHISI, 2014; LÓPEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2017). Fragmentos cromossômicos se perdem durante a anáfase na divisão celular e são envoltos por uma membrana nuclear durante a telófase na mitose, formando os micronúcleos (CORT; GHISI, 2014; LÓPEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2017).

Anfíbios são vertebrados aquáticos que já demonstraram ser modelos biológicos úteis para o teste de micronúcleo e indução de danos primários no DNA em eritrócitos devido a exposição a agrotóxicos (e.g. CABAGNA *et al.*, 2006; CANDIOTI *et al.*, 2010; NIKOLOFF *et*

al., 2014; ARCAUTE *et al.*, 2014; JOSENDE *et al.*, 2015; SOLONESKI; ARCAUTE; LARRAMENDY, 2016; CRUZ-ESQUIVEL; VILORIA-RIVAS; MARRUGO-NEGRETE, 2017; NATALE *et al.*, 2018). O teste MN tem sido amplamente utilizado em eritrócitos anfíbios uma vez que este tipo de célula é facilmente manipulado e dissociação celular não é necessária (LAJMANOVICH *et al.*, 2014).

Além do MN, outras anormalidades nucleares de eritrócitos (ANE's) também podem ser induzidas por agentes genotóxicos. Uma das explicações mais aceitas para as anormalidades nucleares é relativa ao aspecto do núcleo, pois quando a célula detecta uma região de DNA afetada, se inicia um processo de reparo e eliminação da cromatina (LÓPEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2017). A região alterada é então movida para a periferia do núcleo e eliminada por exocitose. Antes do processo ser completado, a membrana nuclear exhibe algumas imperfeições, caracterizando anormalidade nuclear (LÓPEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2017).

Carrasco, Tilbury e Myres (1990) foram os primeiros a descrever anormalidades nucleares em peixes, sendo elas: *Blebbled* (Bolhas): uma bolha foi descrita como uma pequena evaginação da membrana nuclear, parecendo conter eucromatina ou heterocromatina (mais escuro) e tamanho de bolha semelhante ao tamanho de micronúcleos; *Lobed* (Lobado): núcleos com evaginações maiores que as bolhas descritas anteriormente. Sua estrutura não é tão definida como a anterior. Alguns núcleos apresentam várias destas estruturas; *Notched* (Entalhado): núcleos que apresentam uma fenda ou corte bem definido em sua forma. Geralmente com uma profundidade apreciável no núcleo. Esses cortes parecem não possuir nenhum material nuclear e parecem ser delimitados pela membrana nuclear; *Vacuolated* (Vacuolizado): núcleos que apresentam uma região parecida com os vacúolos encontrados em células vegetais, desprovidos de qualquer material visível nessa região. Essas anormalidades também foram observadas em eritrócitos de girinos anfíbios como consequência da exposição a contaminantes ambientais e químicos com atividades citotóxicas, genotóxicas ou mutagênicas (LAJMANOVICH *et al.*, 2014).

A análise das ANE's complementa o teste MN, pois a falta de micronúcleos não necessariamente significa a ausência de efeitos genotóxicos da substância avaliada (ARANHA, 2013). O efeito citotóxico da substância avaliada pode levar a morte de células em grande escala, de modo a indicar um resultado falso negativo. Tendo essa visão, as ANE's devem ser consideradas como consequências dos efeitos genotóxicos da substância avaliada (ARANHA, 2013).

O presente estudo foi dividido em dois capítulos. No primeiro capítulo, intitulado "Toxicidade aguda e genotoxicidade de uma formulação comercial de cipermetrina em girinos

de *Physalaemus gracilis*”, foram avaliadas a toxicidade aguda e a genotoxicidade de uma formulação comercial de cipermetrina sobre os girinos de *P. gracilis*. No segundo capítulo, intitulado “O inseticida fipronil é tóxico para anfíbios? Avaliação da toxicidade de uma formulação comercial do inseticida fipronil em girinos de *Physalaemus gracilis*”, foram avaliados os efeitos letais e subletais de uma formulação comercial de fipronil sobre a mesma espécie.

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, P. R. **Toxicidade aguda (LC₅₀) e efeitos comportamentais e morfológicos do formulado comercial Roundup original® em girinos de *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leptodactylidae) e *Rhinella icterica* (Anura: Bufonidae)**. 2014. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia Ambiental) - Universidade Federal da Alfenas, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia Ambiental, Poços de Caldas, 2014.
- AMÉRICO, J H. P.; MANOEL, L. O.; TORRES, N. H.; FERREIRA, L. F. R. O uso de agrotóxicos e os impactos nos ecossistemas aquáticos. **Revista Científica ANAP Brasil**, v. 8, n. 13, p. 101-115, 2015. Doi: 10.17271/1984324081320151149.
- ARANHA, R. C. **Potencial de toxicidade dos herbicidas glifosato e imazetapir em *Colossoma macropomum* (Pisces)**. 2013. 69 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Área de concentração Estudos de Ecossistemas Amazônicos, Universidade Federal do Oeste do Pará, Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia, Santarém, 2013.
- ARCAUTE, C. R.; PÉREZ-IGLESIAS, J. M.; NIKOLOFF, N.; NATALE, G. S.; SOLONESI, S.; LARRAMENDY, M. L. Genotoxicity evaluation of the insecticide imidacloprid on circulating blood cells of Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae) by comet and micronucleus bioassays. **Ecological Indicators**, v. 45, p. 632-639, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolind.2014.05.034>.
- ARCY, A. R.; SILVA, M.; CUNHA, T. L. Testes ecotoxicológicos de diferentes formulações do bioinseticida produzido na UNIVILLE submetidas ao teste de prateleira. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 19, n. 4, p.435-440, 2014. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-41522014019000000676>.
- BAKER, N. J.; BANCROFT, B. A.; GARCIA, T. S. A meta-analysis of the effects of pesticides and fertilizers on survival and growth of amphibians. **Science of The Total Environment**, v. 449, p.150-156, 2013. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.01.056>.
- BEEBEE, T. J.C.; GRIFFITHS, R. A. The amphibian decline crisis: A watershed for conservation biology? **Biological Conservation**, v. 125, n. 3, p.271-285, 2005. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.04.009>.
- BIANCHI, J.; CABRAL-DE-MELLO, D. C.; MARIN-MORALES, M. A. Toxicogenetic effects of low concentrations of the pesticides imidacloprid and sulfentrazone individually and in combination in in vitro tests with HepG2 cells and *Salmonella typhimurium*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 120, p. 174-183, out. 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.05.040>.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Gabinete da Ministra. Portaria nº 445, de 17 de dezembro de 2014. Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção - Peixes e Invertebrados Aquáticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 18 dez. 2014.

CABAGNA, M. C.; LAJMANOVICH, R. C.; PELTZER, P. M.; ATTADEMO, A. M.; ALE, E. Induction of micronuclei in tadpoles of *Odontophrynus americanus* (Amphibia: Lepidodactylidae) by the pyrethroid insecticide cypermethrin. **Toxicological and Environmental Chemistry**, v. 88, n. 4, p. 729-737, 2006. Doi: 10.1080/02772240600903805.

CANDIOTI, J. V.; NATALE, G. S.; SOLONESKI, S.; RONCO, A. E.; LARRAMENDY, M. L. Sublethal and lethal effects on *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) tadpoles exerted by the pirimicarb-containing technical formulation insecticide Aficida®. **Chemosphere**, v. 78, n. 3, p. 249-255, 2010. Doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.10.064.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M. S. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 47, p. 2123-2436, 1990. Doi: <https://doi.org/10.1139/f90-237>.

CASTRO, A. A. A. S. **Avaliação ecotoxicológica de efluentes industriais utilizando *Danio rerio* Hamilton-Buchanan, 1822 (Teleostei, Cyprinidae)**. 2008. 63 f. Dissertação (Mestrado em Bioecologia Aquática) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2008.

COELHO, R. S. **Avaliação da toxicidade de fluidos de Usinagem através da ecotoxicologia aquática**. 2006. 136 f. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de São Carlos, São Carlos, 2006.

CORT, C. C. W. D.; GHISI, N. C. Uso de alterações morfológicas nucleares em *Astyanax spp.* para avaliação da contaminação aquática. **O Mundo da Saúde**, p.31-39, 2014. Doi: 10.15343/0104-7809.20143801031039.

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. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422008000700038>.

CRUZ-ESQUIVEL, A. VILORIA-RIVAS, J.; MARRUGO-NEGRETE, J. Genetic damage in *Rhinella marina* populations in habitats affected by agriculture in the middle region of the Sinú River, Colombia. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 35, p. 27392-27401, 2017. Doi: 10.1007/s11356-017-0134-8.

DOMINGUES, V. M. F. **Utilização de um produto natural (cortiça) como adsorvente de pesticidas piretróides em água**. 2005. 198 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade do Porto, Faculdade de Engenharia, Porto, 2005.

FANALI, L. Z.; FRANCO-BELUSSI, L.; BONINI-DOMINGOS, C. R.; OLIVEIRA, C. Effects of benzo[a]pyrene on the blood and liver of *Physalaemus cuvieri* and *Leptodactylus fuscus* (Anura: Leptodactylidae). **Environmental Pollution**, v. 237, p. 93-102, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2018.02.030>.

FARAG, M. R.; ALAGAWANY, M. Erythrocytes as a biological model for screening of xenobiotics toxicity. **Chemico-biological Interactions**, v. 279, p. 73-83, 2018. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2017.11.007>.

FROST, D. **Amphibian Species of the World: an Online Reference**. Version 6.0, American Museum of Natural History, New York, 2018. Disponível em: <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. Acesso em: 15 maio 2018.

GALINDO, T. P.; MOREIRA, L. M. Evaluation of genotoxicity using the micronucleus assay and nuclear abnormalities in the tropical sea fish *Bathygobius soporator* (Valenciennes, 1837) (Teleostei, Gobiidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, n. 2, p. 394-398, 2009. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572009000200029>.

GIBBLE, R. E.; BAER, K. N. Effects of atrazine, agricultural runoff, and selected effluents on antimicrobial activity of skin peptides in *Xenopus laevis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 4, p.593-599, 2011. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.11.009>.

GONÇALVES, M. W. **Alterações genômicas e mutagênicas em duas espécies de anfíbios anuros**. 2015. 63 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.

HAYES, T.B., FALSO, P., GALLIPEAU, S. & STICE, M. The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's perspective. **Journal of Experimental Biology**. v. 213, p. 921-933, 2010. doi: 10.1242/jeb.040865.

HERKOVITS, J.; PEREZ-COLL, C.; HERKOVITS, F. D. Ecotoxicological studies of environmental samples from Buenos Aires area using a standardized amphibian embryo toxicity test (AMPHITOX). **Environmental Pollution**, v. 116, n. 1, p.177-183, 2002. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(01\)00167-1](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(01)00167-1).

HOSKINS, T. D.; BOONE, M. D. Variation in malathion sensitivity among populations of Blanchard's cricket frogs (*Acris blanchardi*) and implications for risk assessment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 36, n. 7, p. 1917-1923, 2017. Doi: 10.1002/etc.3715.

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Relatório de comercialização de agrotóxicos: **Boletins anuais de produção, importação, exportação e vendas de agrotóxicos no Brasil**. 2018. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>. Acesso em: 15 maio 2018.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento sistemático de produção agrícola**. 2018. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618>. Acesso em: 15 maio 2018.

IUCN - **International Union for Conservation of Nature Red List of Threatened Species**, 2018. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org/>. Acesso em: 15 maio 2018.

JARDIM, G. M. **Estudos ecotoxicológicos da água e do sedimento do Rio Corumbataí, SP**. 2004. 126 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Agroecossistemas) - Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2004.

JOHNSON, L. A.; WELCH, B.; WHITFIELD, S. M. Interactive effects of pesticide mixtures, predators, and environmental regimes on the toxicity of two pesticides to red-eyed tree frog larvae. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 32, n. 10, p.2379-2386, 2013. Doi: <https://doi.org/10.1002/etc.2319>.

JOSENDE, M. E.; TOZETTI, A. M.; ALALAN, M. T.; MATHIES FILHO, V.; XIMENEZ, S. S.; SILVA JÚNIOR, F. M. R.; MARTINS, S. E. Genotoxic evaluation in two amphibian species from Brazilian subtropical wetlands. **Ecological Indicators**, v. 49, p. 83-87, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2014.10.007>.

LAJMANOVICH, R. C.; CABAGNA, M.; PELTZER, P. M.; STRINGHINI, G. A.; ATTADEMO, A. M. Micronucleus induction in erythrocytes of the *Hyla pulchella* tadpoles (Amphibia: Hylidae) exposed to insecticide endosulfan. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 587, n. 1-2, p.67-72, 2005. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2005.08.001>.

LAJMANOVICH, R. C.; CABAGNA-ZENKLUSEN, M. C.; ATTADEMO, A. M.; JUNGES, C. M.; PELTZER, P. M.; BASSÓ, A.; LORENZATTI, E. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in tadpoles of the common toad (*Rhinella arenarum*) treated with the herbicides Liberty® and glufosinate-ammonium. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 769, p.7-12, 2014. Doi: [10.1016/j.mrgentox.2014.04.009](https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2014.04.009).

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 diferente pesticide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 136, p. 84-91, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.10.035>.

MACAGNAN, N.; RUTKOSKI, C. F.; KOLCENTI, C.; VANZETTO, G. V.; MACAGNAN, L. P.; STURZA, P. F.; HARTMANN, P. A.; HARTMANN, M. T. Toxicity of cypermethrin and deltamethrin insecticides on embryos and larvae of *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 25, p. 20699-20704, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9727-5>.

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO FILHO, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Australis.**, v. 12, n. 03, p.355-381, out. 2008.

MARQUES, S. M.; GONÇALVES, F.; PEREIRA, R. Effects of a uranium mine effluent in the early-life stages of *Rana perezi* Seoane. **Science of the Total Environment**, v. 402, n. 1, p.29-35, 2008. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.04.005>.

MASSARO, F. C. **Estudos ecotoxicológicos com *Hydra viridissima* (Cnidaria: Hydrozoa)**. 2006. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de São Carlos, São Carlos, 2006.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Agrotóxicos**. 2018. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/agrotoxicos>. Acesso em: 15 maio 2018.

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

- NATALE, G. S.; VERA-CADIOTI, J.; ARCAUTE, C. R.; SOLONESKI, S.; LARRAMENDY, M. L. Lethal and sublethal effects of the pirimicarb-based formulation Aficida® on *Boana pulchella* (Duméril and Bibron, 1841) tadpoles (Anura, Hylidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 147, p. 471-479, 2018. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.09.007>.
- NIKOLOFF, N.; NATALE, G. S.; MARINO, D.; SOLONESKI, S.; LARRAMENDY, M. L. Flurochloridone-based herbicides induced genotoxicity effects on *Rhinella arenarum* tadpoles (Anura: Bufonidae) **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 100, p. 275-281, 2014. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.10.021>.
- PALENSKE, N. M.; NALLANI, G. C.; DZIALOWSKI, E. M. Physiological effects and bioconcentration of triclosan on amphibian larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 152, n. 2, p.232-240, 2010. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.04.009>.
- POCHINI, K. M.; HOVERMAN, J. T. Reciprocal effects of pesticides and pathogens on amphibian hosts: The importance of exposure order and timing. **Environmental Pollution**, v. 221, p.359-366, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.11.086>.
- RODRIGUES, B. K. **Avaliação dos impactos de agrotóxicos na região do Alto Mogi-Guaçu (MG) por meio de ensaios laboratoriais com *Danio rerio* (Cypriniformes, Cyprinidae)**. 2007. 138f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de São Carlos, São Carlos, 2007.
- RUTKOSKI, C. F.; MACAGNAN, N.; KOLCENTI, C.; VANZETTO, G. V.; STURZA, P. F.; HARTMANN, P. A.; HARTMANN, M. T. Lethal and Sublethal Effects of the Herbicide Atrazine in the Early Stages of Development of *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 74, n. 4, p. 587-593, 2018. Doi: [10.1007/s00244-017-0501-y](https://doi.org/10.1007/s00244-017-0501-y).
- SEGALLA, M. V.; CARAMASCHI, U.; CRUZ, C. A. G.; GRANT, T.; HADDAD, C. F. B.; GARCIA, P. C. A.; BERNECK, B. V. M.; LANGONE, J. A. Brazilian Amphibians: List of Species. **Herpetologia Brasileira: Mudanças Taxonômicas**, v. 5, n. 2, p.34-46, 2016.
- SILVA, M. R.; CAMPOS, A. C. E.; BOHM, F. Z. Agrotóxicos e seus impactos sobre ecossistemas aquáticos continentais. **SaBios: Revista Saúde e Biologia**, v. 8, n. 2, p 46-58, 2013.
- SOLONESKI, S.; ARCAUTE, C. R.; LARRAMENDY, M. L. Genotoxic effect of a binary mixture of dicamba-and glyohisate-based comercial herbicide formulations on *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867) (Anura, Bufonidae) late-stage larvae. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 17, p. 17811-17821, 2016. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6992-7>.
- SPADOTTO, C. A.; GOMES, M. A. F.; LUCHINI, L. C.; ANDRÉA, M. M. **Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações**. 1ª ed. Jaguaruína: Embrapa Meio Ambiente, 2004. 29 p.
- STUART, S. N.; CHANSON, J. S.; COX, N.A.; YOUNG, B. E.; RODRIGUES, A. S. L.; FISCHMAN, D. L.; WALLER, R.W. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. **Science**, v. 306, p. 1783-1786, 2004. Doi: [10.1126/science.1103538](https://doi.org/10.1126/science.1103538).

TOLEDO, L. F.; CARVALHO-E-SILVA, S. P.; SÁNCHEZ, C.; ALMEIDA, M. A.; HADDAD, C. F. B. A revisão do Código Florestal Brasileiro: impactos negativos para a conservação dos anfíbios. **Biota Neotropica**, v. 10, n. 4., p. 35-38, 2010. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1676-06032010000400003>.

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

WAKE, D. B.; VREDENBURG, V. T. Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, p. 11466-11473, 2008. Doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.0801921105>.

WRUBLESWSKI, J.; REICHERT JR, F. W.; GALON, L.; HARTMANN, P. A.; HARTMANN, M. T. Acute and chronic toxicity os pesticides on tadpoles of *Physalaemus curvieri* (Anura, Leptodactylidae). **Ecotoxicology**, v. 27, n. 3, p. 369-368, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10646-018-1900-1>.

**CAPÍTULO I – TOXICIDADE AGUDA E GENOTOXICIDADE DE UMA
FORMULAÇÃO COMERCIAL DE CIPERMETRINA EM GIRINOS DE
*PHYSALAEMUS GRACILIS***

RESUMO

A presença de agrotóxicos no ambiente é apontada como um dos fatores no declínio nas populações de anfíbios em todo o mundo. Anfíbios são apontados como bons indicadores de contaminação por essas substâncias pois possuem ciclo de vida bifásico, devido a seus hábitos alimentares e pele altamente permeável que facilita a absorção de agrotóxicos. A cipermetrina é um dos piretróides mais utilizados na agricultura atualmente e têm consequências comprovadas em diversas espécies de anfíbios, provocando alterações comportamentais e morfológicas nos organismos. Dito isso, o estudo avaliou a toxicidade letal, subletal e genotóxica de uma formulação comercial de cipermetrina em na espécie de anfíbio anuro *P. gracilis*. Para isso, desovas da espécie foram coletadas na natureza e mantidas em laboratório sob condições controladas até atingirem o desenvolvimento larval desejado. Os ensaios agudo e crônico foram realizados em sextuplicata com 10 girinos por réplica, totalizando 60 girinos testados por concentração. No ensaio agudo foram avaliadas as concentrações que variaram de 100 a 800 µg/L durante um período de 96 horas. No ensaio crônico, concentrações de cipermetrina já registradas na natureza (1, 3, 6 e 20 µg/L) foram avaliadas quanto a mortalidade e posteriormente, usadas para o teste de micronúcleo por um período de 7 dias. Além disso, no teste de micronúcleo, 15 girinos foram analisados por concentração quanto a presença de micronúcleos e de anormalidades nucleares de eritrócitos. A $CL_{50;96h}$ determinada através do método Trimmed Spearman-Kärber para *P. gracilis* para a formulação comercial de cipermetrina foi de 273,41 µg/L. No ensaio crônico, constatou-se uma mortalidade superior a 50% na maior concentração (20 µg/L), apresentando características de toxicidade aguda para a espécie, já que provocou a mortalidade de metade dos girinos avaliados. O teste de micronúcleo mostrou resultados significativos nas concentrações de 6 e 20 µg/L para micronúcleo e registrou a presença de diversas anormalidades nucleares, atingindo 20% do total de células avaliadas, indicando o potencial genotóxico da formulação comercial de cipermetrina para *P. gracilis*. A cipermetrina apresentou alto risco para a espécie, mostrando que tem potencial para causar diversos problemas a curto e longo prazo, interferindo na dinâmica daquele ecossistema. Desta forma, pode-se concluir que a formulação comercial de cipermetrina apresentou efeitos toxicológicos para *P. gracilis*.

Palavras-chave: Piretróide. Inseticida. Anfíbios. Micronúcleo. *P. gracilis*

ABSTRACT

The presence of pesticides in the environment is noted as one of the factors in the decline in amphibian populations worldwide. Amphibians are indicated as good indicators of contamination by these substances because they have a biphasic life cycle due to their eating habits and highly permeable skin that facilitates the absorption of pesticides. Cypermethrin is one of the most widely used pyrethroids in agriculture today and has proven effects on several species of amphibians, causing behavioral and morphological changes in organisms. That said, the study evaluated the lethal, sublethal and genotoxic toxicity of a commercial formulation of cypermethrin in the anuran species *P. gracilis*. For this, spawnings of the species were collected in the wild and kept in the laboratory under controlled conditions until reaching the desired larval development. The acute and chronic assays were performed in six replicates with 10 tadpoles per replicate, totaling 60 tadpoles tested per concentration. In the acute test concentrations ranging from 100 to 800 $\mu\text{g.L}^{-1}$ were tested for a 96 hour period. In the chronic trial, concentrations of cypermethrin already registered in nature (1, 3, 6 and 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$) were tested for mortality and subsequently used for the micronucleus test for a period of 7 days. In addition, in the micronucleus test, 15 tadpoles were analyzed by concentration for the presence of micronuclei and for nuclear erythrocyte abnormalities. The $\text{LC}_{50;96\text{h}}$ determined by the Trimmed Spearman-Kärber method for *P. gracilis* for the commercial cypermethrin formulation was 273.41 $\mu\text{g.L}^{-1}$. In the chronic trial, a mortality higher than 50% was observed in the highest concentration (20 $\mu\text{g.L}^{-1}$), presenting characteristics of acute toxicity for the species, since it provoked the mortality of half of the evaluated tadpoles. The micronucleus test showed significant results at concentrations of 6 and 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ for micronuclei and recorded the presence of several nuclear abnormalities, reaching 20% of the total cells evaluated, indicating the genotoxic potential of the commercial cypermethrin formulation for *P. gracilis*. Cypermethrin presented a high risk for the species, showing that it has the potential to cause several problems in the short and long term, interfering in the dynamics of that ecosystem. Thus, it can be concluded that the commercial formulation of cypermethrin had toxicological effects for *P. gracilis*.

Keywords: Pyrethroid. Insecticide. Amphibians. Micronucleus. *P. gracilis*

1 INTRODUÇÃO

A fauna aquática é frequentemente exposta a agrotóxicos, devido as atividades antropogênicas que introduzem extensas quantidades desses contaminantes no meio ambiente (DIAMOND *et al.*, 2015; PÉREZ-IGLESIAS *et al.*, 2015). Os agrotóxicos são projetados para controlar ou eliminar insetos, microrganismos e plantas que trazem prejuízo a produção agrícola, agindo através de diversas reações bioquímicas (PÉREZ-IGLESIAS *et al.*, 2015). Como consequência, podem afetar espécies não-alvo que possuem similaridade fisiológica ou bioquímica com os organismos-alvo (KÖLER; TRIEBSKORN, 2013).

