



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL**  
***CAMPUS ERECHIM***  
**CURSO DE ENGENHARIA AMBIENTAL E SANITÁRIA**

**ÉRIKA BARP**

**ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE ANUROS COMO BIOMARCADOR  
DE ALTERAÇÕES FRENTE A EXPOSIÇÃO A AGROTÓXICOS**

**ERECHIM**

**2022**

**ÉRIKA BARP**

**ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE ANUROS COMO BIOMARCADOR  
DE ALTERAÇÕES FRENTE A EXPOSIÇÃO A AGROTÓXICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Engenharia Ambiental e Sanitária da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS – *Campus* Erechim, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Ambiental e Sanitária.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marília Teresinha Hartmann

**ERECHIM**

**2022**

**Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS**

Barp, Érika

Análise da resposta imunológica de anuros como biomarcador de alterações frente a exposição a agrotóxicos / Érika Barp. -- 2022.

41 f.:il.

Orientadora: Doutora Marília Teresinha Hartmann

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de Bacharelado em Engenharia Ambiental e Sanitária, Erechim,RS, 2022.

1. Atrazina. 2. Glifosato. 3. Leucócitos. 4. Anfíbios. I. Hartmann, Marília Teresinha, orient. II. Universidade Federal da Fronteira Sul. III. Título.

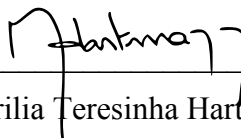
**ÉRIKA BARP**

**ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE ANUROS COMO BIOMARCADOR  
DE ALTERAÇÕES FRENTE A EXPOSIÇÃO A AGROTÓXICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Engenharia Ambiental e Sanitária da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS – *Campus* Erechim, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Ambiental e Sanitária.

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em 24/08/2022.

**BANCA EXAMINADORA**



---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marília Teresinha Hartmann - UFFS

Orientadora



---

Mestrando Caio Eduardo Messoro Bagnolo - UFFS – PPGCTA

Avaliador



---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Helen Treichel – UFFS

Avaliadora

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço minha mãe Gilva e meu pai Jaime por me permitirem me dedicar inteiramente à essa graduação, pela paciência e compreensão exigida durante todos estes anos. A minhas irmãs pelo apoio, que deram durante toda a graduação.

A minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Marília T. Hartmann, pela oportunidade, apoio, confiança depositada para realizar os trabalhos propostos, pela disponibilidade em auxiliar na elaboração deste trabalho, em compartilhar conhecimentos, opiniões e pela inspiração de ser uma excelente pesquisadora.

Agradeço aos amigos pela parceria, amizade, apoio e suporte nos momentos que precisei. Aos meus colegas de Laboratório da UFFS e a todos os professores pelos conhecimentos compartilhados e experiências proporcionadas.

Deixo meu agradecimento especial aos membros da minha banca pela disponibilidade e participação para enriquecer o trabalho.

A outros que não foram mencionados, mas, que de alguma forma auxiliaram ou torceram.

## RESUMO

A atrazina e o glifosato estão entre os herbicidas mais vendidos no Brasil e já foram detectados em águas superficiais e subterrâneas, estando entre os principais poluentes dos ecossistemas aquáticos que atingem organismos não-alvo. Nas pesquisas ecológicas, a contagem de números de leucócitos auxilia no estudo de respostas dos vertebrados quando expostos ao estresse. Desta forma, a investigação de como anfíbios reagem a mudanças naturais ou induzidas, como a introdução de agrotóxicos em seus habitats, é importante para verificar possíveis declínios populacionais. Sendo assim, foi testado se o uso dos agrotóxicos glifosato e atrazina podem interferir no número diferencial de leucócitos, com o objetivo de verificar se essa análise pode ser utilizada como biomarcador para repostas imunológicas. Para isso, foi feita a avaliação dos efeitos causados pela exposição crônica aos herbicidas medindo as alterações no perfil de leucócitos em girinos de *Boana faber* em condições de laboratório e em seguida feita a comparação entre os resultados dos dois herbicidas. Para os ensaios crônicos, os girinos foram submetidos a doses de atrazina e glifosato permitidos pela legislação brasileira e em concentrações encontradas em águas ambientais naturais, entre 2 e 240 µg a.e/L de atrazina e 65 e 1000 µg a.e/L de glifosato, por sete dias. Posteriormente, foram retirados 10 µL sangue através de punção cardíaca de 10 girinos de cada tratamento, logo após a eutanásia, onde cada amostra de sangue foi depositada em uma lâmina, fixada e corada para a realização da contagem de 100 leucócitos utilizando microscopia óptica sob lente objetiva 100x. Os girinos expostos a formulação comercial de atrazina e glifosato apresentaram diferenças nos leucócitos. No sangue dos girinos em tratamentos com atrazina ocorreu um aumento nos linfócitos, eosinófilos, mas diminuição nos basófilos. Os expostos a Glifosato apresentaram maior número de linfócitos, monócitos e neutrófilos e menor de basófilos. As proporções de neutrófilos/linfócitos tenderam a aumentar somente nas duas concentrações mais altas de glifosato. A exposição a atrazina e especialmente a glifosato afetaram o perfil leucocitário, sugerindo ajustes nos parâmetros como forma de aumentar o número de linfócitos e eosinófilos e diminuindo os outros leucócitos indicando um aumento geral na suscetibilidade do animal às mudanças ambientais com redução da defesa celular do organismo, indicando que este método pode ser utilizado como biomarcador.