Substâncias químicas têm sido apontadas como um dos fatores para a perda em larga escala de populações de anfíbios, devido a sensibilidade deste grupo a esses produtos (HAYES *et al.*, 2006; WAGNER *et al.*, 2014). Efeitos deletérios de agrotóxicos, incluindo inseticidas, são particularmente prejudiciais aos anfíbios, causando alterações no crescimento, desenvolvimento, reprodução e comportamento (JING *et al.*, 2017; MACAGNAN *et al.*, 2017; RUTKOSKI *et al.*, 2018; WRUBLESWSKI *et al.*, 2018). Os anfíbios anuros são considerados bons bioindicadores de poluentes ambientais devido a suas características particulares, como ciclos de vida complexos, rápidas taxas de crescimento larval, posição trófica, pele permeável (JING *et al.*, 2017), reprodução dependente da água (FANALI *et al.*, 2018) e ovos desprotegidos (SOLONESKI; ARCAUTE; LARRAMENDY, 2016).

Agrotóxicos do grupo piretróide modernos são inseticidas potentes e seletivos (MORETTO, 2018). São os mais utilizados atualmente na agricultura e silvicultura e representam 25% do mercado mundial de inseticidas (SHI *et al.* 2011; TAJU *et al.*, 2014). Formados através de ésteres isolados da flor *Chrysanthemum cinerariaefolium* (SANTOS; AREAS; REYES, 2007; VELISEK *et al.*, 2007; COSTA, 2015), essa classe de agrotóxico está entre os agrotóxicos mais tóxicos para espécies aquáticas, podendo afetar a dinâmica natural do ambiente (PIMPÃO, 2006).

A toxicidade dos piretróides está relacionada com seu mecanismo de ação, pois exercem efeito sobre os canais de sódio neural, interferindo na sua abertura e fechamento, aumentando o tempo de entrada dos íons de Na⁺ na célula e atrasando seu encerramento (SANTOS; AREAS; REYES, 2007, VELISEK *et al.*, 2006, VELISEK *et al.*, 2007). Os piretróides interagem com os receptores do ácido gama amino butírico (GABA) nos filamentos nervosos (VELISEK *et al.*, 2006, VELISEK *et al.*, 2007, BRADBERRY *et al.*, 2005), ou seja, ligam-se aos receptores do GABA bloqueando os canais de cloro e sua ativação (SANTOS; AREAS; REYES, 2007), o que pode ocasionar hiperexcitabilidade, observada devido ao envenenamento severo por

piretróides do tipo II (BRADBERRY *et al.*, 2005). O GABA é o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central de vertebrados (SANTOS; AREAS; REYES, 2007).

A cipermetrina é um dos piretróides mais utilizados para aplicações agrícolas e domésticas devido a sua alta toxicidade para organismos-alvo e baixa toxicidade para mamíferos. Por consequência, a cipermetrina é um contaminante comum em sistemas aquáticos (MARINO; RONCO, 2005; PARAVANI *et al.*, 2018). A Cipermetrina ou (RS)- α -ciano-3-phenoxybenzyl (1RS,3RS;1RS,3SR) -3- (2,2-dichlorovinyl) -2,2- dimethylcyclopropane carboxylate possui fórmula molecular $C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$ (ANVISA, 2018). A substância é classificada pela ANVISA (2018) como Classe II – altamente tóxica. Em condições normais de temperatura e pH, é estável a hidrólise com uma meia vida maior que 50 dias e estável também a fotólise com uma meia vida superior a 100 dias (JONES, 1995; KAMRIN, 1997). O inseticida possui densidade de 1,12 g/mL a 22°C, ponto de fusão de 60-80°C (isômeros puros), ponto de ebulição de 170-195°C e pressão de vapor de 4×10^{-8} mm Hg a 70°C (CYPERMETHRIN, 1993).

Os efeitos subletais relatados em anfíbios devido a exposição a cipermetrina envolvem alterações comportamentais, morfológicas e bioquímicas nos girinos (GREULICH; PFLUGMACHER, 2003, 2004; DAVID *et al.*, 2012), mortalidade e alteração na duração da metamorfose, alterações enzimáticas, diminuição no sucesso da eclosão (GREULICH; PFLUGMACHER, 2003, 2004), hiperatividade (SAHA; KAVIRAJ, 2008), inibição da atividade da colinesterase (KHAN *et al.*, 2003) e alterações na atividade natatória (WRUBLESWSKI *et al.*, 2018). No entanto, pesquisas que investiguem efeitos genotóxicos da cipermetrina em anfíbios são escassos.

A contaminação ambiental interfere no crescimento e desenvolvimento normal dos anfíbios, porém a indução de danos genéticos no DNA após exposição aguda e crônica a agrotóxicos é, em última instância, o efeito danoso mais relevante (SOLONESKI; ARCAUTE; LARRAMENDY, 2016). A análise da morfologia de células sanguíneas, particularmente eritrócitos, é um importante bioindicador de poluição e de potencial tóxico de substâncias a espécies selvagens (LÓPEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2017). Este biomarcador tem sido considerado uma ferramenta apropriada para avaliar os efeitos da exposição a xenobióticos em organismos, incluindo anfíbios (PÉREZ-IGLESIAS *et al.*, 2014; SOLONESKI; ARCAUTE; LARRAMENDY, 2016) e pode fornecer informações sobre exposição a poluentes genotóxicos (PÉREZ-IGLESIAS *et al.*, 2014).

O teste de micronúcleo é um dos métodos mais utilizados para detecção de genotoxicidade de substâncias químicas no ambiente (FENG *et al.*, 2004). É um método rápido,

eficaz, de baixo custo e é um bom indicador de contaminação química em organismos (JOSENDE *et al.*, 2015; GHISI; OLIVEIRA; PRIOLI, 2016). Os micronúcleos são estruturas extranucleares morfológicamente semelhantes ao núcleo principal, circundadas por uma dupla membrana e contendo DNA eliminado (CHMIELEWSKA *et al.*, 2018) e originam-se de fragmentos cromossômicos acêntricos e/ou cromossomos inteiros que não migram para o núcleo principal durante a divisão celular (JOSENDE *et al.*, 2015; ; GHISI; OLIVEIRA; PRIOLI, 2016; LÓPEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2017). Fragmentos atrasados ou cromossomos inteiros são envolvidos por membrana e tornam-se um micronúcleo (LÓPEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2017).

Nos últimos anos, vários estudos descreveram a presença de outras anormalidades nucleares de eritrócitos (ANE's). Os mecanismos de formação de muitas dessas anormalidades ainda não são totalmente compreendidos (LÓPEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2017). No entanto, muitas pesquisas os incluíram nas avaliações de genotoxicidade como um teste complementar ao teste de micronúcleo (e.g. PÉREZ-IGLESIAS *et al.*, 2014, 2018; JOSENDE *et al.*, 2015; LÓPEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2017; NATALE *et al.*, 2018). Eritrócitos de anfíbios são considerados modelos importantes para o estudo de anormalidades celulares. As anormalidades nucleares podem incluir células binucleadas, núcleos lobulados, entalhado, broto nuclear e núcleos vacuolizados (FENECH *et al.*, 2011).

A espécie de anfíbio *Physalaemus gracilis* (rã-chorona), ocorre na Argentina, Uruguai, Paraguai e Brasil (FROST, 2018), com registros nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Ocorre em campos, charcos (FRAVRETTO, 2011) e em corpos d'água lênticos, de áreas preservadas ou com alterações ambientais (BORGES-MARTINS *et al.*, 2007), inclusive em áreas próximo a agricultura. É uma espécie de pequeno porte, medindo de 2,7 a 3,2 cm e possui coloração variável, desde o castanho avermelhado até o cinza-claro (ZANK *et al.*, 2014; BORGES-MARTINS *et al.*, 2007).

Nos meses de setembro a março, época de acasalamento da espécie, macho e fêmea constroem ninhos de espuma onde os ovos são depositados (BORGES-MARTINS *et al.*, 2007, ZANK *et al.*, 2014). No Brasil, as fêmeas depositam de 400 e 800 ovos, enquanto que no Uruguai esses números variaram entre 700 e 1.300 ovos (LAVILLA *et al.*, 2010). A espécie não está classificada como ameaçada na lista vermelha da IUCN (2018) devido a sua ampla distribuição e tolerância de uma vasta gama de habitats (LAVILLA *et al.*, 2010).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo principal deste estudo foi avaliar os efeitos letais, subletais e genotóxicos da formulação comercial do inseticida piretróide cipermetrina na espécie de anfíbio *P. gracilis*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a sensibilidade de *P. gracilis* devido a exposição a diferentes concentrações de cipermetrina;
- Determinar a Concentração Letal Média (CL₅₀) da cipermetrina para *P. gracilis*;
- Avaliar os efeitos genotóxicos de concentrações de cipermetrina ambientalmente relevantes sobre *P. gracilis* através da avaliação da frequência de micronúcleo e de anormalidades nucleares de eritrócitos;
- Estimar os valores de *LOEC*, *NOEC* e *MATC*;
- Determinar o risco ecológico da cipermetrina para *P. gracilis*;
- Comparar os resultados encontrados para *P. gracilis* com outras espécies de anfíbios e animais aquáticos;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 AGROTÓXICO

Os ensaios de toxicidade foram realizados utilizando a formulação comercial do inseticida cipermetrina: Cyprin 250 EC, formulado por Nufarm Indústria Química e Farmacêutica S. A., registrado no Ministério da Agricultura, da Pecuária e Abastecimento - MAPA sob nº 06395, possui 250 g/L de ingrediente ativo de cipermetrina e 723 g/L de ingredientes inertes. De acordo com a bula do Cyprin 250 EC, a formulação apresenta Classificação Toxicológica I – Extremamente Tóxico e Classificação do Potencial de Periculosidade Ambiental – Altamente Perigoso ao Meio Ambiente.

A solução-estoque foi feita no dia do início da realização dos ensaios agudo e crônico. Para isso, a formulação comercial foi diluída em água destilada até obter uma solução-estoque com concentração de 500 mg/L de cipermetrina, que foi usada em todos os ensaios. A solução

foi adicionada com micropipeta nos recipientes para obter a concentração desejada em cada uma das repetições.

3.2 ORGANISMO-TESTE

Como organismo-teste para avaliação dos efeitos letais, subletais e genotóxicos da formulação comercial de cipermetrina foram utilizados girinos de *Physalaemus gracilis* (Boulenger, 1883) (Figura 1). As desovas da espécie foram coletadas direto da natureza (Figura 1-B), com menos de 24 horas de ovoposição, em lagoas localizadas na Universidade Federal da Fronteira Sul, na cidade de Erechim no Rio Grande do Sul, (Latitude: 27° 43' 46,11" Sul; Longitude: 52° 16' 54,40" Oeste). As coletas foram realizadas entre os meses de outubro de 2017 e fevereiro de 2018.



Figura 1: A - *Physalaemus gracilis* adulto. Foto: Gilcinéia dos Santos; B – Desovas de *P. gracilis* em ambiente natural; C – Girino de *P. gracilis*. **Fonte:** Elaborado pelo autor, 2018.

As desovas foram coletadas manualmente e transportadas em embalagens plásticas até o laboratório de Ecologia e Conservação da Universidade Federal da Fronteira Sul - Campus Erechim. No laboratório foram acondicionadas em aquários com capacidade de 15 litros, contendo água de poço artesiano, dentro dos padrões de potabilidade e sob aeração constante. A sala de criação e a de testes foram mantidas a uma temperatura de 24 ± 2 °C, umidade relativa entre 60 e 80% e iluminação controlada (12/12 horas claro-escuro).

As desovas permaneceram sob essas condições para que fosse possível o desenvolvimento dos girinos até atingirem a fase desejada para realização dos ensaios. Os girinos foram alimentados diariamente com o uso de ração comercial para peixes, com no mínimo 40% de proteína bruta.

Os ensaios ecotoxicológicos foram realizados com girinos na fase 25 de desenvolvimento (GOSNER, 1960), quando possuem formação bucal completa e conseguem se alimentar, correspondendo ao início do crescimento do corpo e desenvolvimento dos membros posteriores. Os girinos utilizados nos ensaios possuíam peso médio de $0,037 \text{ g} \pm 0,012$

(0,015 g – 0,088 g, N=47) e comprimento médio de 15,82 mm \pm 1,59 (12,8 mm – 23,25 mm, N=47).

A água utilizada para o desenvolvimento dos girinos e para a realização dos ensaios possuía as seguintes características: temperatura = 22°C \pm 2°C, pH = 7,0 \pm 0,5, oxigênio dissolvido = 4,0 \pm 1,0 mg/L, turbidez < 5, condutividade = 160 \pm 10 μ S/cm, alcalinidade = 9,74 mg CaCO₃/L, Ca = 6,76 mg/L, Na = 44,1 mg/L, Mg = 1,35 mg/L, Fe = 0,08 mg/L, Ni < 0,001 mg/L.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal da Fronteira Sul sob protocolo nº 23205.003634/2017-70 e autorizado pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) sob nº 54939-1.

3.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.3.1 Ensaio Agudo

O ensaio agudo para determinação da Concentração Letal Média (CL₅₀) teve duração de 96 horas. Foram testados 60 girinos por concentração divididos em 6 recipientes de vidro estéreis (6 réplicas), com capacidade de 500 mL, com uma densidade de 1 girino para cada 50 mL de solução. O controle negativo foi realizado somente com água, também com 60 girinos em 6 réplicas. Os frascos foram cobertos com plástico filme de maneira a evitar a evaporação e mantidos sob aeração constante. Os girinos foram expostos a seis concentrações da formulação comercial de cipermetrina: 100, 200 (MARINO; RONCO, 2005), 350, 400, 600, 700 e 800 μ g/L. A mortalidade dos girinos foi avaliada a cada 24 horas e os mortos foram retirados e contabilizados. A temperatura e oxigênio dissolvido da água foram mantidos em 22 \pm 2°C e 4 \pm 2 mg/L, respectivamente, durante todo o período do ensaio.

Para a classificação da toxicidade aguda, foi utilizada a classificação da *Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals* (GHS, 2017). Os compostos podem ser classificados em três categorias depois de 96 horas de exposição: alta toxicidade (CL₅₀<1 mg/L), toxicidade moderada (CL₅₀ entre 1 e 10 mg/L) e baixa toxicidade (CL₅₀>10 mg/L).

3.3.2 Ensaio Crônico

O ensaio crônico teve duração de 168 horas (7 dias), com o mesmo número de girinos, réplicas, tipo de recipientes e quantia de água do ensaio agudo. O ensaio foi mantido sob regime

estático, sem troca de soluções durante o período de realização e os frascos foram mantidos sob aeração constante. O tempo de ensaio respeitou a meia vida da cipermetrina na água, que é superior a 50 dias (JONES, 1995; KAMRIN, 1997). As concentrações subletais foram selecionadas de acordo com dados referentes a concentrações de cipermetrina já encontradas em água em ambiente natural, de acordo com a literatura. As concentrações avaliadas foram 1 µg/L, 3 µg/L (BELLUTA *et al.*, 2010), 6 µg/L (ETCHEGOYEN *et al.*, 2017) e 20 µg/L (CARLOS *et al.*, 2011). O ensaio foi acompanhado diariamente e os girinos mortos foram retirados a cada 24 horas.

3.3.3 Micronúcleo e Anormalidades Nucleares de Eritrócitos

No final da exposição de 168 horas, foram retirados 15 girinos de cada concentração e do controle, para análise do sangue pelo teste do micronúcleo. Os girinos foram anestesiados com lidocaína 5% (50 mg/g), de acordo com o CONCEA (2018). Uma gota de sangue de cada girino foi retirada por punção cardíaca, com seringas de insulina descartáveis e heparinizadas. Foram feitos esfregaços de sangue em lâminas de microscopia esterilizadas, secas ao ar e fixadas com 100% (v/v) de metanol frio (4°C) durante 2 minutos e em seguida coradas com solução Giemsa 10% durante 15 min, ao abrigo de luz. Ao final do processo, as lâminas foram lavadas com água destilada para retirar o excesso de corante e dispostas para secar.

Posteriormente, a presença de micronúcleos e outras anormalidades nucleares de eritrócitos (ANE's) foi determinada através da análise de 1.000 eritrócitos de cada girino, com uso de microscópio em objetiva 100X (LAJMANOVICH *et al.*, 2013). Além do micronúcleo, a genotoxicidade foi analisada utilizando a presença de ANE's, realizadas em glóbulos vermelhos de acordo com Carrasco, Tilbury e Myres (1990) e Fenech *et al.* (2011) por determinação da frequência das seguintes lesões nucleares: (1) *Células Anucleadas*: células sem a presença de núcleos; (2) *Células com Apoptose*: núcleos fragmentados, com células se programando para morrer. (3) *Células Binucleadas*: células com dois núcleos; (4) *Célula com Broto Nuclear ou Bolha*: núcleo com uma pequena evaginação da membrana nuclear, tamanho de bolha semelhante ao tamanho de micronúcleos; (5) *Células com Cariólise*: núcleo que apresenta somente o contorno, sem material interno; (6) *Células Entalhadas*: núcleos que apresentam uma fenda ou corte bem definido em sua forma, também ditos como núcleos em forma de rim; (7) *Células Lobadas*: núcleos com evaginações maiores que as bolhas descritas anteriormente; (8) *Células com Microcitose*: núcleo condensado e citoplasma reduzido; (9) *Células Vacuolizadas*: núcleos que apresentam uma região parecida com os vacúolos

encontrados em células vegetais, desprovidos de qualquer material visível nessa região. As alterações foram comparadas com os resultados encontrados no controle negativo.

3.3 ANÁLISE DE RISCO ECOLÓGICO

O risco ecológico para cada alteração percebida, foi avaliado utilizando a abordagem do quociente de risco ou *Hazard Quotient* (HQ), de acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, 1998). O HQ é calculado através da equação (1) para risco agudo (AHQ) e da equação (2) para risco crônico (CHQ):

$$AHQ = \frac{EEC}{CL_{50}} \quad (1)$$

$$CHQ = \frac{EEC}{NOEC} \quad (2)$$

Em que:

EEC: *Estimated Environmental Concentration* é uma concentração máxima estimada de contaminantes em um ambiente;

CL₅₀: é a concentração letal média;

NOEC: *No Observed Effect Concentration* é a concentração de efeito não observado;

Quando não foi possível calcular estatisticamente a *NOEC* foram usados os valores de *LOEC* (*Lowest Observed Effect Concentration*) para o cálculo de HQ (WU *et al.*, 2015). O HQ foi comparado com o nível preocupação (LOC) da USEPA (USEPA, 1998). O LOC é uma ferramenta política que a Agência usa para interpretar o quociente de risco, analisar o risco potencial para organismos não-alvo e a necessidade de considerar a ação reguladora. No ensaio agudo, o valor de LOC é 0,5 e no ensaio crônico, o valor LOC para o risco é 1. Se o quociente de risco for maior que 0,5 para risco agudo e maior que 1 para risco crônico, provavelmente ocorrerão efeitos nocivos devido ao contaminante em questão para a espécie avaliada.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos nos ensaios de toxicidade aguda (*CL₅₀*) foram analisados pelo método TSK – Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON; RUSSO; THRUSTON, 1977), através do programa GBasic, com nível de significância de 95%. Análise de variância unidirecional (ANOVA) foi usada para determinar as diferenças entre os vários grupos. O

teste de Tukey foi utilizado para comparar o nível de significância ($p < 0,05$) entre cada um dos grupos e Dunnett para comparar cada grupo tratado com o controle negativo. A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro Wilks e a homogeneidade das variâncias foi testada por Bartlett. Para determinar *LOEC*, *NOEC* e *MATC*, foi utilizado o teste de Dunnett. O *LOEC* (*Lowest Observed Effect Concentration*) é a concentração de efeito observado. O *NOEC* (*No Observed Effect Concentration*) é a concentração de efeito não observado. O *MATC* (*Maximum Acceptable Toxicant Concentration*) é a concentração máxima aceitável de toxicante e é dado pela média geométrica dos valores de *LOEC* e *NOEC*. Os testes estatísticos foram realizados utilizando o software Statistica 8.0 com nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 ENSAIO AGUDO

A formulação comercial de cipermetrina avaliada apresentou uma $CL_{50;96h}$ de 273,41 $\mu\text{g/L}$ (211,22 $\mu\text{g/L}$ - 353,90 $\mu\text{g/L}$) para girinos de *Physalaemus gracilis* (Tabela 1). A mortalidade dos girinos da espécie foi significativa em relação ao tempo de exposição ($F_{3;24} = 5,25$, $p < 0,01$, significativa em 72 horas, Tukey = $p < 0,05$), indicando que quanto maior o tempo de exposição, maior a mortalidade, mas não em relação a concentração ($F_{6;35} = 2,15$, $p = 0,07$) (Figura 2).

Tabela 1: Número de girinos de *Physalaemus gracilis* mortos a cada 24 horas, durante o ensaio agudo expostos a diferentes concentrações da formulação comercial de cipermetrina e determinação da CL_{50} .

Concentração ($\mu\text{g/L}$)	Nº de indivíduos expostos	Mortalidade					Porcentagem de mortalidade (%)	$CL_{50};$ 96h
		24h	48h	72h	96h	Total		
0 (controle)	60	0	0	0	0	0	0	
100	60	0	2	3	2	7	11,67	
200	60	0	5	24	6	35	58,33	
350	60	11	1	20	1	33	55,00	273,41
400	60	0	3	13	15	31	51,67	$\mu\text{g/L}$
600	60	11	1	13	8	33	55,00	
700	60	1	18	14	10	43	71,67	
800	60	10	0	21	9	40	66,67	

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

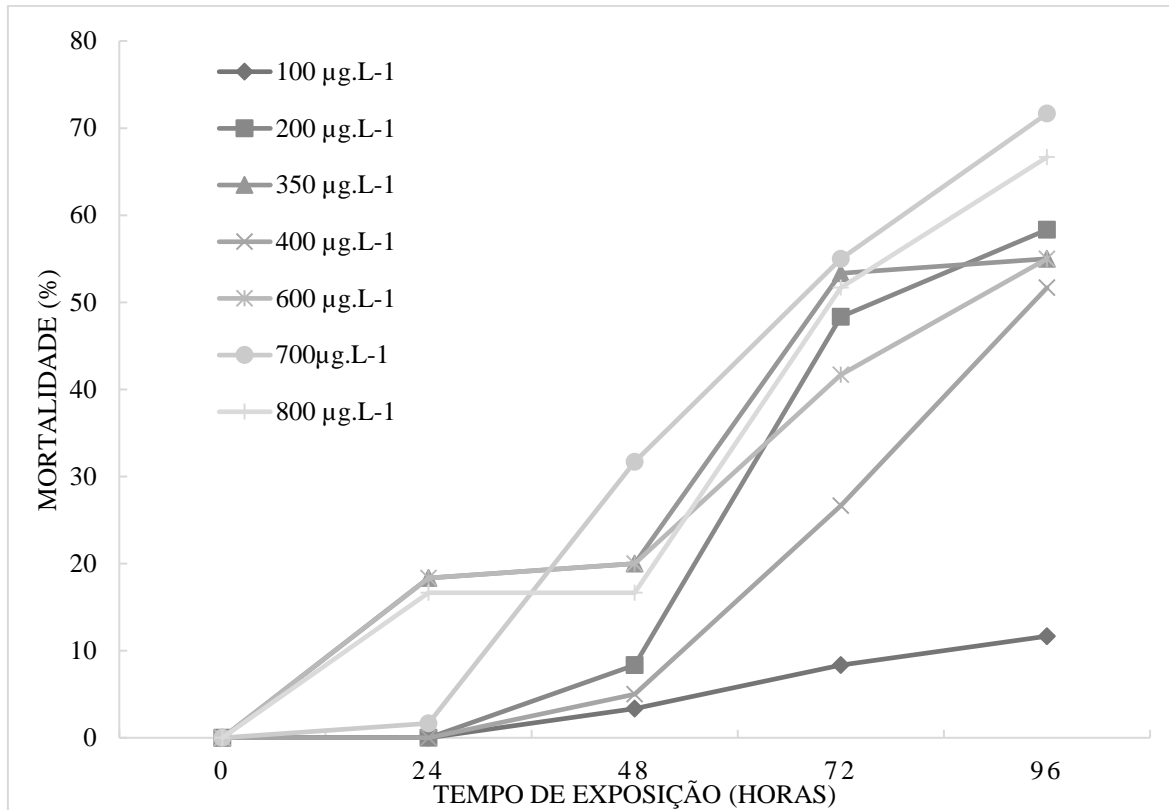


Figura 2: Mortalidade cumulativa (%) de girinos de *P. gracilis* expostos a diferentes concentrações da formulação comercial de cipermetrina durante o ensaio agudo. **Fonte:** Elaborado pelo autor, 2018.

4.2 ENSAIO CRÔNICO

A mortalidade dos girinos de *P. gracilis* durante o ensaio crônico foi significativa em relação a concentração ($F_{3;20} = 9,35$, $p < 0,01$, significativa em 6 e 20 µg/L, Tukey = $p < 0,05$; Tabela 2), e em relação ao tempo ($F_{6;21} = 2,97$, $p < 0,05$, em 168 horas, Tukey = $p < 0,05$), mostrando que tanto o aumento da concentração quanto do tempo de exposição influenciaram na mortalidade (Figura 3). A NOEC foi 3 µg/L e a LOEC 6 µg/L de cipermetrina. Com a determinação desses valores foi possível calcular que 4,24 µg/L foi o valor máximo de toxicante (MATC) que *P. gracilis* suporta desta formulação comercial de cipermetrina.

Tabela 2: Mortalidade de girinos de *P. gracilis* expostos a formulação comercial de cipermetrina no período de 7 dias.

Concentração (µg/L)	Nº de indivíduos expostos	Nº de vivos	Nº de mortos	Mortalidade (%)
0 (Controle)	60	60	0	0
1	60	56	4	6,67
3	60	46	14	23,33
6	60	39	21	35,00
20	60	28	32	53,33

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

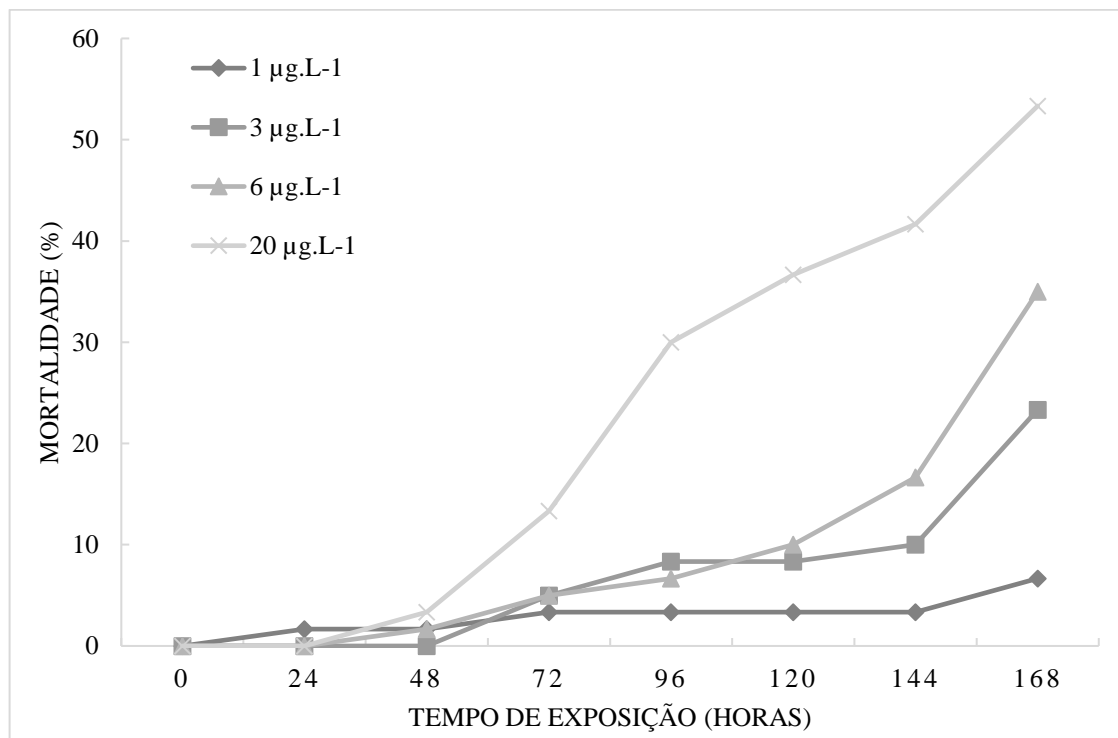


Figura 3: Mortalidade cumulativa (%) de girinos de *P. gracilis* expostos a diferentes concentrações da formulação comercial de cipermetrina durante o ensaio crônico. Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

4.3 MICRONÚCLEO E ANORMALIDADES NUCLEARES DE ERITRÓCITOS

Foram avaliados 75.796 eritrócitos de girinos de *Physalaemus gracilis* considerando todas as teste nas concentrações de cipermetrina e controle. A presença de micronúcleos nos eritrócitos expostos as concentrações de cipermetrina foi significativa ($F_{4,70} = 7,72$; $p < 0,01$, significativo em 6 e 20 µg/L, Dunnett, $p < 0,05$) (Tabela 3). A concentração que apresentou o maior número de micronúcleos foi a de 20 µg/L.

Tabela 3: Número de micronúcleos detectados em eritrócitos de *P. gracilis* expostos a formulação comercial do inseticida cipermetrina

Concentração (µg/L)	Número de eritrócitos analisados	Número de micronúcleos detectados	Micronúcleos (%)
Controle	15.154	7	0,05
1	15.120	5	0,03
3	15.092	7	0,05
6	15.123	20*	0,13
20	15.307	28*	0,18

*significativo em relação ao controle, Dunnett ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Foram observadas oito anormalidades nucleares de eritrócitos (Figura 4), além do micronúcleo (Tabela 4), que podem indicar o potencial genotóxico da cipermetrina. Todos os girinos analisados apresentaram alguma anormalidade nuclear, atingindo mais de 20% do total de células analisadas na maior concentração estudada (20 µg/L), após 168 horas de exposição (Tabela 4). A ANE mais frequente em todas as concentrações foi o núcleo entalhado (6,64% do total de células analisadas), seguido do núcleo lobado (2,65%) e núcleo com bolha (1,17%) (Figura 5). Cada anormalidade foi avaliada individualmente e a maioria delas apresentou diferença significativa quando comparada ao controle em alguma das concentrações avaliadas, com exceção das células binucleadas, anucleadas e com cariólise (Tabela 5).

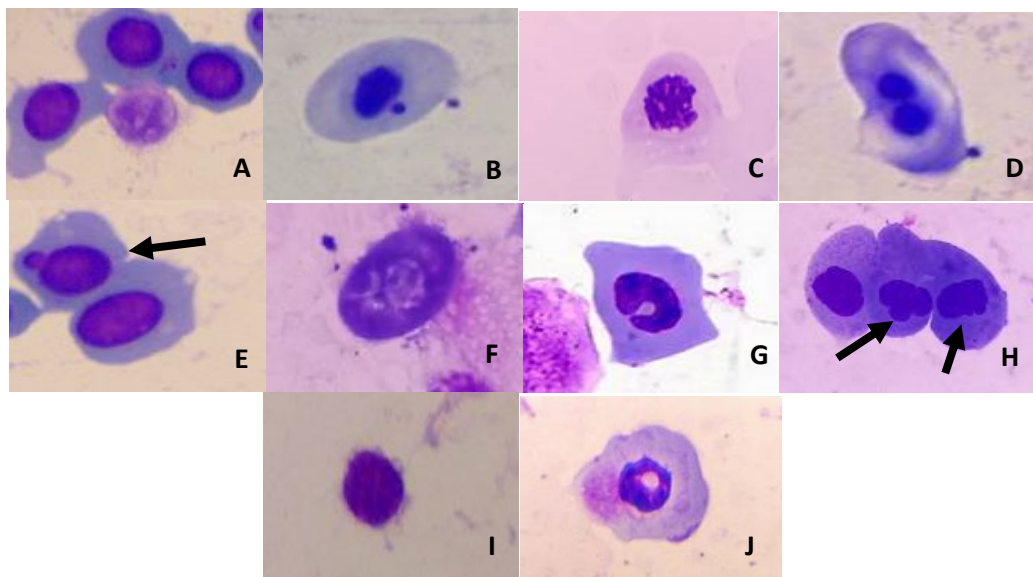


Figura 4: Micronúcleo e Anormalidades Nucleares de Eritrócitos encontradas em girinos de *P. gracilis* expostos a concentrações da formulação comercial de cipermetrina. (A) Células com núcleos normais, (B) Célula com Micronúcleo; (C) Células com Apoptose; (D) Célula Binucleada; (E) Célula com Bolha ou Broto Nuclear; (F) Células com Cariólise; (G) Célula Entalhada; (H) Células Lobadas; (I) Células com Microcitose; (J) Célula Vacuolizada. **Fonte:** Elaborado pelo autor, 2018.

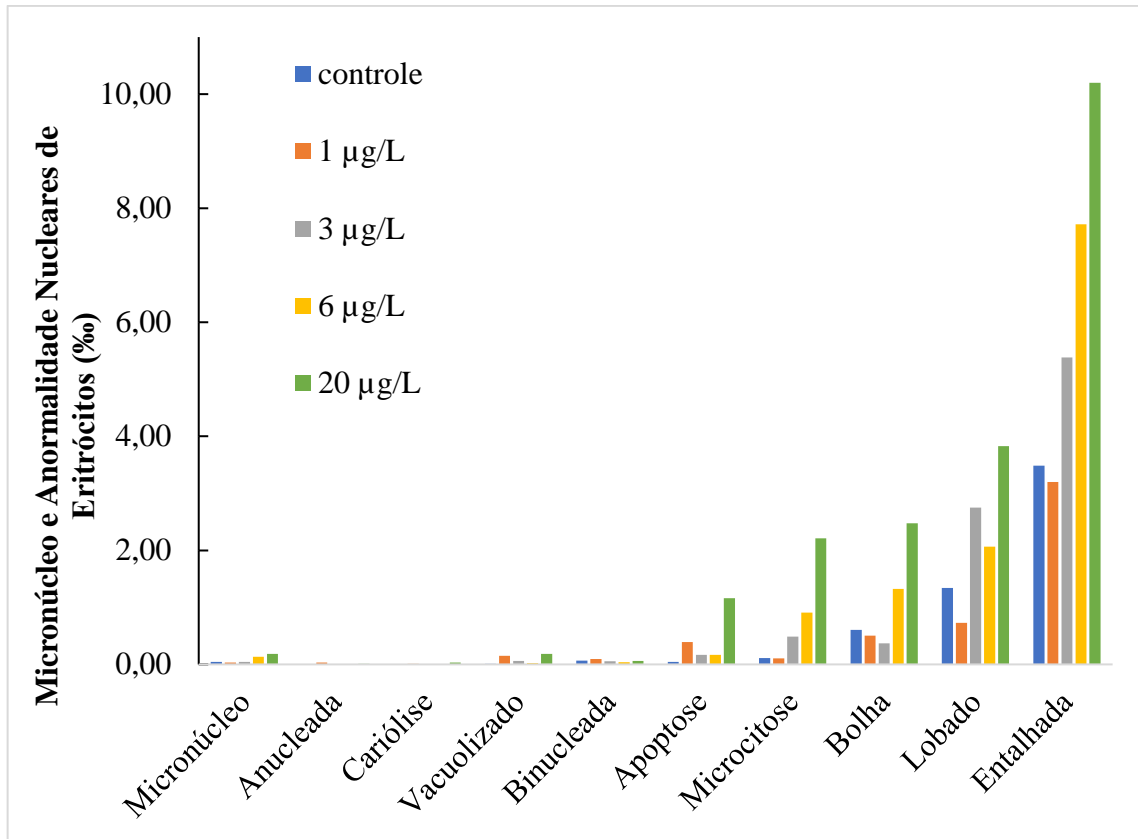


Figura 5: Número de micronúcleos e ANE's encontrados no teste de micronúcleo, de acordo com cada concentração avaliada para a formulação comercial de cipermetrina em girinos de *P. gracilis*. **Fonte:** Elaborado pelo autor, 2018.

Tabela 4: Anormalidades nucleares de eritrócitos (ANE's) encontradas no controle e nas concentrações para a formulação comercial de cipermetrina em girinos de *P. gracilis*. Média \pm desvio padrão (mínimo e máximo).

ANE	Concentração ($\mu\text{g/L}$)				
	Controle	1	3	6	20
Anucleadas	0	0,33 \pm 0,49 (0-1)	0,07 \pm 0,26 (0-1)	0,07 \pm 0,26 (0-1)	0,13 \pm 0,35 (0-1)
Apoptose	0,47 \pm 0,52 (0-1)	3,93 \pm 6,28 (0-25)	1,67 \pm 3,87 (0-15)	1,67 \pm 1,99 (0-7)	11,87 \pm 8,75 (1-33)*
Binucleadas	0,67 \pm 0,97 (0-3)	0,93 \pm 1,33 (0-5)	0,53 \pm 0,83 (0-3)	0,4 \pm 0,63 (0-2)	0,6 \pm 0,98 (0-3)
Bolha	6,13 \pm 4,29 (0-13)	5,07 \pm 3,15 (1-14)	3,73 \pm 3,45 (0-10)	13,3 \pm 0,06 (4-25)*	25,3 \pm 9 (11-40)*
Cariólise	0	0,13 \pm 0,35 (0-1)	0	0,07 \pm 0,26 (0-1)	0,33 \pm 1,05 (0-4)
Entalhadas	35 \pm 12,69 (16-53)	32,27 \pm 11,36 (13-56)	54,13 \pm 22,46 (11-86)	77,8 \pm 31,49 (34-127)*	104,07 \pm 27,40 (60-160)*
Lobadas	13,53 \pm 7,96 (2-25)	7,33 \pm 5,12 (1-17)	27,67 \pm 15,60 (5-52)*	20,8 \pm 14,62 (8-60)	39,07 \pm 16,59 (11-76)*
Microcitose	1,13 \pm 0,99 (0-3)	1,07 \pm 1,67 (0-5)	4,93 \pm 5,99 (0-23)	9,13 \pm 7,50 (1-26)*	22,53 \pm 12,11 (2-46)*
Vacuolizadas	0,13 \pm 0,35 (0-1)	1,53 \pm 1,68 (0-6)*	0,6 \pm 0,83 (0-2)	0,2 \pm 0,41 (0-1)	1,87 \pm 2,42 (0-8)*
Número de células analisadas	15.154	15.120	15.092	15.123	15.307
Total de ANE (‰)	5,71	5,25	9,32	12,38	20,24

*significativo em relação ao controle pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Tabela 5: Resultados da ANOVA e teste de Dunnett para cada anormalidade nuclear de eritrócitos em girinos de *P. gracilis* expostos a diferentes concentrações da formulação comercial de cipermetrina

ANE	Valor de F	Valor de p (ANOVA)	Valor de p (Dunnett)	Significativo para as concentrações
Anucleada	$F_{4;70} = 2,49$	$p=0,51$	-	-
Apoptose	$F_{4;70} = 11,82$	$p>0,01$	$p<0,01$	20
Binucleada	$F_{4;70} = 0,61$	$p=0,66$	-	-
Bolha	$F_{4;70} = 38,04$	$p<0,01$	$p<0,01$	6 e 20
Cariólise	$F_{4;70} = 1,11$	$p=0,36$	-	-
Entalhada	$F_{4;70} = 27,16$	$p<0,01$	$p<0,05$	3; 6 e 20
Lobada	$F_{4;70} = 13,94$	$p<0,01$	$p<0,01$	3 e 20
Microcitose	$F_{4;70} = 24,47$	$p<0,01$	$p<0,01$	6 e 20
Vacuolizada	$F_{4;70} = 4,85$	$p<0,01$	$p<0,05$	1 e 20

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Considerando a soma do número de micronúcleos e todas as anormalidades nucleares de eritrócitos, em relação ao controle, o número total de alterações celulares foi significativo ($F_{4;70} = 53,54$, $p<0,01$, significativo para as concentrações de 3, 6 e 20 $\mu\text{g/L}$, Dunnett = $p<0,01$). Observando a Figura 6 pode-se verificar que o aumento de concentração, provocou um aumento de alterações celulares em *Physalaemus gracilis*.

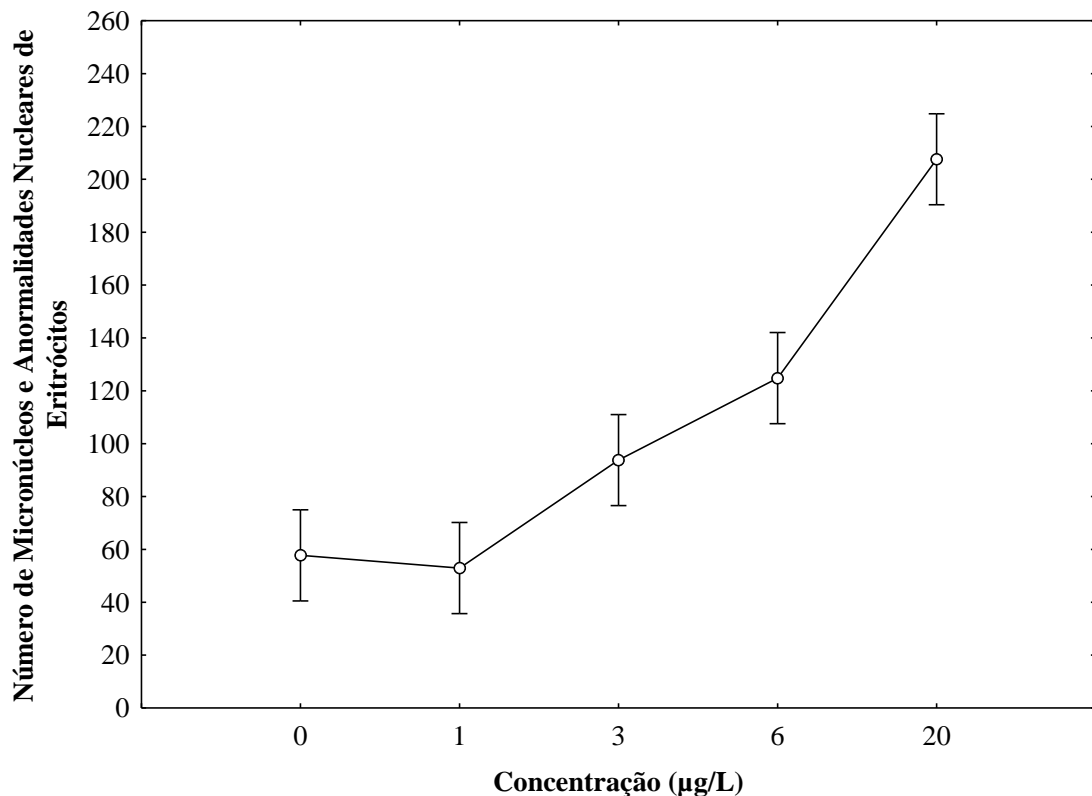


Figura 6: Micronúcleos e Anormalidades Nucleares de Eritrócitos em diferentes concentrações da formulação comercial de cipermetrina, em girinos de *P. gracilis*. Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

4.4 ANÁLISE DE RISCO ECOLÓGICO

A análise de risco agudo para a cipermetrina foi calculada através da $CL_{50;96h}$ obtida anteriormente (273,41 $\mu\text{g/L}$) e o valor máximo de cipermetrina detectada na água, na área de distribuição geográfica da espécie estudada, na concentração de 194 $\mu\text{g/L}$ (MARINO; RONCO, 2005). O valor obtido para o quociente de risco agudo (AHQ) foi de 0,71, superior ao valor de referência $LOC = 0,5$. Da mesma forma, o valor calculado para o CHQ em relação a mortalidade no teste crônico, $CHQ = 64,67$ também foi superior ao valor de referência ($LOC=1$).

Para a avaliação de risco crônico relacionada ao micronúcleo e as ANE's, as alterações celulares foram avaliadas agrupadas e também individualmente (Tabela 6). Todas as alterações apresentaram alto risco crônico para *P. gracilis*, já que apresentaram valores de CHQ superiores ao valor de referência $LOC=1$ determinado pela USEPA (1998).

Tabela 6: Valores de NOEC, LOEC, MATC e CHQ determinados para Micronúcleo e Anormalidades Nucleares de Eritrócitos calculados para girinos de *P. gracilis* submetidos a formulação comercial de cipermetrina.

	NOEC ($\mu\text{g/L}$)	LOEC ($\mu\text{g/L}$)	MATC ($\mu\text{g/L}$)	CHQ
MN+ANE's	1	3	1,73	97
Micronúcleo	3	6	4,24	64,67
Apoptose	6	20	10,95	14,92
Bolha	3	6	4,24	64,67
Entalhada	1	3	1,73	97
Lobada	1	3	1,73	97
Microcitose	3	6	4,24	64,67
Vacuolizada	-	1	1	194 ¹

¹Valor calculado utilizando LOEC

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

5 DISCUSSÃO

A toxicidade aguda determinada para a formulação comercial de cipermetrina em *Physalaemus gracilis* (273,41 $\mu\text{g/L}$) está em um valor intermediário ao registrado para outras espécies de anfíbios, mostrando que *P. gracilis* pode mesmo ser um bom bioindicador para efeitos de agrotóxicos. Quando comparado a outras espécies (Tabela 7), a CL_{50} encontrada neste estudo ficou em um valor intermediário, mostrando formulações comerciais diferentes podem apresentar diferenças na toxicidade para as espécies. Além disso, a sensibilidade das espécies também está relacionada a essa diferença na toxicidade aguda.

Tabela 7: Concentração Letal Média (CL₅₀) da cipermetrina para diferentes espécies de anfíbios anuros.

ESPÉCIE	CL₅₀ (µg/L)	REFERÊNCIA
<i>P. gracilis</i>	273,41	
<i>P. cuvieri</i>	240	WRUBLESWSKI <i>et al.</i> , 2018
<i>P. biligonigerus</i>	129	IZAGUIRRE <i>et al.</i> , 2000
<i>Duttaphrynus melanostictus</i>	3,34	DAVID <i>et al.</i> , 2012
<i>Rhinella arenarum</i>	6.430	SVARTZ; ARONZON; PÉREZ-COLL, 2016
<i>R. humboldti</i>	6.270	VELÁSQUEZ, MUÑOZ, BAUTISTA, 2017
<i>R. marina</i>	8.140	VELÁSQUEZ, MUÑOZ, BAUTISTA, 2017
<i>Boana xerophylla</i>	9.630	VELÁSQUEZ, MUÑOZ, BAUTISTA, 2017
<i>Engystomops pustulosus</i>	11.800	VELÁSQUEZ, MUÑOZ, BAUTISTA, 2017
<i>P. gracilis</i>	5.100	MACAGNAN <i>et al.</i> , 2017

Segundo a classificação da *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemical* (GHS, 2017), a formulação avaliada para cipermetrina possui alta toxicidade aguda para *P. gracilis*. Esse resultado de alta toxicidade da cipermetrina também é verificado para as espécies *P. cuvieri*, *P. biligonigerus* e *D. melanostictus*. A maioria das espécies citadas anteriormente apresenta pelo menos toxicidade moderada em relação a cipermetrina e apenas *E. pustulosus* apresentou baixa toxicidade, quando avaliada pelo GHS (2017).

Pelo menos três das espécies citadas acima podem apresentar alto risco agudo, com um quociente de risco superior ao valor de referência estabelecido pela USEPA. Utilizando a CL₅₀ determinada para elas e o valor máximo de cipermetrina na água, *P. cuvieri* (AHQ = 0,80), *P. biligonigerus* (AHQ = 1,50) e *D. melanostictus* (AHQ = 58,08), estariam em risco agudo, indicando que a cipermetrina pode causar altas taxas de mortalidade para diferentes espécies de anfíbios presentes no ambiente.