**Palavras-chave:** Anfíbios; Glifosato; Atrazina; Leucócitos.

## ABSTRACT

Atrazine is among the most polluting organisms and the main target ecosystems among the organisms that affect the main ones have already been found in water. In ecological research, a count of leukocyte numbers aids in the study of vertebrate responses when exposed to stress. In this way, an investigation of how amphibians react to natural or induced changes, such as the introduction of pesticides in their habitats, is important to verify possible population declines. Therefore, the use of glyphosate and atrazine pesticides was tested, which can interfere with the number of leukocytes, in order to verify whether this analysis can be used as a differential biomarker for immune responses. For this, an evaluation of the effects of devices produced by chronic exposure was carried out as a change in the leukocyte profile under laboratory conditions and then a comparison was made between the results of the two herbicides. For the Brazilian natural trials, between the doses of natural tadpoles and glyphosate allowed by Brazilian legislation, between 2 and 2 and 65 and 1000  $\mu\text{g a.e/L}$  of glyphosate, per. seven days. Subsequently, 10  $\mu\text{L}$  of cardiac puncture blood were taken from each use, the euthanized treatment was removed, where blood samples were taken, after 10  $\mu\text{L}$ , after blood collection, and stained to perform the 10 otic leukocyte count, after blood collection, after blood collection from 10 optics, under lens, under lens. 100x objective. The tadpoles a commercial formulation of exposure and glyphs showed differences in leukocytes. In the blood of gyrons treated with atrazine there was an increase in lymphocytes, eosinophils, but an increase in basophils. Those exposed to glyphosate had a higher number of lymphocytes, monocytes and neutrophils and a lower number of basophils. Neutrophil/lymphocyte ratios tend to increase only in the two with the highest glyphosate. An exposure to reduction of cells and especially a reduction of cells to a prominent profile, suggesting configurations of leukocytes as a form of increase or number of lymphocytes and the other leukocytes indicating an increase in the susceptibility of the animal to environmental changes with the defense of the organism, indicating that this method can be used as a biomarker.

**Keywords:** Amphibians; glyphosate; Atrazine; leukocytes.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Leucócitos encontrados em amostras de sangue de girinos de <i>Boana faber</i> . (a) Neutrófilo; (b) Linfócito; (c) Eosinófilo; (d) Monócito; (e) Basófilo. ....	18
Figura 2- Frequência de leucócitos (100 células) em girinos <i>Boana faber</i> expostos aos tratamentos de atrazina. ....	20
Figura 3- Frequência de leucócitos (100 células) em girinos <i>Boana faber</i> expostos aos tratamentos de glifosato. ....	22



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Frequências de leucócitos sanguíneos (100 células) de girinos de *Boana faber* no controle e tratamentos com atrazina. Média  $\pm$  erro padrão. .... 19

Tabela 2- Frequências de leucócitos sanguíneos (100 células) de girinos de *Boana faber* no controle e tratamentos com glifosato. Média  $\pm$  erro padrão. ....20

## SUMÁRIO

1. <b>INTRODUÇÃO</b> .....	9
2. <b>OBJETIVOS</b> .....	13
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	13
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	13
3. <b>METODOLOGIA</b> .....	14
3.1 Agrotóxicos utilizados .....	14
3.2 Organismo utilizado .....	15
3.3 Perfil de leucócitos.....	16
3.4 Análise estatística.....	17
4. <b>RESULTADOS</b> .....	18
5. <b>DISCUSSÃO</b> .....	23
6. <b>CONCLUSÃO</b> .....	30
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	31

## 1. INTRODUÇÃO

A ecotoxicologia é uma ferramenta onde, através de organismos bioindicadores, são realizadas avaliações da toxicidade de compostos e substâncias (POMPÊO et al., 2015). Pode ser realizada antecipadamente à um evento contaminante para apurar os efeitos da introdução de substâncias ou posteriormente, para investigar os efeitos adversos das substâncias sobre o meio ambiente (MAGALHÃES; FILHO, 2008). Durante os testes podem ser analisadas a morfologia (NOVO, 2012), malformações (HEREK, 2017), a mortalidade, a natalidade, o crescimento e a taxa de alimentação, dependendo da finalidade (POMPÊO et al., 2015) levando em conta as interações físico-químicas e biológicas com o ambiente quando *in situ* (MAGALHÃES; FILHO, 2008).

Estes resultados de estudos toxicológicos podem ter a sua utilização no acompanhamento das condições ambientais e em tomadas de decisões como auxiliador ao controle de impactos ocasionados por atividades possivelmente poluidoras (MAGALHÃES; FILHO, 2008; POMPÊO et al., 2015). A análise eco toxicológica é uma ferramenta que pode ser utilizada também para avaliar os impactos do uso de agrotóxicos em espécies que não são alvo dos produtos (SILVA et al., 2013).

Os bioindicadores são aqueles organismos ou comunidades de organismos que respondem de alguma forma às mudanças de condições do ambiente, indicando com reações bioquímicas, morfológicas ou fisiológicas (NOVO, 2012). Os anfíbios são bons indicadores de poluição ambiental, uma vez que possuem pele semipermeável e vida com fases aquática e terrestre (REINIER et al., 2009). A pele é via de absorção e também da perda de água em anfíbios e tem uma permeabilidade alta, maior do que a adsorção térmica de mamíferos (QUARANTA et al., 2009) e outros vertebrados (METER et al., 2015; EFSA, 2018).

Como boa parte do ciclo de vida dos anfíbios ocorre na água, algumas espécies de anuros que habitam ambientes próximos a áreas agrícolas podem estar expostos aos efeitos de agrotóxicos e herbicidas (REINIER et al., 2009; METER et al., 2015; EFSA, 2018). Estes compostos químicos têm sua principal rota de entrada em lagoas pela deposição de pulverização, escoamento ou drenagem, chegando até os anfíbios (EFSA, 2018) sendo o estágio larval o período mais vulnerável aos agrotóxicos (WIJESINGHE et al., 2011). Os anfíbios expostos a agrotóxicos podem não ter morte imediata, mas a exposição repetida pode causar indução à mortalidade e impactos subletais (METER et al., 2015).

Conforme Silva et al. (2020), os agrotóxicos e fertilizantes estão tendo sua aplicação em maiores combinações e variedades, aumentando a poluição. Além disso, poluição está entre uma das causas para o declínio das populações de anfíbios, juntamente com as doenças e fragmentação de habitats (CAREY, 2005; HAYES et al., 2010), exposição a agrotóxicos (DAVIDSON; KNAPP, 2007) além da inserção de espécies exóticas, aumento da radiação ultravioleta, entre outros fatores (CAREY, 2005). Alguns estudos demonstram que quando expostos a agrotóxicos, as espécies de anfíbios podem se tornar mais suscetíveis a predadores (JAYAWARDENA et al., 2010), devido ao possível desenvolvimento de deformações e modificações no comportamento, assim, podendo ocasionar uma redução na sobrevivência (LAJMANOVICH et al., 2014; MACAGNAN et al., 2017).

Nas espécies bioindicadoras podem ser selecionados diferentes biomarcadores, que são importantes na detecção de alterações como medidores funcionais que indicam respostas do organismo quando estes são expostos a diferentes misturas de estressores presentes no meio ambiente que podem estar relacionados a impactos provenientes de ações desencadeadas por atividades humanas (ADAMS et al., 2001; CABAGNA et al., 2005; BARNI et al., 2007). Na avaliação de risco ecológico, os biomarcadores auxiliam na detecção de possíveis poluentes, contribuindo na gestão ambiental (DEPLEDGE; FOSSI, 1994; ADAMS et al., 2001).