Concentrações consideradas subletais ou crônicas também causaram mortalidade considerável em *P. gracilis*. A concentração de 20 µg/L, apresentou uma taxa de mortalidade superior a 50%, em um período de sete dias. Esse resultado apresentou características de toxicidade aguda, já que matou mais da metade dos indivíduos submetidos a cipermetrina. A alta toxicidade aguda e a alta mortalidade da formulação comercial avaliada de cipermetrina são dados preocupantes, pois concentrações próximas a CL₅₀ já foram relatadas em ambientes naturais (194 µg/L) (MARINO; RONCO, 2005; CARLOS *et al.*, 2011). Além disso, o MATC calculado para a mortalidade foi de 4,24 µg/L, valor bem inferior a concentração de 20 µg/L, mostrando que os girinos de *P. gracilis* podem não suportar a presença dessa concentração no ambiente.

Além de afetar a mortalidade, cipermetrina também pode ser caracterizada como um agente genotóxico. Diferentes substâncias químicas podem apresentar afinidade de ligação com

o material genético de organismos vivos, podendo alterar ou causar danos no DNA, fazendo com que sejam conhecidos como agentes genotóxicos (DEBOER, HOEIJMAKERS, 2000; GONÇALVES, 2015). Efeitos desses agentes podem afetar o DNA, causando perda de material genético, trocas de cromátides irmãs e até mesmo desencadear processos carcinogênicos nos organismos (GONÇALVES, 2015). O micronúcleo é considerado um marcador de dano citogenético, que aparece após algum impacto relacionado a um composto genotóxico (HEDDLE *et al.*, 1991; NAQVI; SHOAIB; ALI, 2016). As duas maiores concentrações avaliadas no presente estudo apresentaram resultados significativos para a presença de micronúcleos em relação ao controle, refletindo um risco realista da cipermetrina para esta espécie de anfíbio nativo, já que essas concentrações foram registradas em águas superficiais e poderiam estar presentes no habitat de *P. gracilis*.

Todas as concentrações avaliadas também apresentaram diversas anormalidades além do micronúcleo. O aumento das concentrações de cipermetrina também provocou um aumento no aparecimento de anormalidades nucleares de eritrócitos que subiu de aproximadamente 5% no controle para 20% na concentração de 20 µg/L. Nesta última concentração, 6 das 9 ANE's analisadas foram significativas, mostrando que realmente essa quantidade de cipermetrina no ambiente aquático pode causar danos nas células de anfíbios.

Outros estudos com anfíbios corroboram com o fato de cipermetrina poder ser agente genotóxico. Cabagna *et al.* (2006) detectaram a presença de micronúcleos em *Odontophrynus americanus* devido a exposição a cipermetrina em concentrações de 5.000 e 10.000 µg/L, durante os tempos de exposição de 48 e 96 horas. O piretróide FASTAC 10 EC, em que o ingrediente ativo também é a cipermetrina, foi testado nas concentrações de 1, 5 e 10 µg/L para *Rana temporaria* e *Xenopus laevis* e induziu um aumento da frequência de micronúcleos em um tempo de exposição de 14 dias (RUDEK; ROŽEK, 1992). Das duas espécies avaliadas por Rudek e Rožek (1992), *R. temporaria* se mostrou mais sensível ao efeito mutagênico que *X. laevis*.

Em adição aos micronúcleos, Cabagna *et al.* (2006) também detectaram alterações nucleares nas células como, células binucleadas e células apoptóticas (morte celular programada). Da mesma forma, a indução de células nervosas ao processo de apoptose, provocada pela cipermetrina, foi relatada por Izaguirre *et al.* (2006) em *P. biligonigerus* e por Casco *et al.* (2006) em *R. arenarum*. Alterações na morfologia e no envoltório nuclear podem estar relacionadas com falhas na divisão celular, processo de morte celular e reações provenientes de genotoxicidade e mutagenicidade induzidas por compostos químicos

ambientais (FENECH, 2000), confirmando que anormalidades nucleares podem ser usadas como indicador de dano genotóxico, em associação ao teste de micronúcleo.

Em estudos com outros organismos aquáticos, como o peixe *Oreochromis mossambicus*, as maiores frequências de micronúcleos foram registradas após 48 horas de exposição à cipermetrina em concentrações que variaram de 0,1 a 10 µg/L (NAQVI; SHOAI; ALI, 2016). Ansari *et al.*, (2011) também detectaram aumento significativo na frequência de micronúcleos para o *Channa punctata* em 72 horas de exposição e dependente da concentração que variou de 0,4 a 1,2 µg/L. Por meio destes resultados, percebe-se que a cipermetrina tem efeito genotóxico para diversas espécies de organismos aquáticos e a análise de micronúcleos e de anormalidades nucleares de eritrócitos podem ser indicadoras de efeitos subletais em anfíbios, podendo ser aplicada em espécies nativas e populações selvagens expostas a substâncias tóxicas (FANALI *et al.*, 2018).

As concentrações crônicas avaliadas neste estudo foram inferiores ao limite permitido de cipermetrina na água definidas por alguns órgãos ambientais. O Brasil não tem determinação federal para a quantidade de cipermetrina na água, mas no estado do Rio Grande do Sul o limite é de 300 µg/L na água para consumo humano (SECRETARIA DA SAÚDE, 2014). Já a União Europeia estabelece um limite de 0,10 µg/L para a presença de agrotóxicos isolados e de 0,05 µg/L para Pesticidas Total (que significa a soma de todos os pesticidas detectados e quantificados no processo de controle) (JORNAL OFICIAL DAS COMUNIDADES EUROPEIAS, 1998).

Agrotóxicos do grupo piretróide, como a cipermetrina, destroem os canais de sódio das células, fazendo com que haja um disparo repetitivo dos neurônios. Apesar de sua relativa insolubilidade e baixa persistência em água, os piretróides são suficientemente solúveis para causar efeitos deletérios em diversos organismos aquáticos devido a sua lipofilia, que permite sua absorção por membranas e tecidos biológicos, levando a alta toxicidade para organismos não-alvo (BIGA; BLAUSTEIN, 2013).

Na avaliação de risco crônico, o valor de NOEC foi de 3 µg/L, confirmando que concentrações já encontradas em água podem apresentar risco para a espécie. Svartz, Aronzon e Pérez-Coll (2016) encontraram um NOEC relacionado a letalidade em 168 horas, para larvas de *R. arenarum* de 500 µg/L. Esse valor se encontra bem acima do encontrado para *P. gracilis*, no mesmo tempo de exposição, sugerindo que as espécies respondem de maneira diferente a cipermetrina. No entanto, no estudo de Svartz, Aronzon e Pérez-Coll (2016) em 336 horas o valor de NOEC caiu para 0,0005 µg/L, mostrando que quanto maior o tempo de exposição, menor é a concentração que pode causar efeitos deletérios na espécie.

O CHQ calculado para cipermetrina em relação a mortalidade foi de 64,67 em 168 horas, valor bem superior ao valor de referência determinado pela USEPA. Para larvas de *R. arenarum*, Svartz, Aronzon e Pérez-Coll (2016) calcularam um CHQ > 388, em um tempo de exposição de 336 horas, mostrando que esse inseticida apresenta alto risco para diferentes espécies. Levando em conta que *P. gracilis* completa a metamorfose em cerca de 30 dias (HEREK, 2017), pode-se inferir que os níveis testados de cipermetrina realmente podem alterar a população desta espécie, impedindo os indivíduos de atingir a fase adulta ou reprodutiva.

Na avaliação de risco calculada para micronúcleos e outras anormalidades nucleares de eritrócitos, os valores de CHQ variaram de 14,92 até 97, indicando que a cipermetrina representa um risco genotóxico potencial no ambiente para girinos de *P. gracilis*. A máxima concentração aceitável de toxicante determinada para *P. gracilis* em relação a mortalidade foi de 4,24 µg/L. Porém concentrações a partir de 1 µg/L apresentaram consequências genotóxicas. Esse fato pode implicar no aparecimento de girinos anormais em gerações futuras que impedem a espécie de desenvolver de maneira saudável no seu habitat.

6 CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho evidenciam a alta toxicidade a nível letal e subletal da formulação comercial de cipermetrina para *P. gracilis*. O inseticida apresentou alto risco agudo e crônico para os girinos da espécie, mostrando que concentrações ambientalmente relevantes e permitidas pela legislação podem provocar altas taxas de mortalidade e diversas outras consequências negativas a longo prazo. A presença significativa de micronúcleos e anormalidades nucleares de eritrócitos nas células de *P. gracilis* detectados nesse estudo, alertam para a genotoxicidade da substância e para as possíveis consequências da exposição dos girinos.

São necessários outros estudos para avaliar a toxicidade do inseticida para anfíbios, já que concentrações encontradas no ambiente provocaram altas taxas de mortalidade e apresentam risco potencial para *P. gracilis*. Pesquisas que envolvam espécies de anfíbios devem ser incentivadas devido a escassez de dados sobre esses organismos, principalmente sobre espécies brasileiras.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANSARI, R. A.; RAHMAN, S.; KAUR, M.; ANJUM, S.; RAISUDDIN, S. In vivo cytogenetic and oxidative stress-inducing effects of cypermethrin in freshwater fish, *Channa*

punctata Bloch. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 1, p.150-156, 2011. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.08.036>.

ANVISA. **C10 – Cipermetrina**, 2018. Disponível em: <
<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/C10%2B%2BCipermetrina.pdf/37400888-3f11-44ed-b53f-dea1abacb865>>. Acesso em: 8 jun. 2018.

BELLUTA, I.; ALMEIDA, A. A.; COELHO, J. C.; NASCIMENTO, A. B.; SILVA, A. M. M. Avaliação temporal e espacial no córrego do Cintra (Botucatu-SP) frente aos defensivos agrícolas e parâmetros físico-químicos de qualidade da água – um estudo de caso. *Revista Energia na Agricultura*, v. 25, n. 2. P. 54-73, 2010.

BIGA, L. M.; BLAUSTEIN, A. R. Variations in lethal and sublethal effects of cypermethrin among aquatic stages and species of anuran amphibians. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 32, n. 12, p. 2855-2860, 2013. Doi: <http://dx.doi.org/10.1002/etc.2379>.

BORGES-MARTINS, M.; COLOMBO, P.; ZANK, C.; BECKER, F. G.; MELO, M. T. Q. Anfíbios. In: BECKER, F.G.; RAMOS & L.A. MOURA (Org.) Biodiversidade: Regiões da Lagoa do Casamento e dos Butiazais de Tapes, Planície Costeira do Rio Grande do Sul. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, 2007, p. 276291.

BRADBERRY, S. M.; CAGE, S. A.; PROUDFOOT, A. T.; VALE, J. A. Poisoning due to Pyrethroids. **Toxicological Reviews**, v. 24, n. 2, p. 93-106, 2005.

CABAGNA, M. C.; LAJMANOVICH, R. C.; PELTZER, P. M.; ATTADEMO, A. M.; ALE, E. Induction of micronuclei in tadpoles of *Odontophrynus americanus* (Amphibia: Leptodactylidae) by the pyrethroid insecticide cypermethrin. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 88, n. 4, p.729-737, 2006.

CARLOS, E. A.; NEVES, A. A.; REIS, C.; QUEIROZ, M. E. L. R. Determination of trihalomethanes and pesticides in water by gas chromatography. **Química Nova**, v. 34, n. 2, p. 272-278, 2011. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422011000200019>.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M. S. Assessment of the piscine micronucleus test as an in siter biological indicator of chemical contaminant effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 47, p. 2123-2436, 1990. Doi: <https://doi.org/10.1139/f90-237>.

CASCO, V. H.; IZAGUIRRE, L. M.; VERGARA, M. N.; LAJMANOVICH, R. C.; PELTZER, P.; SOLER, A. P. Apoptotic cell death in the central nervous system of *Bufo arenarum* tadpoles induced by cypermethrin. **Cell Biology and Toxicology**, v. 22, n. 3, p.199-211, 2006. Doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s10565-006-0174-1>.

CHMIELEWSKA, M.; DEDUKH, D.; HACZKIEWICZ, K.; ROZENBLUT-KOSCISTY, B.; KAZMIERCZAK, M.; KOLENDA, K.; SERWA, E.; PIETRAS-LEBIODA, A.; KRASIKOVA, A.; OGIELSKA, M. The programmed DNA elimination and formation of micronuclei in germ line cells oh the natural hybridogenetic water frog *Pelophylax esculentus*. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-19, 2018. Doi: [10.1038/s41598-018-26168-z](https://doi.org/10.1038/s41598-018-26168-z).

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Gabinete do Ministro. Resolução Normativa nº 37, de 15 de fevereiro de 2018. Baixa a Diretriz da Prática de Eutanásia. **Diário Oficial da União**, Brasília, 22 fev. 2018.

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, L. G. The neurotoxicity of organochlorine and pyrethroid pesticides. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 131, p. 135-148, 2015. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-444-62627-1.00009-3>.

CYPERMETHRIN. **Pesticide information profile**. 1993. Disponível em: <<http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/extoxnet/carbaryl-dicrotophos/cypermet-ext.html>>. Acesso em: 20 maio 2017.

DAVID, M.; MARIGOUDAR, S. R.; PATIL V. K.; HALAPPA, R. Behavioral, morphological deformities and biomarkers of oxidative damage as indicators of sublethal cypermethrin intoxication on the tadpoles of *D. melanostictus* (Schneider, 1799). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 103, n. 2, p. 127-134, 2012. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.04.009>.

DE BOER, J.; HOEIJMAKERS, H. J. Nucleotide excision repair and human syndromes. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 3, p. 453-460, 2000. Doi: [doi:10.1093/carcin/21.3.453](https://doi.org/10.1093/carcin/21.3.453).

DIAMOND, M. L.; WIT, C. A.; MOLANDER, S.; SCHERINGER, M.; BACKHAUS, T.; LOHMANN, R.; ARVIDSSON, R.; BERGMAN, A.; HAUSCHILD, M.; HOLOUBEK, I.; PERSSON, L.; SUZUKI, N.; VIGHI, M.; ZETZSCH, C. Exploring the planetary boundary for chemical pollution. **Environment Internacional**, v. 78, p. 8-15, 2015. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2015.02.001>.

ETCHEGOYEN, M.; RONCO, A. E.; ALMADA, P.; ABELANDO, M.; MARINO, D. J. Occurrence and fate of pesticides in the Argentine stretch of the Paraguay-Paraná basin. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 189, n. 2, p.1-12, 2017.

FANALI, L. Z.; FRANCO-BELUSSI, L.; BONINI-DOMINGOS, C. R.; OLIVEIRA, C. Effects of benzo[a]pyrene on the blood and liver of *Physalaemus cuvieri* and *Leptodactylus fuscus* (Anura: Leptodactylidae). **Environmental Pollution**, v. 237, p. 93-102, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2018.02.030>.

FAVRETTO, M. A. (Org.) **Parque natural municipal Rio do Peixe, Joaçaba, SC: Fauna de Vertebrados**. 1ª ed. Joaçaba: Ed. Do Autor, 2011. 207 f.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research/Fundamenta and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1-2, p. 81-95, 2000. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00065-8](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00065-8).

FENECH, M.; KIRSCH-VOLDERS, M.; NATARAJAN, A. T.; SURRALLE, J.; CROTT, J. W.; PARRY, J.; NORPPA, H.; EASTMOND, D. A.; TUCKER, J. D.; THOMAS, P. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 125-132, 2011. Doi: [10.1093/mutage/geq052](https://doi.org/10.1093/mutage/geq052).

FENG, S.; KONG, Z.; WANG, X.; ZHAO, L.; PENG, P. Acute toxicity and genotoxicity of two novel pesticides on amphibian, *Rana N. Hallowell*. **Chemosphere**, v. 5, n. 4, p. 457-463, 2004. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.02.010>.

FROST, D. **Amphibian Species of the World: an Online Reference**. Version 6.0, American Museum of Natural History, New York, 2018. Disponível em: <
<http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/Amphibia/Anura/Leptodactylidae/Leiuperinae/Physalaemus/Physalaemus-gracilis>>. Acesso em: 15 maio 2018.

GHISI, N. C.; OLIVEIRA, E. C.; PRIOLI, A. J. Does exposure to glyphosate lead to an increase in the micronuclei frequency? A systematic and meta-analytic review. **Chemosphere**, v. 145, p. 42-54, 2016. Doi:
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.11.044>.

GHS. **Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals**. Seventh Revised Edition. United Nations, New York and Geneva, 2017. 493 p. Disponível em: https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev07/07files_e0.html. Acesso em: 05 jun. 2018.

GONÇALVES, M. W. **Alterações genômicas e mutagênicas em duas espécies de anfíbios anuros**. 2015. 63 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.

GOSNER K. L. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. **Herpetologica**, v. 16, n.3, p. 183-189, 1960.

GREULICH, K.; PFLUGMACHER, S. Differences in susceptibility of various life stages of amphibians to pesticide exposure. **Aquatic Toxicology**, v. 65, p. 329-336, 2003. Doi:
[10.1016/S0166-445X\(03\)00153-X](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(03)00153-X).

GREULICH, K.; PFLUGMACHER, S. Uptake and effects on detoxication enzymes of cypermethrin in embryos and tadpoles of amphibians. **Archives Environmental Contamination and Toxicology**, v. 47, p. 489-495, 2004. Doi: [10.1007/s00244-004-2302-3](https://doi.org/10.1007/s00244-004-2302-3).

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THRUSTON, R. V. Trimmed Spearman-Kärber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science and Technology**, v. 1, n. 7, p. 714-718, 1977.

HAYES, T. B.; FALSO, P.; GALLIPEAU, S.; STICE, M. The cause global amphibian declines: a developmental endocrinologist's perspective. **The Journal of Experimental Biology**, v. 213, p. 921-933, 2010. Doi: [10.1242/jeb.040865](https://doi.org/10.1242/jeb.040865).

HEDDLE, J. A.; CIMINO, M. C.; HAYASHI, M.; ROMAGNA, F.; SHELBY, M. D.; TUCKER, J. D.; VANPARYS, P.; MACGREGOR, J. T. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 18, n. 4, p. 277-291, 1991. Doi: <https://doi.org/10.1002/em.2850180414>.

HEREK, J. **Glifosato e seus efeitos sobre duas espécies de anfíbios nativos da América do Sul *Physalaemus cuvieri* e *Physalaemus gracilis***. 2017. 110 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Federal da Fronteira Sul, Erechim, 2017.

IZAGUIRRE, M. F.; LAJMANOVICH, R. C.; PELTZER, P. M.; SOLER, A. P.; CASCO, V. H. Cypermethrin-Induced apoptosis in the telencephalon of *Physalaemus biligonigerus* tadpoles (Anura: Leptodactylidae). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 65, p. 501-507, 2000. Doi: [10.1007/s001280000152](https://doi.org/10.1007/s001280000152).

IZAGUIRRE, M. F.; MARÍN, L.; VERGARA, M. N.; LAJMANOVICH, R. C.; PELTZER, P.; CASCO, V. H. Modelos experimentales de anuros para estudiar los efectos de piretroides. **Ciencia, Docencia y Tecnología**, n. 32, p. 181-206, 2006.

JING, X.; YAO, G.; LIU, D.; LIU, C.; WANG, F.; WANG, P.; ZHOU, Z. Exposure of frogs and tadpoles to chiral herbicide fenoxaprop-ethyl. **Chemosphere**, v. 186, p. 832-838, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.132>.

JONES, D. **Environmental Fate of Cypermethrin**. Environmental Monitoring and Pest Management. Branch, Department of Pesticide Regulation, Sacramento, California, USA, 1995.

JORNAL OFICIAL DAS COMUNIDADES EUROPEIAS. **Diretiva 98/83/CE**, do Conselho, de 3 de novembro de 1998, L 330.

JOSENDE, M. E.; TOZETTI, A. M.; ALAHAN, M. T.; MATHIES FILHO, V.; XIMENEZ, S. S.; SILVA JÚNIOR, F. M. R.; MARTINS, S. E. Genotoxic evaluation in two amphibian species from Brazilian subtropical wetlands. **Ecological Indicators**, v. 49, p. 83-87, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2014.10.007>.

KAMRIN, M. A. **Pyrethroids and other botanicals**. In: Pesticides profiles: toxicity, environmental impact, and fate. Boca Raton: Lewis Publishers, 1997, p. 15-50. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?id=8IM_A0aTM6UC&pg=PA25&dq=half+life+cyp+ermethrin+water&hl=pt-BR&sa=X&ved=0ahUKEwillf6QIZbUAhVBhpAKHRrXD3gQ6AEIJzAA#v=onepage&q&f=false>. Acesso em: 15 jun. 2017.

KHAN, M. Z.; TABASSUM, R.; NAQVI, S. N. H.; SHAH, E. Z.; TABASSUM, F.; AHMAD, I.; FATIMA, F.; KHAN, M. F. Effect of cypermethrin and permethrin on cholinesterase activity and protein contents in *Rana tigrina* (Amphibia). **Turkish Journal of Zoology**, v. 27, p. 243-246, 2003.

KÖLER, H. R.; TRIEBSKORN, R. Wildlife ecotoxicology of pesticides: can we track effects to the population level and beyond? **Science**, v. 341, p. 759-765, 2013. Doi: 10.1126/science.1237591.

LAJMANOVICH, R. C.; JUNGES, C. M.; ATTADEMO, A. M.; PELTZER, P.; CABAGNA-ZENKLUSEN, M. C.; BASSO, A. Individual and Mixture Toxicity of Commercial Formulations Containing Glyphosate, Metsulfuron-Methyl, BispyribacSodium, and Picloram on *Rhinella arenarum* Tadpoles. *Water, Air, & Soil Pollution*, v. 224, n. 3, p.1-13, 2013. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11270-012-1404-1>.

LAVILLA, E.; KWET, A.; SEGALLA, M. V.; LANGONE, J.; BALDO, D. *Physalaemus gracilis*. **The IUCN Red List of Threatened Species**, 2010. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/details/57258/0>>. Acesso em: 20 abr. 2017.

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 diferente pesticide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 136, p. 84-91, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.10.035>.

MACAGNAN, N.; RUTKOSKI, C. F.; KOLCENTI, C.; VANZETTO, G. V.; MACAGNAN, L. P.; STURZA, P. F.; HARTMANN, P. A.; HARTMANN, M. T. Toxicity of cypermethrin and deltamethrin insecticides on embryos and larvae of *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 25, p. 20699-20704, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9727-5>.

MARINO, D.; RONCO, A. Cypermethrin and chlorpyrifos concentration levels in surface water bodies of the Pampa Ondulada Argentina. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 75, n. 4, p. 820-826, 2005. Doi: [10.1007/s00128-005-0824-7](https://doi.org/10.1007/s00128-005-0824-7).

MORETTO, A. Organochlorine and Pyrethroid Insecticides. **Comprehensive Toxicology**, p. 242-258, 2018. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-801238-3.65834-8>.

NATALE, G. S.; VERA-CADIOTI, J.; ARCAUTE, C. R.; SOLONESKI, S.; LARRAMENDY, M. L. Lethal and sublethal effects of the pirimicarb-based formulation Aficida® on *Boana pulchella* (Duméril and Bibron, 1841) tadpoles (Anura, Hylidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 147, p. 471-479, 2018. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.09.007>.

NAQVI, G.; SHOAIB, N.; ALI, A. M. Genotoxic potential of pesticides in the peripheral blood erythrocytes of fish (*Oreochromis mossambicus*). **Pakistan Journal of Zoology**, v. 48, n. 6, p. 1643-1648, 2016.

PARAVANI, E. V.; SIMONIELLO, M. F.; POLETTA, G. L.; ZOLESSI, F. R.; CASCO, V. H. Cypermethrin: Oxidative stress and genotoxicity in retinal cells of the adult zebrafish. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 826, p. 25-32, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2017.12.010>.

PÉREZ-IGLESIAS, J.; ARCAUTE, C. R.; NIKOLOFF, N.; DURHAY, L.; SOLONESKI, S.; NATALE, G. S.; LARRAMENDY, M. L. The genotoxic effects of the imidacloprid-based insecticide formulation Glacoxan Imida on Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 104, p. 120-126, 2014. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.03.002>.

PÉREZ-IGLESIAS, J.; SOLONESKI, S.; NIKOLOFF, N.; NATALE, G. S.; LARRAMENDY, M. L. Toxic and genotoxic effects of the imazethapyr-based herbicide formulation Pivot H® on Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 119, p. 15-24, 2015. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.04.045>.