Alguns exemplos de biomarcadores incluem as proteínas de choque térmico, oxigenases de função mista e enzimas de estresse oxidativo, além dos que são muito utilizados em campo, porém com pouca validação, como medidas de genotoxicidade, respostas imutocológicas e medidas de comprometimento reprodutivo (ADAMS et al., 2001). Outro tipo de biomarcador é a contagem simples de células brancas do sangue e embora seja complexa, o uso da hematologia é um método pouco invasivo que permite saber se há alterações no organismo de populações selvagens (BARNI et al., 2007; DAVIS; MANEY; MAERZ, 2008). Ademais, o esfregaço de sangue como análise, demonstra utilidade na avaliação dos efeitos dos agrotóxicos (FORSON; STORFER, 2006), padrões de uso da terra (BARNI et al., 2007), temperatura e estação do ano (MANIERO; CAREY, 1997), aglomeração durante o desenvolvimento (DAVIS; MAERZ, 2009) e entre outros, na fisiologia dos anfíbios.

Ainda existem brechas no conhecimento de como se comporta o sistema imunológico dos organismos *in situ* (CAREY, 2005). Nas pesquisas ecológicas, a contagem de números de

leucócitos pode ser uma ferramenta auxiliadora no estudo de respostas dos vertebrados quando expostos ao estresse (DAVIS; MANEY; MAERZ, 2008). Os leucócitos podem ter seus números alterados pela presença de infecções ou doenças já que fazem parte da linha de defesa imunológica dos organismos (DAVIS; MANEY; MAERZ, 2008).

Há um desafio na interpretação de perfis de leucócitos uma vez que muitas das espécies não foram analisadas e, portanto, não é possível haver comparação (DAVIS; MAERZ; MANEY, 2008; RUSO et al., 2021). Desta forma, a investigação de como o organismo das espécies de anfíbios reagem a mudanças naturais ou induzidas, como a introdução de agrotóxicos em seus habitats, é importante para verificar possíveis declínios populacionais.

No Brasil, a atrazina e o glifosato estão entre os ingredientes ativos de agrotóxicos mais utilizados (IBAMA, 2021). O glifosato é um herbicida pós-emergente, não-seletivo com ação sistêmica (GALLI; MONTEZUMA, 2005) e é o ingrediente ativo com maior utilização mundialmente pela sua eficácia no controle de plantas daninhas (RELYEA; JONES, 2009). É visto como potencial contaminante por suas características hidrossolúveis, sendo que em ambientes aquáticos pode aumentar efeitos de danos em espécies não-alvo, como anfíbios (RELYEA; JONES, 2009; HEREK et al., 2020), além de possuir potencial de causar mortalidade e alterações subletais em girinos (ALMEIDA; RODRIGUES; IMPERADOR, 2019).

A atrazina também é um herbicida, seletivo com aplicação em pré e pós- emergência de ervas daninhas presentes principalmente nas culturas de cana-de-açúcar, milho, milheto e em pré-emergência da cultura da soja (ANVISA, c2021). Sua presença em água tende a ter uma concentração maior quando em ambientes lênticos (ROHR; MCCOY, 2010). Estudos mostram que a atrazina tem efeito negativo em processos biológicos em espécies de anfíbios, como na função do sistema imunológico, crescimento, mortalidade e morfologia (HOUCK; SESSIONS, 2006; FORSON; STORFER, 2006; FREEMAN; RAYBURN, 2005; RUTKOSKI et al., 2016; PAVAN et al., 2021). Além disso, a imunidade de anfíbios e peixes expostos a concentrações relevantes ecologicamente foi reduzida (ROHR; MCCOY, 2010).

Uma espécie que pode ser usada como bioindicadora é o anfíbio anuro *Boana faber* (Wied- Neuwied, 1821), da família Hylidae. Essa espécie é endêmica da América do Sul e tem sua distribuição geográfica pelo Brasil, Argentina e Paraguai em áreas com florestas tropicais úmidas e nas bordas dessas florestas. A reprodução acontece em reservatórios de

água permanentes ou temporários e áreas próximas a riachos com movimentação lenta (LAVILLA et al., 2010) e deste modo pode estar exposta a agrotóxicos.

Sendo assim, a hipótese testada foi se o uso dos agrotóxicos glifosato e atrazina podem interferir no número diferencial de leucócitos indicando respostas imunológicas em girinos. Para isso, avaliou-se os efeitos causados pela exposição aguda e crônica aos herbicidas medindo as alterações no perfil de leucócitos em girinos de *Boana faber* em condições de laboratório e em seguida a comparação entre os resultados dos dois herbicidas.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Analisar se existe alteração nos leucócitos em girinos de *Boana faber* (Hylidae, Anura, Amphibia) expostos a atrazina e glifosato, e se as respostas imunológicas verificadas nas amostras de sangue são bons biomarcadores da exposição a agrotóxicos.

### 2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Realizar a contagem diferencial de leucócitos (neutrófilo, basófilo, eosinófilo, linfócito e monócito) do sangue de girinos de *Boana faber* expostos a dois agrotóxicos diferentes.

2.2.2 Analisar os leucócitos nas células do sangue para verificação de respostas de imunidade.

2.2.3 Investigar os dados coletados e comparar os resultados de obtidos entre os dois agrotóxicos.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Agrotóxicos utilizados

Para os testes crônico, duas formulações comerciais de herbicidas foram usadas nos experimentos: (1), Atrazina (ATZ) (AclamadoBR®), composto por 500 g L<sup>-1</sup> de 6-chloro-N2-ethyl-N4-isopropyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine (Atrazina) e 604,80 g L<sup>-1</sup> de outros compostos inertes e (2) glifosato (GLI) (Roundup Original DI®), composto por 445 g L<sup>-1</sup> de Sal de Di-amônio de (N-(fosfometil) glicina), 370 g L<sup>-1</sup> do ácido equivalente de N-(fosfometil) glicina e 751 g L<sup>-1</sup> de outros compostos inertes.

A atrazina, fórmula bruta C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>CIN<sub>5</sub>, é do grupo dos inibidores do fotossistema II e do grupo das triazinas (SILVA; FERREIRA; FERREIRA, 2007). A ATZ possui meia vida na água entre 41 a 237 dias, dependendo das condições ambientais (SOLOMON et al., 2008), coeficiente de partição octanol/água de 2,78 Log K<sub>ow</sub> a pH 7, baixo coeficiente de adsorção no solo (K<sub>oc</sub>) 100 cm<sup>3</sup> g<sup>-1</sup>, baixa pressão de vapor e moderada solubilidade na água de 33,0 mg L<sup>-1</sup> a 22 °C (BARANOWSKA et al., 2008; BALCI et al., 2009; CARMO et al., 2013). Conforme a bula do AclamadoBR®, possui classificação Toxicológica Classe IV – Pouco tóxico e Classificação do Potencial de Periculosidade Ambiental Classe II – Produto Muito Perigoso ao Meio Ambiente.

O GLI tem meia vida na água entre 7 a 21 dias dependendo das condições ambientais (PATERSON, 2004; EDGE et al., 2012), coeficiente de partição octanol/água de 5,4 Log K<sub>ow</sub> com pH 7 (MACBEAN et al., 2010), coeficiente de adsorção ou força de adsorção (K<sub>oc</sub> > 5.000) (ZIMDAHL, 1999), pressão de vapor 2,1 x 10<sup>-3</sup> mPa a 25 °C / 1,58 x 10<sup>-8</sup> mm Hg a 25 °C e a solubilidade na água é de 1,05 x 10<sup>+6</sup> mg L<sup>-1</sup> a 25 °C (MACBEAN et al., 2010). De acordo com a bula do Roundup Original® DI, possui classificação Toxicológica Classe II – Altamente tóxico e Classificação do Potencial de Periculosidade Ambiental Classe III – Produto Perigoso ao Meio Ambiente.

A solução estoque de cada herbicida foi preparada através da dissolução da formulação comercial em água destilada, para se obter 500 mg a.e L<sup>-1</sup> (a.e.= ácido equivalente). Os valores de tratamento foram definidos a partir de referências encontradas na bibliografia que estão expostas no Quadro 1.



Quadro 1– Referências para os tratamentos de atrazina e glifosato utilizadas nos ensaios com girinos de *Boana faber*.

Agrotóxico	Tratamento	Concentrações (µg/L)	Referências para as concentrações de atrazina (ATZ) e glifosato (GLI)
Atrazina	A1	2	Máximo permitido para águas superficiais classe I no Brasil (BRASIL, 2005);
	A2	9,33	Registrada em águas superficiais no Brasil (MOREIRA et al., 2012);
	A3	10,40	Registrada em águas superficiais no Brasil (SANTOS et al., 2015);
	A4	47,21	Registrada em águas superficiais no Brasil (MOREIRA et al., 2012);
	A5	240	Concentração próxima ao registrada em águas superficiais nos EUA (ATSDR, 2003);
Glifosato	G1	65	Máximo permitido para águas superficiais classe I no Brasil (2005).
	G2	144	Registrada em água superficiais no Brasil (DORNELLES; OLIVEIRA, 2014).
	G3	280	Máximo permitido em águas superficiais classe III no Brasil (BRASIL, 2005).
	G4	500	Máximo permitido água de consumo humano no Brasil (BRASIL, 2017).
	G5	1000	Registrada em águas superficiais na Argentina (PERUZZO; PORTA; RONCO, 2008).