PÉREZ-IGLESIAS, J. M.; NATALE, G. S.; SOLONESKI, S.; LARRAMENDY, M. L. Are the damaging effects induced by the imazethapyr formulation Pivot® H in *Boana pulchella* (Anura) reversible upon ceasing exposure? **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 148, p. 1-10, 2018. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.10.009>.

PIMPÃO, C. T. **Avaliação aguda dos efeitos toxicológicos da deltametrina em uma espécie de peixe fluvial nativo: Estudo bioquímico e imunotóxico**. 2006. 102 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

RUDEK, Z.; ROEŹK, M. Induction of micronuclei in tadpoles of *Rana temporaria* and *Xenopus laevis* by the pyrethroid Fastac 10 EC. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 298, n. 1, p. 25-29, 1992. Doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0165-1218\(92\)90025-u](http://dx.doi.org/10.1016/0165-1218(92)90025-u).

- RUTKOSKI, C. F.; MACAGNAN, N.; KOLCENTI, C.; VANZETTO, G. V.; STURZA, P. F.; HARTMANN, P. A.; HARTMANN, M. T. Lethal and Sublethal Effects of the Herbicide Atrazine in the Early Stages of Development of *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 74, n. 4, p. 587-593, 2018. Doi: 10.1007/s00244-017-0501-y.
- SAHA, S.; KAVIRAJ, A. Acute toxicity of synthetic pyrethroid cypermethrin to some freshwater organisms. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 80, n. 1, p. 49-52, 2007. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00128-007-9314-4>.
- SANTOS, M. A. T.; AREAS, M. A.; REYES, F. G. Piretróides: uma visão geral. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 18, n. 3, p.339-349, 2007.
- SECRETARIA DA SAÚDE. Gabinete da Secretária. Portaria nº 320, de 24 de abril de 2014. Estabelece parâmetros adicionais de agrotóxicos ao padrão de potabilidade para substâncias químicas, no controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano no RS. **Diário Oficial do Estado do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, 28 abr. 2014.
- SHI, X.; GU, A.; JI, G.; LI, Y.; DI, J.; JIN, J.; HU, F.; LONGO, Y.; XIA, Y.; LU, C.; CANÇÃO, L.; WANG, S.; WANG, X. Developmental toxicity of cypermethrin in embryol-arval stages of zebrafish. **Chemosphere**, v. 85, n. 6, p. 1010-1016, 2011. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.07.024>.
- SOLONESKI, S.; ARCAUTE, C. R.; LARRAMENDY, M. L. Genotoxic effect of a binary mixture of dicamba-and glyphosate-based comercial herbicide formulations on *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867) (Anura, Bufonidae) late-stage larvae. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 17, p. 17811-17821, 2016. Doi: 10.1007/s11356-016-6992-7.
- SVARTZ, G.; ARONZON, C.; PÉREZ-COLL, C. Comparative sensitivity among early life stages of the South American toad to cypermethrin-based pesticide. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 3, p. 2906-2913, 2016. Doi: 10.1007/s11356-015-5547-7.
- TAJU, G.; ABDUL MAJEED, S.; MAMBI, K. S. N.; FAROOK, M. A.; VIMAL, S.; SAHUL HAMEED, A. S. In vitro cytotoxic, genotoxic and oxidative stress of cypermethrin on five fish cell lines. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 113, p. 15-24, 2014. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.06.006>.
- USEPA. Environmental Protection Agency. **Guidelines for ecological risk assessment**. EPA/630/R-95/002F. U.S.EPA. Risk Assessment Forum. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency, 1998. 188 p.
- VELÁSQUEZ, T. M. T.; MUÑOZ, L. M. H.; BAUTISTA, M. H. B. TOXICIDAD AGUDA DEL INSECTICIDA CIPERMETRINA (CYPERMON® 20 EC) EN CUATRO ESPECIES DE ANUROS COLOMBIANOS. **Acta Biológica Colombiana**, v. 22, n. 3, p. 340-347, 2017. Doi: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v22n3.62631>.
- VELISEK, J.; WLASOW, T.; GOMULKA, P.; SVOBODOVA, Z.; DOBSIKOVA, R.; NOVOTNY, L.; DUDZIK, M. Effects of cypermethrin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Veterinarni Medicina**, v. 51, n. 10, p. 469-476, 2006. Doi: 10.17221/5580-vetmed.

VELISEK, J.; JURCIKOVA, J.; DOBSIKOVA, R.; PIACKOVA, V.; MACHOVA, J.; NOVOTNY, L. Effects of deltamethrin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 23, p. 297-301, 2007. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2006.11.006>.

WAGNER, N.; ZÜGHART, W.; MINGO, V.; LÖTTERS, S. Are deformation rates of anuran developmental stages suitable indicators for environmental pollution? Possibilities and limitations. **Ecological Indicators**, v. 45, p. 394-401, 2014. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolind.2014.04.039>.

WRUBLESWSKI, J.; REICHERT JR, F. W.; GALON, L.; HARTMANN, P. A.; HARTMANN, M. T. Acute and chronic toxicity os pesticides on tadpoles of *Physalaemus curvieri* (Anura, Leptodactylidae). **Ecotoxicology**, v. 27, n. 3, p. 369-368, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10646-018-1900-1>.

WU, J.; LU, J.; LU, H.; LIN, Y.; W. P. C. Occurrence and ecological risks from fipronil in aquatic environments located within residential landscapes. **Science of the Total Environment**, v. 518-519, p. 139-147, 2015. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.12.103>.

ZANK, C.; ANÉS, A. C.; COLOMBO, P.; MARTINS, M. B. **Anfibios**. 2014. Disponível em: < https://www.researchgate.net/publication/269697878_Anfibios>. Acesso em: 2 maio 2017.

CAPÍTULO II – O INSETICIDA FIPRONIL É TÓXICO PARA ANFÍBIOS? AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE UMA FORMULAÇÃO COMERCIAL DO INSETICIDA FIPRONIL EM GIRINOS DE *PHYSALAEMUS GRACILIS*

RESUMO

O uso indiscriminado de agrotóxicos vem sendo considerado uma ameaça ao ecossistema aquático e a diversas espécies de organismos não-alvo e apontado como um dos motivos para redução do número de espécies de anfíbios no ambiente. Esse tipo de substância pode se difundir até duas vezes mais rápido que em mamíferos. O fipronil é considerado um potencial contaminante e foi detectado em água superficiais brasileiras. No entanto, poucos estudos foram realizados para determinar os efeitos do fipronil sobre as espécies de anfíbios. Dessa forma, o objetivo do estudo foi avaliar a toxicidade de uma formulação comercial de fipronil sob a espécie de anuro *P. gracilis*. As desovas da espécie foram coletadas na natureza com menos de 24 horas de ovoposição e mantidas sob condições controladas no laboratório até atingirem a fase de desenvolvimento 25. Nesse estudo, a toxicidade aguda foi avaliada em um período de 96 horas em concentrações que variaram de 2.500 até 70.000 µg/L e a toxicidade crônica em um período de 7 dias, nas concentrações de 50, 100, 500 e 1.500 µg/L. O mesmo número de girinos foi avaliado nos dois tipos ensaios, sendo 60 girinos divididos em 6 réplicas. Além disso, a formulação comercial de fipronil também foi avaliada através do teste de micronúcleo e de outras anormalidades nucleares de eritrócitos, em que 15 girinos foram utilizados para análise. Não foi possível determinar a $CL_{50;96h}$ do fipronil para *P. gracilis* devido à baixa mortalidade registrada durante o ensaio. No ensaio crônico, não se observou nenhuma alteração significativa na atividade natatória e nenhuma malformação na boca. Entretanto, malformações no intestino foram registradas em aproximadamente 50% dos girinos avaliados, fato que pode dificultar a sobrevivência dos girinos em ambiente natural. No teste de micronúcleo, apenas a maior concentração (1500 µg/L) apresentou resultado significativo para a presença de micronúcleos e para 7 das 9 anormalidades analisadas. Entretanto, a avaliação de risco apontou um baixo risco da formulação comercial de fipronil para a espécie. Pode-se concluir que o fipronil apresentou baixa toxicidade para *P. gracilis*. No entanto, não se pode afirmar a segurança do uso da substância, tornando necessário a realização de outros estudos se fazem necessários para avaliar o efeito do inseticida sobre outras espécies de anfíbios presente no ambiente.

Palavras-chave: Efeitos subletais. Alterações morfológicas. Micronúcleo. Anormalidades Nucleares de Eritrócitos.

ABSTRACT

The use of indiscriminate pesticides has been considered a threat to the aquatic ecosystem and to several species of non-target organisms and is one of the reasons for reducing the number of amphibian species in the environment. This type of substance can diffuse up to twice as fast as in mammals. Fipronil is considered a potential contaminant and has been detected in Brazilian surface water. However, few studies have been conducted to determine the effects of fipronil on amphibian species. Thus, the objective of the study was to evaluate the toxicity of a commercial formulation of fipronil under the species of anuro *P. gracilis*. The spawning of the species was collected in the wild with less than 24 hours of exposure and kept under controlled conditions in the laboratory until reaching development stage 25. In that study, acute toxicity was evaluated over a 96-hour period in concentrations ranging from 2,500 up to 70,000 $\mu\text{g} / \text{L}$ and chronic toxicity over a period of 7 days at concentrations of 50, 100, 500 and 1,500 $\mu\text{g} / \text{L}$. The same number of tadpoles was evaluated in both types of trials, with 60 tadpoles divided into 6 replicates. In addition, the commercial formulation of fipronil was also evaluated by the micronucleus test and other nuclear erythrocyte abnormalities, in which 15 tadpoles were used for analysis. The LC50; 96h of fipronil for *P. gracilis* could not be determined because of the low mortality recorded during the test. In the chronic study, there was no significant change in swimming activity and no malformation in the mouth. However, malformations in the intestine were recorded in approximately 50% of the evaluated tadpoles, a fact that may hinder the survival of tadpoles in the natural environment. In the micronucleus test, only the highest concentration (1500 $\mu\text{g} / \text{L}$) presented a significant result for the presence of micronuclei and for 7 of the 9 analyzed abnormalities. However, the risk assessment indicated a low risk of the commercial formulation of fipronil for the species. It can be concluded that fipronil presented low toxicity to *P. gracilis*. However, it is not possible to assert the safety of the use of the substance, making it necessary to carry out other studies if necessary to evaluate the effect of the insecticide on other species of amphibians present in the environment.

Keywords: Sublethal effects. Morphological changes. Micronucleus. Nuclear Abnormalities of Erythrocytes.

1 INTRODUÇÃO

O uso inadequado de agrotóxicos gera impactos negativos aos ambientes naturais, em função de sua atuação direta sobre a biodiversidade ou sobre as suas bases genéticas (OMITOYIN *et al.*, 2006; NAQVI; SHOAIB; ALI, 2016). O uso desses produtos tem efeitos negativos sobre espécies não-alvo que habitam ou ocupam esporadicamente estas paisagens paisagem (MANN *et al.*, 2009). Os agrotóxicos são apontados como causa potencial do declínio de anfíbios, agindo isoladamente ou em combinação com outros estressores presentes no ambiente (MANN *et al.*, 2009; BABALOLA; VAN WYK, 2018; WELTJE *et al.*, 2018). Essas substâncias são tóxicas, apresentam diferentes graus de persistências e mobilidade no ambiente e tem potencial carcinogênico, mutagênico e teratogênico (SILVA *et al.*, 2011). Podem promover alterações de comportamento e malformações, limitar o sucesso reprodutivo (JOSENDE, 2015) e diminuir a conectividade entre habitats e populações (FICETOLA; DI BERNARDI, 2004).

Os anfíbios são um grupo de vertebrados nos sistemas ecológicos neotropicais, pois constituem uma porção significativa da biomassa em muitas comunidades e são base alimentar para diversas outras espécies (JOHNSON *et al.*, 2016). São organismos não-alvo constantemente expostos aos agrotóxicos e que podem funcionar como bioindicadores devido a sua capacidade de integrar estressores de ecossistemas aquáticos e terrestres (GLINSKI *et al.*, 2018). São ectotérmicos, podem realizar a troca cutânea de gás e água ou respirar através de pulmões (WELTJE *et al.*, 2018). Passam os estágios iniciais de vida em ambientes aquáticos e quando adultos em ambientes terrestres, ou em ambos de acordo com as exigências fisiológicas e reprodutivas de cada espécie (YOUNG *et al.*, 2004; CRUZ-ESQUIVEL; VILORIA-RIVAS; MARRUGO-NEGRETE, 2017).

Em função destas características servem como modelo de avaliação da instabilidade morfológica, etológica, fisiológica e genômica induzida (AGOSTINI, 2013). O contato dérmico direto com agrotóxicos apresenta uma rota de exposição potencialmente significativa, já que a pele dos anfíbios é usada para troca de gás e de água, aumentando a suscetibilidade a agrotóxicos e outros contaminantes (VAN METER *et al.*, 2015). Após a absorção, os anfíbios gastam energia para restabelecer seu equilíbrio fisiológico e esse gasto de energia pode causar atrasos no desenvolvimento, crescimento e na mobilidade (GREULICH; PFLUGMACHER, 2004).

Milhões de toneladas de agrotóxicos se acumulam e permeiam habitats de anfíbios e são transportados para diversas áreas, em que baixos níveis podem prejudicar esses animais

(BLAUSTEIN; JOHNSON, 2003). Agrotóxicos podem se difundir em anfíbios uma ou duas vezes mais rápido do que em mamíferos, dependendo da hidrofobicidade da espécie (QUARANTA *et al.*, 2009). Isso pode se dar devido a sua pele altamente permeável (HAYES e al., 2010; WAGNER *et al.*, 2013) que está fisiologicamente envolvida na troca de gás, água e eletrólitos com o meio ambiente (QUARANTA *et al.*, 2009). Associada a permeabilidade da pele, a dieta dos anfíbios também facilita a absorção de contaminantes (MCCOMB *et al.*, 2008).

O fipronil ou (RS)-5-amino-1-(2,6-dichloro- α,α,α -trifluoro-p-tolyl)-4-trifluoro methylsulfinylpyrazole-3-carbonitrile (ANVISA, 2017) é um inseticida de amplo espectro, do grupo químico fenilpirazol (ROBERTS; REIGART, 2013) usado para pragas em culturas agrícolas e para tratamentos de gramado, para o controle de formigas e baratas sob a forma de estações de isca e como uma aplicação tópica para animais domésticos para controle de pulgas (ROBERTS; REIGART, 2013). É um potencial contaminante que pode ser encontrado em águas superficiais brasileiras em concentrações que variam de 0,04 $\mu\text{g/L}$ a 26,2 $\mu\text{g/L}$ (SILVA *et al.*, 2009; MARCHESAN *et al.*, 2010; ALBUQUERQUE *et al.*, 2016; VIEIRA *et al.*, 2017). Foi detectado em uma concentração de 0,04 $\mu\text{g/L}$ em amostras de água de mananciais do estado do Paraná (VIEIRA *et al.*, 2017), 0,026 $\mu\text{g/L}$ a 3,45 $\mu\text{g/L}$ em regiões produtoras de arroz (SILVA *et al.*, 2009) e de 0,05 $\mu\text{g/L}$ até 26,2 $\mu\text{g/L}$ na água do rio Vacacaí-Mirim, no Rio Grande do Sul, (MARCHESAN *et al.*, 2010).

Esse inseticida possui fórmula molecular $\text{C}_{12}\text{H}_4\text{Cl}_2\text{F}_6\text{N}_4\text{OS}$, sendo classificado toxicologicamente como Classe II – altamente tóxico (ANVISA, 2017) e classificado como carcinógeno humano (FENT, 2014). A meia vida de hidrólise do fipronil é superior a 100 dias em condições de pH entre 5,5 e 7,0 (GUNASEKARA *et al.*, 2007) e apresenta densidade de 1,62 g/mL a 20°C (TINGLE *et al.*, 2003), solubilidade em água de 1,9 mg/L em pH 5 e 2,4 mg/L em pH 9 a 20°C, ponto de fusão de 195,5 - 203°C e pressão de vapor de $2,8 \times 10^{-9}$ mm Hg a 25°C (JACKSON *et al.*, 2009).

O inseticida atua no sistema nervoso central inibindo o receptor gama amino butírico (GABA) associado aos canais de cloreto de insetos (MARTINS, 2009; ROBERTS; REIGART, 2013). A molécula de fipronil inibe de forma não-competitiva o receptor do GABA, fixando-se na porção internalizada deste receptor ionotrópico, inibindo o influxo celular dos íons cloro, anulando assim o efeito neuro-regulador do GABA e resultando em atividade neural excessiva, o aumento da atividade neural causa paralisia e, conseqüentemente, a morte do organismo exposto (CHAGURI, 2016). Estudos em animais demonstram que o fipronil tem uma toxicidade seletiva maior para os insetos que em mamíferos, em função da afinidade mais

seletiva para os canais de GABAA de insetos do que os canais GABA de vertebrados (ROBERTS; REIGART, 2013).

Apesar de vários estudos apontarem que os agrotóxicos podem levar a diversos efeitos deletérios em organismos aquáticos, com diversas evidências de que a maioria deles está atingindo os anfíbios, poucos estudos foram realizados para determinar as consequências negativas do fipronil sobre os girinos (BOSCOLO *et al.*, 2017). Margarido *et al.* (2013) perceberam que o fipronil pode ter influência sobre o metabolismo dos girinos de *Scinax fuscovarius*, alterando respostas bioquímicas aumentando sua susceptibilidade a contaminantes ambientais. Em girinos de *Physalaemus nattereri*, o fipronil também provocou estresse oxidativo quando foram expostos a concentrações ambientalmente relevantes, mostrando que a longo prazo pode provocar danos a nível de população (GRIPP *et al.*, 2017). O fipronil também prejudicou o sistema antioxidante de *P. nattereri* e acelerou a metamorfose dos girinos, o que poderia resultar em adultos mais vulneráveis, promovendo efeitos adversos (BOSCOLO *et al.*, 2017).

A incorporação de bioensaios na avaliação ecotoxicológica de ambientes aquáticos permite complementar informações físico-químicas com informações biológicas, facilitando a compreensão das consequências da exposição de um organismo a um ambiente contaminado, podendo ser usados para avaliar danos genotóxicos e citotóxicos (OSSANA; SALIBIÁN, 2013). Levando em conta as condições de saúde das populações de anfíbios, avaliar os efeitos genotóxicos se mostra relevante devido às consequências ecológicas que podem ser desencadeadas em ecossistemas aquáticos e terrestres (CRUZ-ESQUIVEL; VILORIA-RIVAS; MARRUGO-NEGRETE, 2017).

Testes de genotoxicidade desempenham um importante papel no biomonitoramento e na avaliação de riscos carcinogênicos provocados por agrotóxicos (TOMIAZZI *et al.*, 2018). A técnica de micronúcleo é usada como indicador de danos no DNA (ROCHA, 2011; CRUZ-ESQUIVEL; VILORIA-RIVAS; MARRUGO-NEGRETE, 2017; TOMIAZZI *et al.*, 2018) sendo considerada simples, sensível e confiável, além de fornecer resultados rápidos sobre dano genético (FENECH, 2000). A principal função da técnica de micronúcleo é alertar de maneira precoce os efeitos biológicos significativos (alterações no nível genético e molecular, bioquímicos e fisiológicos) que aparecem antes de efeitos em níveis superiores como tecidos, órgãos, organismos e, por fim nas populações. Desta maneira, o uso do teste de micronúcleo se mostra uma ferramenta importante para a previsão dos efeitos a longo prazo sobre os anfíbios no ambiente (MOUCHET *et al.*, 2011).

A análise de biomarcadores sanguíneos se tornou importante pois fornecem uma estimativa da exposição biológica a poluentes genotóxicos (CANDIOTI *et al.*, 2010). Associado a avaliação do micronúcleo, a análise de anormalidades nucleares pode ser utilizada para detectar efeitos citogenéticos e genotóxicos em eritrócitos nucleados (POLLO *et al.*, 2016). Substâncias tóxicas podem induzir danos diretos e indiretos nas células sanguíneas, perturbando o metabolismo celular induzindo anormalidades na morfologia celular (FARAG; ALAGAWANY, 2018). Dentre as anormalidades pode-se citar: células binucleadas, núcleos lobulados, entalhado, broto nuclear (CARRASCO; TILBURY; MYRES, 1990) e núcleos vacuolizados (CARRASCO; TILBURY; MYRES, 1990; FENECH *et al.*, 2011).

Physalaemus gracilis (Boulenger, 1883) é uma espécie de anuro do gênero Leptodactylidae (LOURENÇO *et al.*, 2015) com aproximadamente 3 cm (ZANK *et al.*, 2014; BORGES-MARTINS *et al.*, 2007), que pode ser encontrada no Brasil, Argentina, Uruguai e Paraguai (FROST, 2018). Se reproduz através de ninhos de espuma em lagos naturais dos meses de setembro a março (BORGES-MARTINS *et al.*, 2007; LAVILLA *et al.*, 2010; ZANK *et al.*, 2014). Pode colocar entre 400 (LAVILLA *et al.*, 2010) a 1300 ovos por fêmea (CAMARGO; SARROCA; MANEYRO, 2008). É considerada como de menor preocupação (LC) pela IUCN (2018) devido a sua ampla distribuição, tolerância a vasta gama de habitats, presumida grande população (LAVILLA *et al.*, 2010).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo principal deste estudo foi avaliar os efeitos letais, subletais e genotóxicos da formulação comercial do inseticida fipronil em *Physalaemus gracilis*, uma espécie bioindicadora de anfíbio que tem potencial de contato com esse agrotóxico no ambiente natural.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a sensibilidade de *P. gracilis* devido a exposição a diferentes concentrações de cipermetrina;
- Avaliar os efeitos subletais de concentrações de fipronil ambientalmente relevantes sobre *P. gracilis*;

- Avaliar os efeitos genotóxicos de concentrações de fipronil ambientalmente relevantes sobre *P. gracilis* através da avaliação da frequência de micronúcleo e de anormalidades nucleares de eritrócitos;
- Estimar os valores de LOEC, NOEC E MATC;
- Determinar o risco ecológico para *P. gracilis*;
- Comparar os resultados encontrados para *P. gracilis* com outras espécies de anfíbios e animais aquáticos;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 AGROTÓXICO

Os ensaios de toxicidade aguda e crônica foram realizados com o inseticida fipronil, na formulação comercial Terra Forte, formulado por Ouro Fino Química LTDA, registrado no Ministério da Agricultura, da Pecuária e Abastecimento - MAPA sob nº 05416. A formulação química possui 250 g/L de ingrediente ativo de fipronil e 890 g/L de ingredientes inertes. Segundo sua bula, a formulação comercial de fipronil possui Classificação Toxicológica II – Altamente Tóxico e Classificação do Potencial de Periculosidade Ambiental II – Produto Muito Perigoso ao Meio Ambiente.

A solução-estoque possuía concentração de 500 mg/L de fipronil e foi preparada no dia do início da realização dos ensaios. A formulação foi obtida através da diluição da formulação comercial em água destilada. Posteriormente, a solução-estoque foi usada para preparar as soluções utilizadas nos ensaios agudo e crônico e adicionada com micropipeta nos recipientes de ensaio.

3.2 ORGANISMO-TESTE

Para avaliação dos efeitos letais e subletais do fipronil foi utilizada uma espécie de anfíbio anuro: *Physalaemus gracilis* (Boulenger, 1883). As desovas da espécie foram coletadas direto da natureza, com menos de 24 horas de ovoposição, em lagoas na Universidade Federal da Fronteira Sul, na cidade de Erechim no Rio Grande do Sul, localizada na Rodovia ERS 135, km 72, nº 200 (Latitude: 27° 43' 46,11" Sul; Longitude: 52° 16' 54,40" Oeste). As coletas foram realizadas entre os meses de outubro de 2017 e fevereiro de 2018.

Após as coletas, as desovas foram transportadas em embalagens plásticas até o laboratório de Ecologia e Conservação da Universidade Federal da Fronteira Sul - Campus Erechim, onde foram colocados em aquários de 15 litros, contendo água dentro dos padrões de potabilidade, sob aeração constante e condições controladas, para que fosse possível o desenvolvimento dos girinos até atingirem a fase desejada para realização dos testes. Os girinos foram alimentados diariamente com o uso de ração comercial para peixes, com no mínimo 40% de proteína bruta.

Os ensaios agudo e crônico foram realizados com girinos na fase 25, de acordo com a classificação de Gosner (1960), em que os girinos apresentam formação bucal completa, conseguindo se alimentar adequadamente e período que corresponde ao início do crescimento do corpo e desenvolvimento dos membros posteriores. Os girinos submetidos aos ensaios tinham peso médio de $0,044 \text{ g} \pm 0,009$ ($0,019 \text{ g} - 0,069 \text{ g}$, $N=50$) e comprimento médio de $16,74 \text{ mm} \pm 1,50$ ($11,12 \text{ mm} - 19,83 \text{ mm}$, $N=50$).

A água utilizada para o desenvolvimento dos girinos e para a realização dos ensaios possuía as seguintes características: temperatura = $22^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, pH = $7,0 \pm 0,5$, oxigênio dissolvido = $4,0 \pm 1,0 \text{ mg/L}$, turbidez < 5 , condutividade = $160 \pm 10 \mu\text{S/cm}$, alcalinidade = $9,74 \text{ mg CaCO}_3/\text{L}$, Ca = $6,76 \text{ mg/L}$, Na = $44,1 \text{ mg/L}$, Mg = $1,35 \text{ mg/L}$, Fe = $0,08 \text{ mg/L}$, Ni $< 0,001 \text{ mg/L}$. A sala foi aclimatada a uma temperatura entre $24 \pm 2^\circ \text{C}$, com umidade relativa entre 60 e 80% e iluminação controlada (12/12 horas claro-escuro).

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal da Fronteira Sul sob protocolo nº 23205.003634/2017-70 e autorizado pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) sob nº 54939-1.

3.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.3.1 Ensaio Agudo

O ensaio agudo foi utilizado para determinação da Concentração Letal Média (CL_{50}) e teve duração de 96 horas. Os girinos utilizados para o teste apresentavam fase de desenvolvimento 25 (GOSNER, 1960). Foram testados 60 girinos por concentração divididos em 6 recipientes de vidro esterilizados, com capacidade de 500 mL. Também foi realizado um controle negativo, somente com água com o mesmo número de girinos (Figura 7).

Os girinos foram expostos a 14 diferentes concentrações da formulação comercial de fipronil: 2.500, 3.500, 4.500, 5.500, 6.500, 7.500, 15.000, 20.000, 25.000, 30.000, 35.000, 45.000, 55.000 e 70.000 $\mu\text{g/L}$. A mortalidade dos girinos foi avaliada em cada réplica a cada

24 horas e os mortos foram retirados e contabilizados. A temperatura dos recipientes foi mantida em $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ e o oxigênio dissolvido em 4 ± 2 mg/L, durante todo o período do ensaio.



Figura 7: Frascos de vidro referentes ao ensaio agudo de *P. gracilis* expostos a formulação comercial do inseticida fipronil, com aeração artificial - Laboratório de Ecologia e Conservação da Universidade Federal Fronteira Sul, campus Erechim. **Fonte:** Elaborado pelo autor, 2018.

3.3.2 Ensaio Crônico

O ensaio crônico foi realizado seguindo as mesmas configurações do ensaio agudo, com o mesmo número de girinos usados por réplica, quantidade de água e fase de desenvolvimento dos girinos (Figura 8). O tempo de duração do ensaio foi de 168 horas (7 dias) e aconteceu em regime estático. As concentrações subletais utilizadas no ensaio crônico foram selecionadas de acordo com dados referentes a concentrações de fipronil que podem ser encontradas em águas superficiais na natureza. Foram avaliadas as concentrações $50\ \mu\text{g/L}$, $100\ \mu\text{g/L}$, $500\ \mu\text{g/L}$ e $1.500\ \mu\text{g/L}$ (MARGARIDO *et al.*, 2013). Essas concentrações foram baseadas no estudo de MARGARIDO *et al.*, 2013, relacionando o fato de que em lagoas próximas a áreas com agricultura onde anfíbios se desenvolvem e se reproduzem (como no caso de *P. gracilis*), pode-se esperar maiores concentrações do agrotóxico em comparação a rios, em que o agrotóxico pode ser diluído.

O ensaio crônico respeitou o tempo de meia vida do fipronil que é superior a 100 dias em condições de pH entre 5,5 e 7,0 (GUNASEKARA *et al.*, 2007). Os frascos foram mantidos sob aeração constante e o ensaio foi acompanhado a cada 24 horas. Girinos mortos eram retirados e contabilizados.

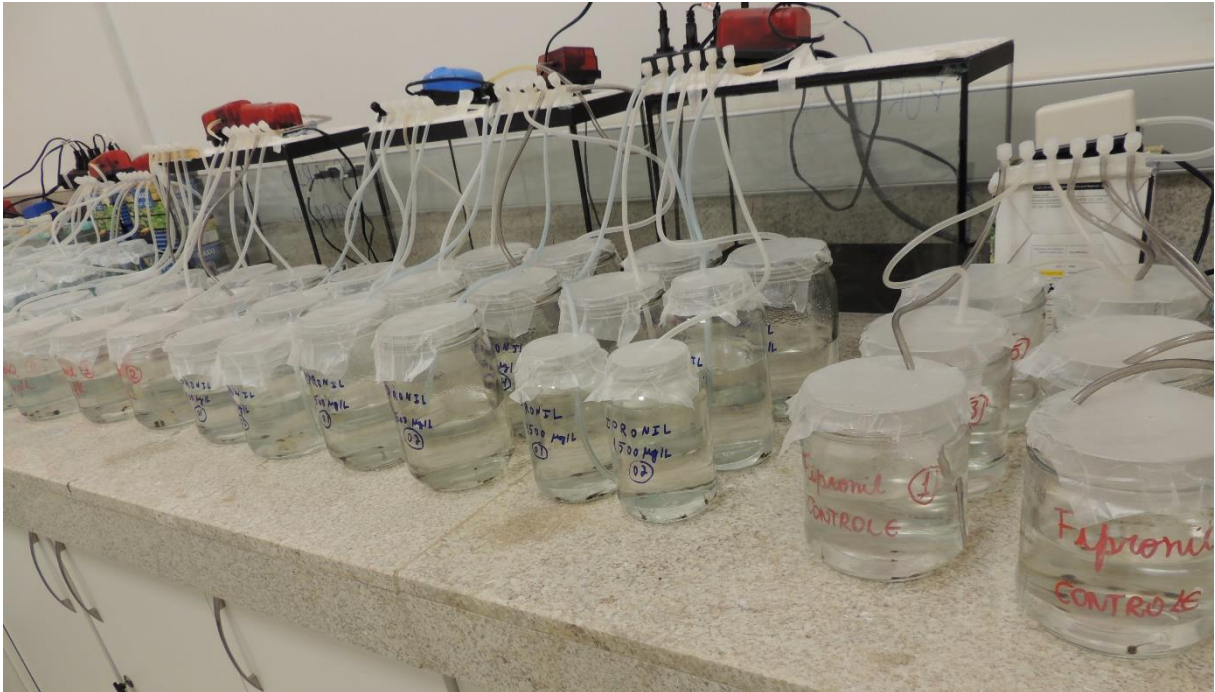


Figura 8: Frascos de vidro referentes ao ensaio crônico de *P. gracilis* expostos a formulação comercial do inseticida fipronil, com aeração artificial - Laboratório de Ecologia e Conservação da Universidade Federal Fronteira Sul, campus Erechim. **Fonte:** Elaborado pelo autor, 2018.

A atividade natatória foi monitorada a cada 24 horas para determinar se os girinos foram afetados pelas concentrações crônicas de fipronil, durante o período do teste crônico. Os padrões estabelecidos para essa metodologia foram: (0) atividade natatória igual ao controle, (1) atividade natatória inferior ao controle, (2) atividade natatória maior que o controle, e (3) contrações espasmódicas.

Além de alterações na atividade natatória, anormalidades morfológicas foram avaliadas nos girinos com o auxílio de um estereomicroscópio binocular, após a exposição de 168 horas. As anormalidades morfológicas foram classificadas em alterações na boca (ausência de queratodontes e morfologia dos lábios) e alterações no intestino (edema e morfologia). Cada girino foi avaliado individualmente e quando detectada a anormalidade os girinos foram registrados e fotografados com o auxílio de um estereomicroscópio binocular ou uma câmera fotográfica.

3.3.3 Micronúcleo e Anormalidades Nucleares de Eritrócitos

No teste de micronúcleo, 15 girinos expostos as concentrações de fipronil, num período de 168 horas, foram retirados. Uma gota de sangue foi retirada de cada girino através de punção cardíaca após a anestesia com lidocaína 5% (50 mg/g), de acordo com o CONCEA (2018), com

o auxílio de seringas de insulina descartáveis e heparinizadas, para evitar a coagulação do sangue. Com o sangue foram realizados esfregaços em lâminas de microscopia esterilizadas, secas ao ar por 24 horas e posteriormente, fixadas com o auxílio de metanol 100% (v/v) frio (4°C) durante 2 minutos e em seguida coradas com solução Giemsa 10% durante 15 minutos, ao abrigo de luz. Em seguida, as lâminas já coradas foram lavadas com água destilada para a retirada do excesso de corante e postar para secar para análise posterior.

A presença de micronúcleos e de outras anormalidades nucleares de eritrócitos (ANE's) foi determinada para cada girino através da análise de 1.000 células com o uso de microscópio em objetiva 100X. Além do micronúcleo, a genotoxicidade foi avaliada utilizando a presença de ANE's, realizadas em glóbulos vermelhos de acordo com Carrasco, Tilbury e Myres (1990) e Fenech *et al.* (2011) por determinação da frequência das seguintes lesões nucleares: (1) *Células Anucleadas*: células sem a presença de núcleos; (2) *Células com Apoptose*: núcleos fragmentados, com células se programando para morrer. (3) *Células Binucleadas*: células com dois núcleos; (4) *Célula com Broto Nuclear ou Bolha*: núcleo com uma pequena evaginação da membrana nuclear, tamanho de bolha semelhante ao tamanho de micronúcleos; (5) *Células com Cariólise*: núcleo que apresenta somente o contorno, sem material interno; (6) *Células Entalhadas*: núcleos que apresentam uma fenda ou corte bem definido em sua forma, também ditos como núcleos em forma de rim; (7) *Células Lobadas*: núcleos com evaginações maiores que as bolhas descritas anteriormente; (8) *Células com Microcitose*: núcleo condensado e citoplasma reduzido; (9) *Células Vacuolizadas*: núcleos que apresentam uma região parecida com os vacúolos encontrados em células vegetais, desprovidos de qualquer material visível nessa região. As alterações foram comparadas com os resultados encontrados no controle negativo.

3.4 ANÁLISE DE RISCO ECOLÓGICO

A análise de risco para cada alteração detectada em relação a malformações e ao teste do micronúcleo, foi avaliada utilizando a abordagem do quociente de risco ou *Hazard Quotient* (HQ), estabelecida pela USEPA (1998). O HQ é calculado através da equação (1) para o risco crônico (CHQ):

$$CHQ = \frac{EEC}{NOEC} \quad (1)$$

Em que:

EEC: Estimated Environmental Concentration é uma concentração máxima estimada de contaminantes em um ambiente;

NOEC: No Observed Effect Concentration é a concentração de efeito não observado;

Após o cálculo, o CHQ foi comparado com o nível preocupação (LOC) da USEPA (1998). O LOC é uma ferramenta política que a Agência usa para interpretar o quociente de risco, analisar o risco potencial para organismos não-alvo e a necessidade de considerar a ação reguladora. O valor LOC para o risco crônico para organismos aquáticos é 1. Se o quociente maior que 1, provavelmente ocorrerão efeitos nocivos devido ao contaminante em questão para a espécie avaliada. Quando o valor de *NOEC* não estava disponível, os valores de *LOEC* foram usados para possibilitar o cálculo de CHQ (WU *et al.*, 2015).

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise dos resultados obtidos no ensaio de toxicidade crônica foi utilizada a análise de variância unidirecional (ANOVA) foi usada para determinar as diferenças entre os grupos. O teste de Dunnett foi usado para comparar o nível de significância ($p < 0,05$) de cada grupo tratado com o controle negativo e também para determinar os valores de *LOEC*, *NOEC* e *MATC*. Para *NOEC* e *LOEC* a normalidade dos dados foi avaliada pelo ensaio de Shapiro Wilks e a homogeneidade das variâncias foi testada por Bartlett. O *LOEC* (*Lowest Observed Effect Concentration*) é a concentração de efeito observado. O *NOEC* (*No Observed Effect Concentration*) é a concentração de efeito não observado. O *MATC* (*Maximum Acceptable Toxicant Concentration*) é a concentração máxima aceitável de toxicante e é dado pela média geométrica dos valores de *LOEC* e *NOEC*. Os testes estatísticos foram realizados utilizando o software Statistica 8.0 com nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 ENSAIO AGUDO

No ensaio agudo referente a exposição de *P. gracilis* ao fipronil não foi possível calcular a CL_{50} devido à baixa mortalidade registrada nas concentrações experimentais (Tabela 8). A taxa de mortalidade foi inferior a 10%, mostrando características de exposição crônica e indicando uma baixa toxicidade aguda da formulação comercial de fipronil para girinos da espécie avaliada neste estudo.

Tabela 8: Número de girinos de *P. gracilis* mortos a cada 24 horas, durante o ensaio agudo expostos a diferentes concentrações da formulação comercial de fipronil

Concentração (µg/L)	Nº de indivíduos expostos	Mortalidade					Porcentagem de Mortalidade (%)
		24h	48h	72h	96h	Total	
0 (controle)	60	0	0	0	0	0	0
2.500	60	0	0	0	1	1	1,67
3.500	60	0	1	0	0	1	1,67
4.500	60	1	0	0	0	1	1,67
5.500	60	0	1	1	0	2	3,33
6.500	60	1	0	0	0	1	1,67
7.500	60	0	0	0	1	1	1,67
15.000	60	1	0	0	0	1	1,67
20.000	60	0	0	0	0	0	0
25.000	60	1	0	0	0	1	1,67
30.000	60	2	1	0	1	4	6,67
35.000	60	1	0	2	0	3	5,00
45.000	60	0	1	0	0	1	1,67
55.000	60	1	2	1	2	6	10,00
70.000	60	1	1	0	1	3	5,00

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

4.2 ENSAIO CRÔNICO

A mortalidade dos girinos de *P. gracilis* durante o ensaio crônico com o fipronil não foi significativa em relação a concentração ($F_{3;20} = 0,67$, $p = 0,58$), mostrando que a mortalidade não foi influenciada pela concentração durante o período de 7 dias. Da mesma forma que a concentração, o tempo de exposição também não apresentou significância em relação a mortalidade ($F_{6;21} = 1,15$, $p = 0,37$; Tabela 9).

Tabela 9: Mortalidade de girinos de *P. gracilis* expostos a formulação comercial de fipronil no período de 7 dias.

Concentração (µg/L)	Nº de indivíduos expostos	Nº de vivos	Nº de mortos	Mortalidade (%)
0 (Controle)	60	58	2	3,33
50	60	51	9	15,00
100	60	58	2	3,33
500	60	54	6	10,00
1.500	60	51	9	15,00

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Os efeitos das diferentes concentrações de fipronil sobre a atividade natatória dos girinos de *P. gracilis* não foram significativos ($F_{4;25} = 2,23$, $p=0,09$; Tabela 10).

Tabela 10: Girinos de *P. gracilis* que apresentaram alterações na atividade natatória durante o tempo de exposição ao fipronil de 7 dias. Os padrões estabelecidos foram: (0) atividade natatória igual ao controle, (1) atividade natatória inferior ao controle, (2) atividade natatória maior que o controle, e (3) contrações espasmódicas.

Concentração (µg/L)	Alterações na atividade natatória				Total
	0	1	2	3	
50	60	0	0	0	0
100	58	2	0	0	2
500	58	2	0	4	6
1.500	52	4	0	4	8

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Não foram observadas malformações na boca ao final do teste crônico (Tabela 11). Entretanto, malformações no intestino foram significativas ($F_{4;25} = 5,89$, $p < 0,01$, significativo para 100, 500 e 1500 µg/L, Dunnett = $p < 0,05$). Na maior concentração avaliada, mais de 50% dos girinos apresentaram alteração no intestino (Figura 9; Tabela 12).

Tabela 11: Malformações registradas em girinos de *P. gracilis* devido a exposição as diferentes concentrações de fipronil

Concentração (µg/L)	Número de girinos analisados	Número de girinos com alterações na boca	Número de girinos com alterações no intestino
0	51	0	0
50	52	0	9
100	45	0	16*
500	43	0	19*
1.500	42	0	22*

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

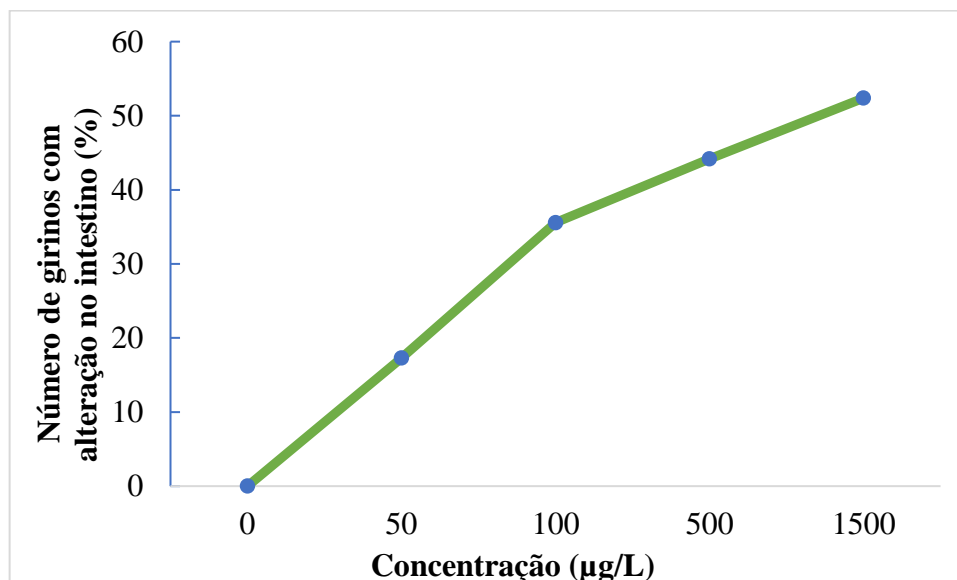

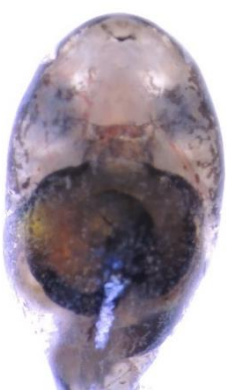

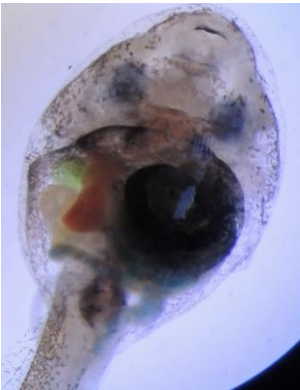



Figura 9: Girinos de *P. gracilis* que apresentaram malformação no intestino devido a exposição a formulação comercial de fipronil em um período de 7 dias. Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

A partir dos dados acima, foi possível calcular também os valores de NOEC e LOEC para a malformação no intestino. O valor de NOEC foi 50 µg/L e o de LOEC foi de 100 µg/L. Através desses valores pode-se perceber que apenas a concentração mais baixa não provocou efeito significativo sobre os girinos de *P. gracilis*.

Tabela 12: Girinos de *P. gracilis* com anormalidades no intestino devido a exposição a diferentes concentrações de fipronil em um período de 7 dias.

CONTROLE	50 µg/L	100 µg/L	500 µg/L	1.500 µg/L
				

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

4.3 MICRONÚCLEO E ANORMALIDADES NUCLEARES DE ERITRÓCITOS

Ao final do teste de micronúcleo com a formulação comercial do inseticida fipronil foram avaliados 76.186 eritrócitos para *P. gracilis*, considerando todas as concentrações e o controle. A presença de micronúcleos nos eritrócitos foi significativa em 1.500 µg/L da formulação comercial de fipronil ($F_{4,70} = 3,92$; $p < 0,01$, Dunnett, $p < 0,01$).

Tabela 13: Número de micronúcleos detectados em eritrócitos de *P. gracilis* expostos a formulação comercial do inseticida fipronil.

Concentração (µg/L)	Número de eritrócitos analisados	Número de micronúcleos detectados	Micronúcleos (‰)
Controle	15.154	7	0,05
50	15.439	10	0,06
100	15.048	17	0,11
500	15.058	22	0,14
1.500	15.487	33*	0,21

*significativo em relação ao controle, Dunnett ($p < 0,05$)

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Em relação as anormalidades nucleares de eritrócitos, das nove analisadas, sete foram detectadas nos girinos da espécie devido a exposição ao fipronil. Verificou-se que todos os girinos analisados apresentaram pelo menos uma das anormalidades celulares, chegando atingir 20% do total analisadas na concentração de 1.500 µg/L (Tabela 14).

A ANE mais frequente em todas as concentrações foi o núcleo entalhado com 6,64% do total de células analisadas, seguido do núcleo lobado com 2,65% e núcleo com bolha com 1,17%, considerando todas as concentrações avaliadas, menos o controle (Figura 10). Cada anormalidade foi avaliada individualmente e a maioria delas apresentou diferença significativa quando comparada ao controle em alguma das concentrações avaliadas, com exceção das células binucleadas, anucleadas e com cariólise (Tabela 15).

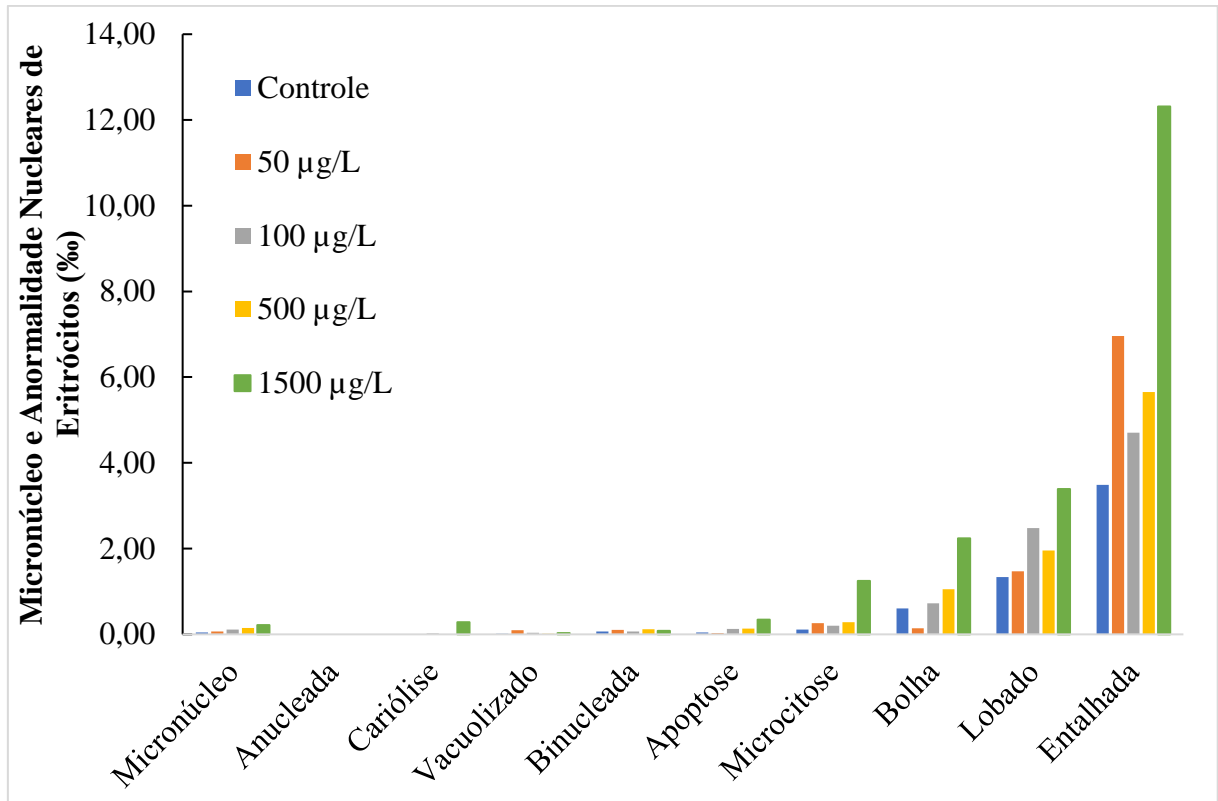


Figura 10: Número de micronúcleos e ANE's encontrados no teste de micronúcleo, de acordo com cada concentração avaliada para a formulação comercial de fipronil em girinos de *P. gracilis*. **Fonte:** Elaborado pelo autor, 2018.

Tabela 14: Anormalidades nucleares de eritrócitos (ANE's) encontradas no controle e nas concentrações para a formulação comercial de fipronil em girinos de *P. gracilis*. Média \pm desvio padrão (mínimo e máximo).

ANE	Concentração ($\mu\text{g/L}$)				
	Controle	50	100	500	1.500
Anucleadas	0	0	0	0	0
Apoptose	0,47 \pm 0,52 (0-1)	0,26 \pm 0,59 (0-2)	1,27 \pm 2,15 (0-6)	1,33 \pm 1,17 (0-4)	2,2 \pm 1,90 (0-6)*
Binucleadas	0,67 \pm 0,97 (0-3)	1,07 \pm 1,39 (0-5)	1,26 \pm 1,53 (0-5)	1,2 \pm 1,01 (0-3)	0,86 \pm 0,99 (0-3)
Bolha	6,13 \pm 4,29 (0-13)	1,46 \pm 1,30 (0-4)	7,27 \pm 3,41 (1-13)	10,6 \pm 5,60 (1-19)*	23,13 \pm 8,56 (11-36)*
Cariólise	0	0	0,2 \pm 0,41 (0-1)	0	2,93 \pm 3,37 (0-4)*
Entalhadas	35 \pm 12,69 (16-53)	71,6 \pm 26,76 (27-109)*	47,2 \pm 8,33 (27-62)	56,07 \pm 21,87 (26-105)*	127,13 \pm 25,81 (76-181)*
Lobadas	13,53 \pm 7,96 (2-25)	15,13 \pm 7,28 (7-38)	24,87 \pm 11,73 (7-50)*	19,6 \pm 8,75 (4-39)	35 \pm 18,18 (10-72)*
Microcitose	1,13 \pm 0,99 (0-3)	2,67 \pm 1,76 (0-7)	2 \pm 2,03 (0-6)	2,86 \pm 2,53 (1-26)	12,87 \pm 6,54 (4-23)*
Vacuolizadas	0,13 \pm 0,35 (0-1)	1 \pm 0,84 (0 - 2)*	0,4 \pm 1,05 (0-3)	0,13 \pm 0,35 (0-1)	0,26 \pm 0,79 (0-3)*
Número de células analisadas	15.154	15.439	15.048	15.058	15.487
Total de ANE (%)	5,71	9,12	8,47	9,35	20,14

*significativo em relação ao controle pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$)

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Tabela 15: Resultados da ANOVA e teste de Dunnett para cada anormalidade nuclear de eritrócitos em girinos de *P. gracilis* expostos a diferentes concentrações da formulação comercial de fipronil

ANE	Valor de F	Valor de p (ANOVA)	Valor de p (Dunnett)	Significativo para as concentrações
Anucleada	-	-	-	-
Apoptose	$F_{4;70} = 6,38$	$p > 0,01$	$p < 0,01$	1.500
Binucleada	$F_{4;70} = 0,71$	$p = 0,58$	-	-
Bolha	$F_{4;70} = 36,79$	$p < 0,01$	$p < 0,05$	500 e 1.500
Cariólise	$F_{4;70} = 10,87$	$p < 0,01$	$p < 0,01$	1.500
Entalhada	$F_{4;70} = 46,25$	$p < 0,01$	$p < 0,05$	50, 500 e 1.500
Lobada	$F_{4;70} = 8,54$	$p < 0,01$	$p < 0,01$	100 e 1.500
Microcitose	$F_{4;70} = 30,48$	$p < 0,01$	$p < 0,01$	1.500
Vacuolizada	$F_{4;70} = 3,58$	$p < 0,05$	$p < 0,01$	50

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

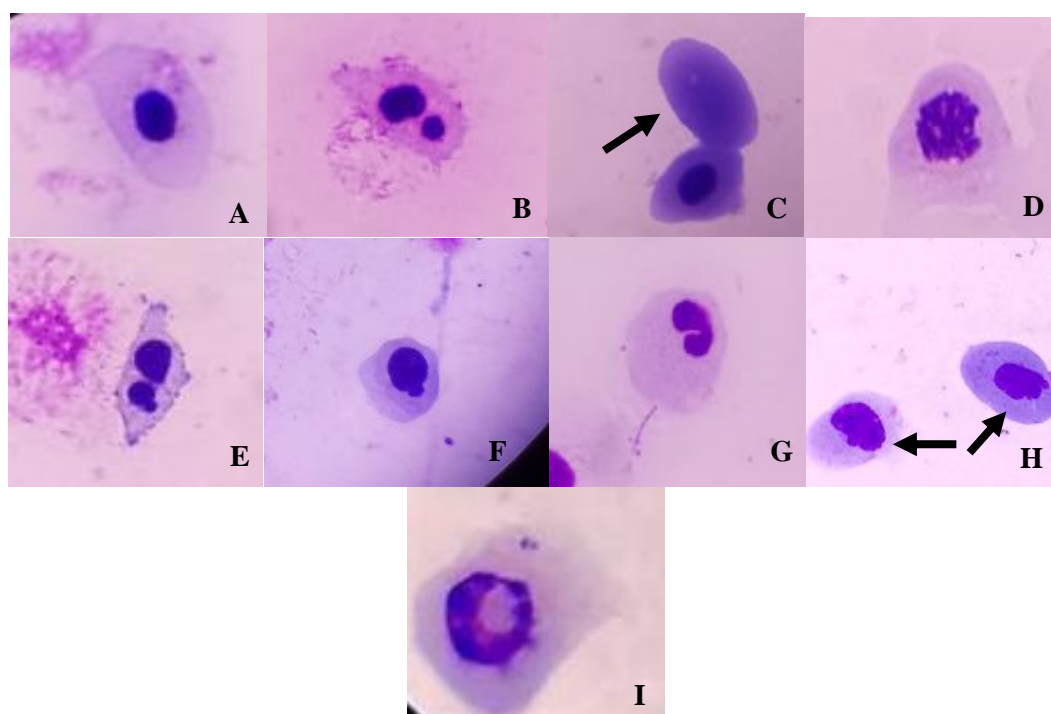


Figura 11: Micronúcleo e Anormalidades Nucleares de Eritrócitos encontradas em girinos de *P. gracilis* expostos a concentrações da formulação comercial de fipronil. (A) Célula com núcleos normal, (B) Célula com Micronúcleo; (C) Célula Anucleada; (D) Célula com Apoptose; (E) Célula Binucleada; (F) Célula com Bolha ou Broto Nuclear; (G) Célula Entalhada; (H) Células Lobadas; (I) Célula Vacuolizada. Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Através da soma do número de micronúcleos e de todas as anormalidades nucleares de eritrócitos foi possível determinar que a quantidade de alterações celulares foi significativa em 50, 100, 500 e 1.500 $\mu\text{g/L}$ de fipronil ($F_{4;70} = 61,03$ $p < 0,01$, Dunnett = $p < 0,05$). Observando a Figura 12, pode-se verificar que o aumento de concentração, provocou um aumento de alterações celulares em *Physalaemus gracilis*, principalmente na maior concentração em que se percebe um aumento do aparecimento de anormalidades celulares devido a exposição a formulação comercial de fipronil.

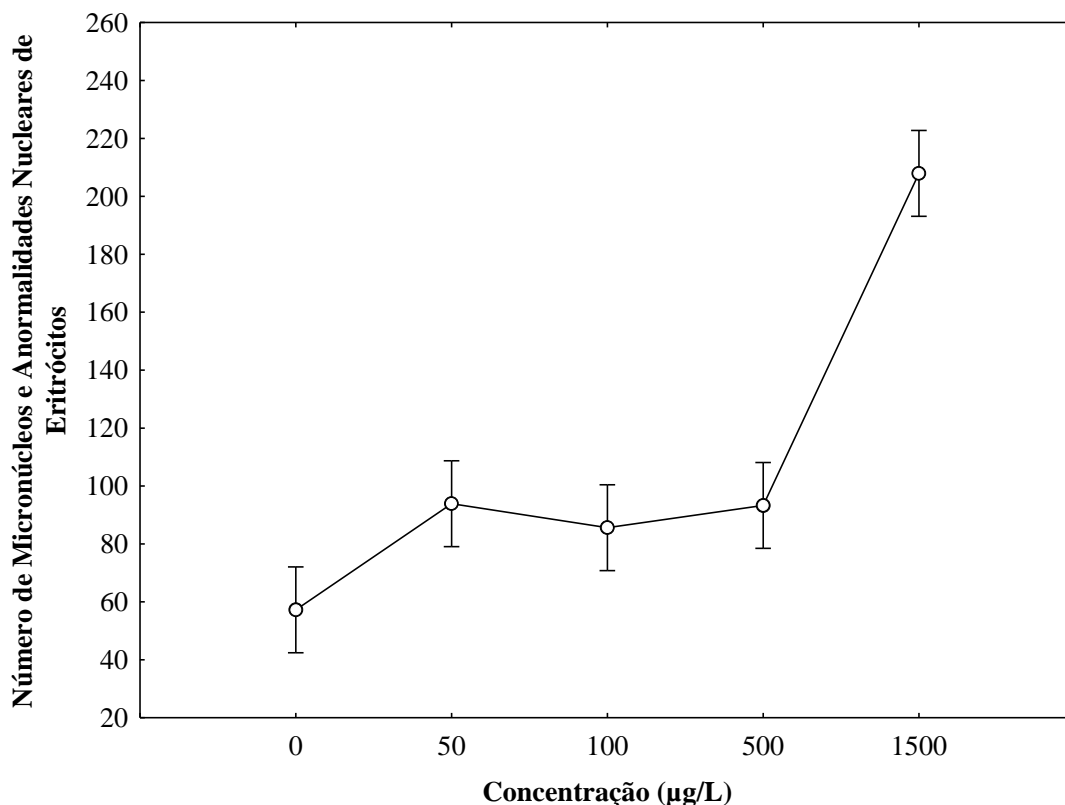


Figura 12: Micronúcleos e Anormalidades Nucleares de Eritrócitos em diferentes concentrações da formulação comercial de fipronil em girinos de *P. gracilis*. **Fonte:** Elaborado pelo autor, 2018.

4.4 ANÁLISE DE RISCO ECOLÓGICO

A partir da determinação dos valores de *NOEC* e *LOEC* foi possível estimar o risco crônico (CHQ) para os efeitos subletais. Através da concentração máxima encontrada no ambiente (*ECC*) para o fipronil que foi de 26 µg/L (MARCHESAN *et al.*, 2010; ALBUQUERQUE *et al.*, 2016) e o valor de *NOEC* de 50 µg/L para anormalidades no intestino foi possível determinar, através da Equação (1) o valor de CHQ que foi de 0,52. Esse valor foi inferior ao valor de referência determinado pela USEPA (LOC=1), indicando que a formulação comercial de fipronil apresenta baixo risco de provocar alterações no intestino de girinos de *P. gracilis*.

Da mesma maneira, a avaliação de risco para o teste de micronúcleo e para as anormalidades nucleares indicou que o fipronil apresenta baixo risco crônico para *Physalaemus gracilis*, já que apresentaram valores de CHQ inferiores ao valor de referência presumido para animais aquáticos LOC=1, determinado pela USEPA. Os valores calculados para MATC variaram de 50 µg/L a 886,02 µg/L (Tabela 16).

Tabela 16: Valores de NOEC, LOEC, MATC e CHQ determinados para Micronúcleo e Anormalidades Nucleares de Eritrócitos calculados para girinos de *P. gracilis* submetidos a formulação comercial de fipronil

	NOEC (µg/L)	LOEC (µg/L)	MATC (µg/L)	CHQ
MN+ANE's	-	50	50	0,52 ¹
Micronúcleo	500	1.500	866,02	0,052
Apoptose	500	1.500	866,02	0,052
Bolha	100	500	223,61	0,26
Entalhada	-	50	50	0,52 ¹
Cariólise	500	1.500	866,02	0,052
Lobada	50	100	70,71	0,52
Microcitose	500	1.500	866,02	0,052
Vacuolizada	-	50	50	0,52 ¹

¹Valor calculado utilizando LOEC

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

5 DISCUSSÃO

Fipronil se mostrou um inseticida com baixa toxicidade para *P. gracilis*, tanto aguda quanto crônica. Os níveis de mortalidade dos girinos indicam que em períodos de tempo de até 7 dias o fipronil não causa danos de mortalidade nesta espécie. Resultados semelhantes foram encontrados para *S. fuscovarius* em concentrações variando de 200 a 1.000 µg/L e para *P. nattereri* em concentrações que atingiram 50000 µg/L (MARGARIDO, 2011), com mortalidade pequena ou nula, impossibilitando a determinação da CL₅₀ e evidenciando a baixa toxicidade de fipronil em diferentes formulações comerciais. A única espécie de anfíbio para qual a CL₅₀ foi determinada foi para *Xenopus laevis* na concentração de 850 µg/L (OVERMYER *et al.*, 2007; ORTIZ-SANTALIESTRA *et al.*, 2017). No entanto, o fipronil foi testado com 98% de pureza e não em formulações comerciais.

Nas concentrações avaliadas não foram detectadas nenhuma alteração significativa na atividade natatória dos girinos de *P. gracilis*. A análise de alterações na atividade natatória é importante pois essa característica da vida do animal tem implicações importantes na sobrevivência, podendo resultar numa taxa de predação aumentada, colocando em risco a densidade populacional dos girinos de um determinado habitat (LANGERHANS, 2009). Como a formulação comercial de fipronil não teve efeito sobre a atividade natatória e nem na mortalidade no presente estudo, não há evidências que esse inseticida possa interferir no tamanho da população de *P. gracilis*,

Apesar dessa baixa toxicidade, o contato subletal com o fipronil causou malformações no intestino. Três das quatro concentrações avaliadas mostraram resultados significativos para essa malformação. Na concentração de 1.500 µg/L, mais da metade

(52%) dos girinos analisados apresentaram a alteração, indicando que nesta concentração, o fipronil poderia provocar graves consequências para a espécie. Não foram encontrados outros estudos analisando malformação de outras espécies de anfíbios expostos a fipronil, mas existem dados com peixes. Em *Danio rerio* foram observadas bexiga natatória não inflada, comprimento corporal reduzido e coluna vertebral dobrada em doses que variam de 100 a 400 µg/L de fipronil (YAN *et al.*, 2016). Em *Oryzias latipes*, os embriões expostos ao fipronil exibiram comprometimento do desenvolvimento embrionário, menor sucesso na eclosão e curvatura da cauda (WAGNER *et al.*, 2017).

Diversos outros estudos também registraram a presença de variadas malformações em anfíbios devido a presença de diferentes agrotóxicos no ambiente (e. g. JILANI *et al.*, 2018; WAGNER; MÜLLER; VIERTEL, 2017; BERNABÒ *et al.*, 2016), reforçando que a exposição a esses contaminantes pode provocar alterações que irão influenciar no desenvolvimento da espécie e por consequência ocasionando graves distúrbios a comunidade e ao ecossistema.

Além de análises de mortalidade e comportamento, é importante verificar o efeito do contaminante a nível celular. O teste de micronúcleo é um dos testes mais usados e aceitos para avaliação de danos mutagênicos de diversos compostos (FENECH, 2007). Por isso, a avaliação do aumento de micronúcleos no organismo devido a exposição a substâncias como os agrotóxicos se mostra importante, tanto em estudos de campo como em laboratório (GHISI; OLIVEIRA; PRIOLI, 2016). Neste estudo, verificou-se que o fipronil provocou o aparecimento de micronúcleos em *P. gracilis* em todas as concentrações avaliadas. A maior concentração apresentou diferença significativa do controle, mostrando que o fipronil induziu a formação desta lesão nuclear.

Associado ao micronúcleo, a presença de anomalias celulares tem sido utilizada para avaliação do potencial genotóxico de diversas substâncias em anfíbios (POLLO *et al.*, 2016; MONTALVÃO *et al.*, 2017; LAJMANOVICH *et al.*, 2018; MONTEIRO *et al.*, 2018). O aumento da frequência de anormalidades nucleares é um indicativo de que reações celulares adversas e de mecanismos de controle usados para eliminar células com DNA danificado (FIJAN, 2002; POLLO *et al.*, 2019). Neste estudo, a maior concentração avaliada (1.500 µg/L) apresentou resultados significativos para quase todas as anormalidades celulares avaliadas em comparação com o controle. Os resultados mostram que as ANE's foram induzidas pelo fipronil, confirmando que o inseticida é um agente genotóxico e mostrando que os testes de genotoxicidade são úteis para descrever a capacidade de diversos xenobióticos de danificar o DNA e induzir a mutação (FARAG; ALAGAWANY, 2018).

Pesquisas envolvendo o fipronil e seus efeitos para anfíbios são escassos. Os únicos estudos encontrados demonstram as consequências a nível bioquímico (MARGARIDO *et al.*, 2013; GRIPP *et al.*, 2017) e alterações na metamorfose (BOSCOLO *et al.*, 2017). Este é o primeiro estudo que analisa genotoxicidade de fipronil em anfíbios, mostrando a importância desta pesquisa para compreender melhor os efeitos deste inseticida. A presença de alterações celulares como o micronúcleo e de outras anormalidades nucleares induzidas pelo fipronil também foi registrada em outros organismos como ratos (OLIVEIRA *et al.*, 2012) e peixes (QURESHI *et al.*, 2016), deixando claro que o inseticida pode ter potencial genotóxico para diversas classes de animais.

O objetivo da avaliação de risco ecológico é verificar a probabilidade de que efeitos ecológicos adversos possam ocorrer ou estejam ocorrendo como resultado da exposição a um ou mais estressores (USEPA, 1992). Avaliações de risco ecológico são importantes porque podem ajudar a identificar problemas ambientais, estabelecer prioridades e fornecer uma base científica para ações regulatórias (USEPA, 1992). O uso do HQ pode ser um meio eficiente e barato para caracterizar situações de alto ou baixo risco (REBELO; CALDAS, 2014).

A análise de risco ecológico realizada para o fipronil indicou que esse inseticida apresenta baixo risco para *P. gracilis*. Todos os parâmetros observados no estudo, tanto em relação a avaliação de anormalidades morfológicas e ao teste do micronúcleo resultaram em CHQ's inferiores ao nível de preocupação ambiental da USEPA, considerando a concentração máxima de fipronil encontrada na água em áreas em que a espécie pode ocorrer. Entretanto, percebe-se que apesar do baixo risco ecológico para a espécie, consequências ao DNA foram detectadas e podem evoluir para outros problemas que prejudiquem a espécie em seu habitat ao longo do tempo, interferindo também no ecossistema em que está presente.

O estado do Rio Grande do Sul, no Brasil, é o único que possui um limite máximo de fipronil aceitável para água de consumo humano: 1,2 µg/L (SECRETARIA DA SAÚDE, 2014). Esse valor é inferior as concentrações já registradas em corpos d'água no país de 3,45 a 26,2 µg/L (SILVA *et al.*, 2009; MARCHESAN *et al.*, 2010; ALBUQUERQUE *et al.*, 2016), indicando contaminação da água acima do permitido.

Apesar da concentração de 1.500 µg/L ser alta em relação a essas concentrações e ao limite determinado pela legislação do RS, ela foi indicada como possível de acontecer no ambiente habitado por anfíbios por Margarido *et. al* (2013), e se isso realmente ocorrer pode impactar a vida de organismos aquáticos não-alvo. Não existem estudos que

indiquem a quantia de fipronil em lagoas temporárias, que são hábitats comuns para anfíbios como *P. gracilis*, próximo a áreas de aplicação deste inseticida, locais que devido a evaporação, podem concentrar o contaminante.

Os anfíbios estão sendo cada vez mais utilizados em testes toxicológicos, permitindo comparações diretas de sensibilidade entre os anfíbios e outros animais (KERBY *et al.*, 2010). As avaliações realizadas neste estudo permitem compreender quais são os impactos letais e subletais do fipronil sobre uma espécie de anfíbio que é facilmente encontrada no Brasil e no estado do Rio Grande do Sul e usar esses dados para estimar os possíveis efeitos sobre outras diferentes populações presentes no mesmo ambiente. Essa mesma espécie foi sensível a outros agrotóxicos estudados, com resultados que mostraram efeitos na atividade natatória, na morfologia oral, malformações no intestino, edema, contrações espasmódicas, aumento de micronúcleos (VANZETTO, 2017; MACAGNAN *et al.*, 2017; HEREK, 2017; RUTKOSKI *et al.*, 2018). Com esse estudo, procuramos demonstrar que anfíbios podem servir como um importante táxon bioindicador para sinalizar impactos à qualidade da água.

6 CONCLUSÃO

Neste estudo verificamos que a formulação comercial de fipronil avaliada foi pouco tóxica para *P. gracilis*, dentro dos parâmetros e concentrações utilizadas. Não houve risco ecológico e os efeitos de malformação, micronúcleo e outras anormalidades nucleares foram significativos apenas nas concentrações mais altas. Isso não significa que fipronil seja seguro para anfíbios, mas sim que tem poucos efeitos tóxicos em *P. gracilis* em dosagens permitidas por lei e registradas até agora em águas superficiais pela literatura. São necessários mais estudos sobre o efeito desse inseticida sobre anfíbios para confirmar essa baixa toxicidade, antes de confirmar a segurança desse inseticida, mas podemos afirmar que a formulação comercial de fipronil deste estudo teve poucos efeitos em *P. gracilis*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINI, G. M. **Ecotoxicología de Anfíbios en Agroecosistemas del Noreste de la Región Pampeana**. 2013. 163 p. Tesis (Doctorado en Ciencias Exactas) - Centro de Investigaciones del Medio Ambiente, Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata - UNLP. Argentina.

ALBUQUERQUE, A. F.; RIBEIRO, J. S.; KUMMROW, F.; NOGUEIRA, A. J. A.; MONTAGNER, C. C.; UMBUZEIRO, G. A. Pesticides in Brazilian freshwaters: a

critical review. **Environmental Science: Processes Impacts**, v. 18, n. 7, p. 779-787, 2016. Doi: 10.1039/c6em00268d.

ANVISA. **F43 – Fipronil**, 2017. Disponível em: <
<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/f43.pdf/cee42727-46ab-44a2-b88e-10ea4e8faab9>>. Acesso em: 8 abr. 2018.

BABALOLA, O. O.; VAN WYK, J. H. Comparative early life stage toxicity of the African clawed frog, *Xenopus laevis* following exposure to selected herbicide formulations applied to eradicate alien plants in South Africa. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 75, n. 1, p. 8-16, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00244-017-0463-0>.

BERNABÒ, I.; GUARDIA, A.; MACIRELLA, R.; SESTI, S.; CRESCENTE, A.; BRUNELLI, E. Effects of long-term exposure to two fungicides, pyrimethanil and tebuconazole, on survival and life history traits of Italian tree frog (*Hyla intermedia*). **Aquatic Toxicology**, v. 172, p. 56-66, 2016. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.12.017>.

BLAUSTEIN, A. R.; JOHNSON, P. T. J. The complexity of deformed amphibians. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 1, n. 2., p. 87-94, 2003. Doi: [http://dx.doi.org/10.1890/1540-9295\(2003\)001\[0087:tcoda\]2.0.co;2](http://dx.doi.org/10.1890/1540-9295(2003)001[0087:tcoda]2.0.co;2).

BORGES-MARTINS, M.; COLOMBO, P.; ZANK, C.; BECKER, F. G.; MELO, M. T. Q. Anfíbios. In: BECKER, F.G.; R.A. RAMOS & L.A. MOURA (Org.) **Biodiversidade: Regiões da Lagoa do Casamento e dos Butiazais de Tapes, Planície Costeira do Rio Grande do Sul**. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, 2007, p. 276291.

BOSCOLO, C. N. P.; FELÍCIO, A. A.; PEREIRA, T. S. B.; MARGARIDO, T. C. S.; ROSSA-FERES, D. C.; ALMEIDA, E. A.; FREITAS, J. S. Commercial insecticide fipronil alters antioxidant enzymes response and accelerates the metamorphosis in *Physalaemus nattereri* (Anura: Leiuperidae) tadpoles. **European Journal of Zoological Research**, v. 5, n. 1, p. 1-7, 2017.

CANDIOTI, J. V.; NATALE, G. S.; SOLONESKI, S.; RONCO, A. E.; LARRAMENDY, M. L. Sublethal and lethal effects on *Rhinella Arenarum* (Anura, Bufonidae) tadpoles exerted by the pirimicarb-containing technical formulation insecticide Aficida®. **Chemosphere**, v. 78, n. 3, p. 249-255, 2010. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.10.064>.

CAMARGO, A.; SARROCA, M.; MANEYRO, R. Reproductive effort and the egg number vs. size trade-off in *Physalaemus* frogs (Anura: Leiuperidae). **Acta Oecologica**, v. 34, n. 2, p. 163-171, 2008. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actao.2008.05.003>.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M. S. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 47, p. 2123-2436, 1990. Doi: <https://doi.org/10.1139/f90-237>.

CHAGURI, J. L. **Efeitos da exposição ao pesticida fipronil nas alterações pressóricas em ratos acordados**. 2016. 49 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia e Biotecnologia) – Instituto de Biociências, Botucatu, 2016.

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Gabinete do Ministro. Resolução Normativa nº 37, de 15 de fevereiro de 2018. Baixa a Diretriz da Prática de Eutanásia. **Diário Oficial da União**, Brasília, 22 fev. 2018.

CRUZ-ESQUIVEL, Á.; VILORIA-RIVAS, J.; MARRUGO-NEGRETE, J. Genetic damage in *Rhinella marina* populations in habitats affected by agriculture in the middle region of the Sinú River, Colombia. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 35, p. 27392-27401, 2017. Doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-017-0134-8>.

FARAG, M. R.; ALAGAWANY, M. Erythrocytes as a biological model for screening of xenobiotics toxicity. **Chemico-Biological Interactions**, v. 279, p. 73-83, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.11.007>.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1-2, p. 81-95, 2000. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00065-8](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00065-8).

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**, v. 2, n. 5, p. 1084-1104, 2007. Doi: [10.1038/nprot.2007.77](https://doi.org/10.1038/nprot.2007.77).

FENECH, M.; KIRSCH-VOLDERS, M.; NATARAJAN, A. T.; SURRALLE, J.; CROTT, J. W.; PARRY, J.; NORPPA, H.; EASTMOND, D. A.; TUCKER, J. D.; THOMAS, P. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 125-132, 2011. Doi: [10.1093/mutage/geq052](https://doi.org/10.1093/mutage/geq052).

FENT, G. M. Fipronil. **Encyclopedia of Toxicology: Third Edition**, v. 2, p. 596-597, 2014.

FIJAN, N. Morphogenesis of blood cell lineages in channel catfish. **Journal of Fish Biology**, v. 60, n. 4, p. 999-1014, 2002.

FICETOLA, G. F.; BERNARDI, F. Amphibians in a human-dominated landscape: the community structure is related to habitat features and isolation. **Biological Conservation**, v. 119, n. 2, p. 219-230, 2004. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2003.11.004>.

FROST, D. **Amphibian Species of the World: an Online Reference**. Version 6.0, American Museum of Natural History, New York, 2018. Disponível em: <<http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/Amphibia/Anura/Leptodactylidae/Leiperinae/Physalaemus/Physalaemus-gracilis>>. Acesso em: 15 maio 2018.

GHISI, N. C.; OLIVEIRA, E. C.; PRIOLI, A. J. Does exposure to glyphosate lead to an increase in the micronuclei frequency? A systematic and meta-analytic review. **Chemosphere**, v. 145, p. 42-54, 2016. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.11.044>.

GLISNKI, D. A.; HENDERSON, W. M.; VAN-MEDIDOR, R. J.; PURUCKER, T. Using in vitro derived enzymatic reaction rates of metabolismo to inform pesticide body burdens in amphibians. **Toxicology Letters**, v. 288, p. 9-16, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.02.016>.

GOSNER K. L. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. **Herpetologica**, v. 16, n. 3, p. 183-189, 1960. Doi: <https://www.jstor.org/stable/3890061>.

GRIPP, H. S.; FREITAS, J. S.; ALMEIDA, E. A.; BISNOTI, M. C.; MOREIRA, A. B. Biochemical effects of fipronil and its metabolites on lipid peroxidation and enzymatic antioxidant defense in tadpoles (*Eupemphix nattereri*: Leiuperidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 136, p. 173-179, 2017. Doi: 10.1016/j.ecoenv.2016.10.027.

GREULICH, K.; PFLUGMACHER, S. Uptake and effects on detoxication enzymes of cypermethrin in embryos and tadpoles of amphibians. **Archives Environmental Contamination Toxicology**, v. 47, n. 4, p. 489-495, 2004. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00244-004-2302-3>.

GUNASEKARA, A. S.; TRUONG, T.; GOH, K. S.; SPURLOCK, F.; TJEERDEMA, R. S. Environmental fate and toxicology of fipronil. **Journal of Pesticide Science**, v. 32, n. 3, p. 189-199, 2007. Doi: <http://dx.doi.org/10.1584/jpestics.r07-02>.

HAYES, T. B.; KHOURY, V.; NARAYAN, A.; NAZIR, M.; PARK, A.; BROWN, T.; ADAME, L.; CHAN, E.; BUCHHOLZ, D.; STUEVE, T.; GALLIPEAU, S. Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 10, p. 4612-4617, 2010. Doi: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0909519107>.

HEREK, J. **Glifosato e seus efeitos sobre duas espécies de anfíbios nativos da América do Sul *Physalaemus cuvieri* e *Physalaemus gracilis***. 2017. 110 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Federal da Fronteira Sul, Erechim, 2017.

IUCN - **International Union for Conservation of Nature Red List of Threatened Species**, 2018. Disponível em: < <http://www.iucnredlist.org/>>. Acesso em: 15 maio 2018.

JACKSON, D.; CORNELL, C. B.; LUUKINEN, B.; BUHL, K.; STONE, D. **Fipronil Technical Fact Sheet**. National Pesticide Information Center, Oregon State University Extension Services, 2009. Disponível em: < <http://npic.orst.edu/factsheets/archive/fiptech.html>>. Acesso em: 19 abr. 2018.

JILANI, M. J.; RAIS, M.; ASADI, M. A.; MAHMOOD, T. Comparison of morphometric and gravimetric measurements of Common Skittering Frog (*Euphlyctis cyanophlyctis*) from paddy fields and urban wetlands. **Journal of King Saud University - Science**, v. 30, n. 3, p. 404-411, 2018. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jksus.2018.05.014>.

JOHNSON, M. S.; AUBEE, C.; SALICE, C. J.; LEIGH, K. B.; LIU, E.; POTT, U.; PILLARD, D. A review of ecological risk assessment methods for amphibians: comparative assessment of testing methodologies and available data. **Integrated**

Environmental Assessment and Management, v. 13, n. 4, p. 601-613, 2016. Doi: 10.1002/ieam.1881.

JOSENDE, M. E.; TOZETTI, A. M.; ALALAN, M. T.; MATHIES FILHO, V.; XIMENEZ, S. S.; SILVA JÚNIOR, F. M. R.; MARTINS, S. E. Genotoxic evaluation in two amphibian species from Brazilian subtropical wetlands. **Ecological Indicators**, v. 49, p. 83-87, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2014.10.007>.

KERBY, J. L.; RICHARDS-HRDLICKA, K. L.; STORFER, A.; SKELLY, D. K. An examination of amphibian sensitivity to environmental contaminants: are amphibians poor canaries? **Ecology Letters**, v. 13, n. 1, p. 60-67, 2010. Doi: 10.1111/j.1461-0248.2009.01399.x.

LAJMANOVICH, R. C.; PELTZER, P. M.; MARTINUZZI, C. S.; ATTADAMO, A. M.; COLUSSI, C. L.; BASSÓ, A. Acute toxicity of colloidal silicon dioxide nanoparticles on amphibian larvae: Emerging environmental concern. **International Journal of Environmental Research**, v. 12, n. 3, p. 269-278, 2018. Doi: 10.1007/s41742-018-0089-8.

LANGERHANS, R. B. Morphology, performance, fitness: functional insight into a post-Pleistocene radiation of mosquitofish. **Biology Letters**, n. 5, p. 488-491, 2009. Doi: 10.1098/rsbl.2009.0179.

LAVILLA, E.; KWET, A.; SEGALLA, M. V.; LANGONE, J.; BALDO, D. *Physalaemus gracilis*. **The IUCN Red List of Threatened Species**, 2010. Disponível em: < <http://www.iucnredlist.org/details/57258/0>>. Acesso em: 20 abr. 2017.

LOURENÇO, L.; TARGUETA, C. P.; BALDO, D.; NASCIMENTO, J.; GARCIA, P. C. A.; ANDRADE, G. V.; HADDAD, C. F. B.; RECCO-PIMENTEL, S. M. Phylogeny of frogs from the genus *Physalaemus* (Anura, Leptodactylidae) inferred from mitochondrial and nuclear gene sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 92, p. 204-216, 2015. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2015.06.011>.

MACAGNAN, N.; RUTKOSKI, C. F.; KOLCENTI, C.; VANZETTO, G. V.; MACAGNAN, L. P.; STURZA, P. F.; HARTMANN, P. A.; HARTMANN, M. T. Toxicity of cypermethrin and deltamethrin insecticides on embryos and larvae of *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 25, p. 20699-20704, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9727-5>.

MANN, R. M.; HYNE, R. V.; CHOUNG, C. B.; WILSON, S. P. Amphibians and agricultural chemicals: Review of the risks in a complex environment. **Environmental Pollution**, v. 157, n. 1, p. 2903-2927, 2009. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.05.015>.

MARCHESAN, E.; SARTORI, G. M. S.; AVILA, L. A.; MACHADO, S. L. O.; ZANELLA, R.; PRIMEL, E. G.; MACEDO, V. R. M.; MARCHEZAN, M. G. Resíduos de agrotóxicos na água de rios da Depressão Central do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 40, n. 5, p. 1053-1059, 2010. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782010005000078>.

MARGARIDO, T. C. S. **Biomarcadores bioquímicos de contaminação em girinos de anfíbios anuros expostos a Regent®800WG (Fipronil)**. 2011. 54 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2011.

MARGARIDO, T. C. S.; FELÍCIO, A. A.; ROSSA-FERES, D. C.; ALMEIDA, E. A. Biochemical biomarkers in *Scinax fuscovarius* tadpoles exposed to a commercial formulation of the pesticide fipronil. **Marine Environmental Research**, v. 91, p. 61-67, 2013. Doi: 10.1016/j.marenvres.2013.02.001.

MARTINS, A. P. **Efeitos neurocomportamentais do fipronil administrado em dose única a ratos**. 2009. 86f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

MCCOMB, B. C.; CURTIS, L.; CHAMBERS, C. L.; NEWTON, M.; BENTSON, K. Acute toxic hazard evaluations of glyphosate herbicide on terrestrial vertebrates of the oregon coast range. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 15, n. 3, p. 266-272, 2008. Doi: <http://dx.doi.org/10.1065/espr2007.07.437>.

MONTALVÃO, M. F.; SOUZA, J. M.; GUIMARÃES, A. T. B.; MENEZES, I. P. P.; CASTRO, A. L. S.; RODRIGUES, A. S. L.; MALAFAIA, G. The genotoxicity and cytotoxicity of tannery effluent in bullfrog (*Lithobates catesbeianus*). **Chemosphere**, v. 183, p. 491-502, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.080>.

MONTEIRO, J. A. N.; CUNHA, L. A.; COSTA, M. H. P.; REIS, H. S.; AGUIAR, A. C. S.; OLIVEIRA-BAHIA, V. R. L.; BURBANO, R. M. R.; ROCHA, C. A. M. Mutagenic and histopathological effects of hexavalent chromium on tadpoles of *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) (Anura, Ranidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 163, p. 400-407, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.083>.

MOUCHET, F.; LANDOIS, P.; DATSYUK, V.; PUECH, P.; PINELLI, E.; FLAHAUT, E.; GAUTHIER, L. International amphibian micronucleus standardized procedure (ISO 21427-1) for in vivo evaluation of double-walled carbon nanotubes toxicity and genotoxicity in water. **Environmental Toxicology**, v. 26, n. 2, p. 136-145, 2011. Doi: <http://dx.doi.org/10.1002/tox.20537>.

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

OLIVEIRA, P. R.; BECHARA, G. H.; DENARDI, S. E.; OLIVEIRA, R. J.; MATHIAS, M. I. C. Genotoxic and mutagenic effects of fipronil on mice. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 64, n. 6, p. 569-573, 2012. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.etp.2010.11.015>.

OMITOYIN, B. O.; AJANI, E. K.; ADESINA, B. T.; OKUAGU, C. N. F. Toxicity of lindane (Gamma Hexachloro – CycloHexane) to *Clarias gariepinus* (Burchell 1822). **World Journal Zoology**, v. 1, n. 1, p. 57-63, 2006.

ORTIZ-SANTALIESTRA, M. E.; MAIA, J. P.; EGEA-SERRANO, A.; BRÜHL, C. A.; LOPES, I. Biological relevance of the magnitude of effects (considering mortality, sub-lethal and reproductive effects) observed in studies with amphibians and reptiles in view

of population level impacts on amphibians and reptiles. **European Food Safety Authority Supporting Publication**, v. 14, n. 7, p. 1-151, 2017. Doi: 10.2903/sp.efsa.2017.EN-1251.

OSSANA, N. A.; SALIBIÁN, A. Micronucleus test for monitoring the genotoxic potential of the surface water of Luján River (Argentina) using erythrocytes of *Lithobates catesbeianus* tadpoles. **Journal Of The Brazilian Society Of Ecotoxicology**, v. 8, n. 1, p. 67-74, 2013. Doi: <http://dx.doi.org/10.5132/eec.2013.01.010>.

OVERMYER, J. P.; ROUSE, D. R.; AVANTS, J. K.; GARRISON, A. W.; DELORENZO, M. E.; CHUNG, K. W.; KEY, P. B.; WILSON, W. A.; BLACK, M. C. Toxicity of fipronil and its enantiomers to marine and freshwater non-targets. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 42, n. 5, p. 471-480, 2007. Doi: <http://dx.doi.org/10.1080/03601230701391823>.

POLLO, F. E.; GRENAT, P. R.; OTERO, M. A.; SALAS, N. E.; MARTINO, A. L. Assessment *in situ* of genotoxicity in tadpoles and adults of frog *Hypsiboas cordobae* (Barrio 1965) inhabiting aquatic ecosystems associated to fluorite mine. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, v. 133, p. 466-474, 2016. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.08.003>.

POLLO, F. E.; GRENAT, P. R.; OTERO, M. A.; BABINI, S.; SALAS, N. E.; MARTINO, A. L. Evaluation *in situ* of genotoxic and cytotoxic response in the diploid/polyploid complex *Odontophrynus* (Anura: Odontophrynidae) inhabiting agroecosystems. **Chemosphere**, v. 216, p. 306-312, 2019, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.149>.

QUARANTA, A.; BELLANTUONO, V.; CASSANO, G.; LIPPE, C. Why amphibians are more sensitive than mammals to xenobiotics. **Plos One**, v. 4, n. 11, p.1-4, 2009. Doi: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0007699>.

QURESHI, I. Z.; BIBI, A.; SHAHID, S.; GHAZANFAR, M. Exposure to sub-acute doses of fipronil and buprofezin in combination or alone induces biochemical, hematological, histopathological and genotoxic damage in common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Aquatic Toxicology**, v. 179, p.103-114, 2016. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.08.012>.

REBELO, R. M.; CALDAS, E. D. Environmental risk assessment of aquatic systems affected by pesticide use. **Química Nova**, v. 37, n. 7, p. 1199-1208, 2014. Doi: <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20140165>.

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

ROCHA, C. A. M. The micronucleus test in erythrocytes of amphibian larvae as a tool for xenobiotic exposure risk assessment: a brief review and an example using *Lithobates catesbeianus* exposed to copper sulfate. **Middle-East Journal of Scientific Research**, v. 8, n. 1, p. 23-29, 2011.

RUTKOSKI, C. F.; MACAGNAN, N.; KOLCENTI, C.; VANZETTO, G. V.; STURZA, P. F.; HARTMANN, P. A.; HARTMANN, M. T. Lethal and Sublethal

Effects of the Herbicide Atrazine in the Early Stages of Development of *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 74, n. 4, p. 587-593, 2018. Doi: 10.1007/s00244-017-0501-y.

SECRETARIA DA SAÚDE. Gabinete da Secretária. Portaria nº 320, de 24 de abril de 2014. Estabelece parâmetros adicionais de agrotóxicos ao padrão de potabilidade para substâncias químicas, no controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano no RS. **Diário Oficial do Estado do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, 28 abr. 2014.

SILVA, D. R. O.; AVILA, L. A.; AGOSTINETTO, D.; MAGRO, T. D.; OLIVEIRA, E.; ZANELLA, R.; NOLDIN J. A. Monitoramento de agrotóxicos em águas superficiais de regiões orizícolas no sul do Brasil. **Ciência Rural**, v. 39, n. 9, p. 2383-2389, 2009. Doi: 10.1590/S0103-84782009000900001.

SILVA, M. S.; CONCENZA, D. S.; GRILLO, R.; MELO, N. F. S.; TONELLO, P. S.; OLIVEIRA, L. C.; CASSIMIRO, D. L.; ROSA, A. H.; FRACETO, L. F. Paraquat-loaded alginate/chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and soil sorption studies. **Journal Of Hazardous Materials**, v. 190, n. 1-3, p. 366-374, 2011. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.03.057>.

TINGLE, C. C. D.; ROTHER, J. A.; DEWHURST, C. F.; LAUER, S.; KING, W. J. Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. In: WARE, G. W.; NIGG, H. N.; DOERGE, D. R. (Ed.) **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**. New York: 2003. v. 176, p. 1-66. Doi: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4899-7283-5_1.

TOMIAZZI, J. S.; JUDAI, M. A.; NAI, G. A.; PEREIRA, D. R.; ANTUNES, P. A.; FAVARETO, A. P. A. Evaluation of genotoxic effects in Brazilian agricultural workers exposed to pesticides and cigarette smoke using machine-learning algorithms. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 2, p. 1259-1269, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0496-y>.

USEPA. Environmental Protection Agency. **Framework for ecological risk assessment**. EPA/630/R-92/001. U.S.EPA. Risk Assessment Forum, p. 1-41, 1992.

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

VAN METER, R. J.; GLINSKI, D. A.; HENDERSON, W. M.; GARRISSON, A. W.; CYTERSKI, M.; PURUCKER, S. T. Pesticide uptake across the amphibian dermis through soil and overspray exposures. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 69, n. 4, p. 545-556, 2015. Doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s00244-015-0183-2>.

VANZETTO, G. V. **Efeitos letais e subletais de cipermetrina e deltametrina em larvas de *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae)**. 2016. 45 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Federal da Fronteira Sul, Erechim, 2016.

VIEIRA, M. G.; STEINKE, G.; ARIAS, J. L. O.; PRIMEL, E. G.; CABRERA, L. C. C. Avaliação da contaminação por agrotóxicos em mananciais de municípios da região sudoeste do Paraná. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 5, 2017.

WAGNER, N.; REICHENBECHER, W.; TEICHMANN, H.; TAPPESER, B. LÖTTERS, S. Questions concerning the potencial impacto f glyphosate-based herbicides on amphibians. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 32, n. 8, p. 1688-1700, 2013. Doi: 10.1002/etc.2268.

WAGNER, N.; MÜLLER, H.; VIERTEL, B. Effects of a commonly used glyphosate-based herbicide formulation on early developmental stages of two anuran species. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 2, p. 1495-1508, 2016. Doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-016-7927-z>.

WAGNER, S. D.; KUROBE, T.; HAMMOCK, B. G.; LAM, C. H.; WU, G.; VASYLIEVA, N.; GEE, S. J.; HAMMOCK, B. D.; TEH, S. J. Developmental effects of fipronil on Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) embryos. **Chemosphere**, v. 166, p. 511-520, 2017. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.09.069>.

WELTJE, L.; UFER, A.; HAMER, M.; SOWING, P.; DEMMING, S.; DECHET, F. Risk assessment considerations for plant protection products and terrestrial life-stages of amphibians. **Science Of The Total Environment**, v. 636, p. 500 - 511, 2018. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.189>.

WU, J.; LU, J.; LU, H.; LIN, Y.; W. P. C. Occurrence and ecological risks from fipronil in aquatic environments located within residential landscapes. **Science of the Total Environment**, v. 518-519, p. 139-147, 2015. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.12.103>.

YAN, L.; GONG, C.; ZHANG, X.; ZHANG, Q.; ZHAO, M.; WANG, C. Perturbation of metabonome of embryo/larvae zebrafish after exposure to fipronil. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 48, p. 39-45, dez. 2016. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2016.10.002>.

YOUNG, B. E.; STUART, S. N.; CHANSON, J. S., COX, N. A.; BOUCHER, T. M. **Joyas que están desapareciendo: El estado de los anfibios en el nuevo mundo**. Arlington, Virginia: NatureServe, 2004. 53 p.

ZANK, C.; ANÉS, A. C.; COLOMBO, P.; MARTINS, M. B. **Anfibios**. 2014. Disponível em: < https://www.researchgate.net/publication/269697878_Anfibios>. Acesso em: 2 maio 2017.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os girinos de *P. gracilis* mostraram sensibilidade diferente quando expostos aos inseticidas cipermetrina e fipronil. A formulação comercial de cipermetrina se mostrou mais tóxica para a espécie do que a formulação comercial de fipronil.

- Para a cipermetrina, o tempo de exposição (96 horas) teve efeito significativo sobre a mortalidade dos girinos. Já a concentração, não mostrou efeitos sobre a espécie. Na exposição crônica, o tempo de exposição (7 dias) e as concentrações tiveram efeito significativo sobre a mortalidade dos girinos de *P. gracilis*.
- Para o fipronil, no ensaio crônico, a mortalidade não foi significativa nem em relação ao tempo de exposição, nem em relação as concentrações.
- Alterações na atividade natatória e alterações na morfologia da boca não foram detectados ao final do ensaio crônico com fipronil. Porém, alterações no intestino atingiram mais de 50% dos girinos expostos ao inseticida. Malformações como esta podem prejudicar os girinos na natureza, modificando comportamentos de fuga, dificultando a alimentação e, posteriormente provocando a morte dos girinos.
- Houve um aumento na presença de micronúcleos e de anormalidades nucleares de eritrócitos quando expostos as formulações comerciais de cipermetrina e fipronil. Todas as concentrações foram capazes de provocar alterações nucleares. As maiores concentrações tanto de cipermetrina (20 µg/L), quanto de fipronil (1500 µg/L) apresentaram cerca de 20% das células com algum tipo de alteração celular.
- As concentrações avaliadas de cipermetrina apresentaram alto risco agudo e crônico para *P. gracilis*, indicando que as concentrações já encontradas em habitats de anfíbios podem provocar efeitos deletérios para a espécie.
- No caso do fipronil, o risco crônico para a espécie detectado no estudo foi baixo. No entanto, não se pode afirmar que a formulação comercial é segura para *P. gracilis*. São necessários outros estudos para avaliar a segurança desta formulação comercial para as diferentes espécies presentes no ambiente.
- Ao final, pode-se afirmar que os anfíbios se mostram bioindicadores úteis para avaliação de ambientes contaminados por agrotóxicos e podem fornecer informações importantes sobre as consequências da presença desses químicos no ambiente.

- Além disso, o teste de micronúcleo também se mostrou importante para avaliação de químicos sobre espécies de anfíbios, indicando o potencial genotóxico da substância e suas implicações ao ecossistema a longo prazo.