Fonte: Adaptado de Pavan (2021).

### 3.2 Organismo utilizado

As desovas de *Boana faber* utilizadas foram coletadas em até 12 horas após a ovoposição, em lagoas permanentes no Horto Florestal de Erechim, RS, Brasil (-27°42'45.5"S e -52°18'38.7"W) e levadas ao laboratório de Ecologia e Conservação da Universidade Federal Fronteira Sul - Campus Erechim/RS, para desenvolvimento larval contínuo até a fase de testes. As desovas foram coletadas conforme a licença ICMBio 73994-2 e os ensaios tiveram autorização pelo Comitê de Ética em Uso Animal da Universidade Federal da Fronteira Sul (2287081021).

Após a coleta, as desovas foram criadas em aquários com 15 litros de água declorada de poço artesiano, com aeração artificial e mantida em condições controladas de laboratório

com fotoperíodo (12-12 h Luz-escuro). Os girinos foram alimentados diariamente com alimento comercial para peixes contendo 45% de proteína bruta (Alcon Basic, Alcon®), além de agrião orgânico e alface orgânica. As características físico-químicas da água utilizada na criação seguiram os seguintes parâmetros: temperatura  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ ; pH  $7,4 \pm 0,5$ ; dureza  $3,57 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ ; oxigênio dissolvido  $5,8 \pm 0,3 \text{ mg L}^{-1}$ ; turbidez  $< 1$ ; condutividade  $649 \pm 25 \mu\text{S cm}^{-1}$ ; Na =  $13,01 \text{ mg L}^{-1}$ ; Ni =  $< 0,002 \text{ mg L}^{-1}$ .

Para os ensaios ecotoxicológicos, colocou-se 10 girinos de estágio de desenvolvimento 25 (GS25) (GOSNER, 1960) em um recipiente de vidro estéril e cilíndrico com 500 ml de solução. Cada recipiente foi uma unidade experimental (UE), com triplicata, com 30 girinos por tratamento, além de um controle somente com água para cada herbicida, também em triplicata. Após isso, os recipientes foram tampados com plástico filme a fim de evitar a evaporação e mantidos sob aeração constante. O ensaio foi crônico com duração de 168 horas (sete dias).

### 3.3 Perfil de leucócitos

Para a contagem das células, retirou-se 10  $\mu\text{L}$  sangue através de punção cardíaca, de 10 girinos de cada tratamento, logo após a eutanásia com lidocaína tópica (CONCEA, 2015). Cada amostra de sangue foi depositada em uma lâmina, seco a temperatura ambiente, fixada e corada com corante Panótico Rápido® (Laborclin Ltda, Pinhais, PR, Brasil) por cinco minutos. Após isso, as lâminas foram analisadas em microscopia óptica sob lente objetiva 100 x (CX31®, Olympus, Tóquio, Japão). Para essa avaliação, foram analisados 10 girinos por tratamento para a verificação do número de leucócitos, onde observou-se 100 células alteradas para cada indivíduo.

Os leucócitos foram classificados como granulócitos (basófilos, eosinófilos e neutrófilos/heterófilos) ou não granulócitos (linfócitos e monócitos), conforme sua morfologia e visualização no microscópio. Para esta espécie não foram encontrados estudos que evidenciem os perfis de leucócitos, portanto, foram adotados critérios baseados na metodologia de Allender e Fry (2008) e Claver e Quaglia (2009).

Para a definição de neutrófilo/ heterófilos seguimos Silva et al. (2020), que considera neutrófilo/heterófilo como células acidófilas grandes, esféricas a ovais, irregulares, com

núcleos multilobados que podem ou não ter em seu citoplasma grande número de células pequenas, elipsoidais ou grânulos alongados. Neste trabalho, nomeamos apenas como neutrófilos. Também seguindo Silva et al. (2020) utilizamos a razão neutrófilo/linfócito (N/L) como uma medida da resposta dos girinos aos agrotóxicos.

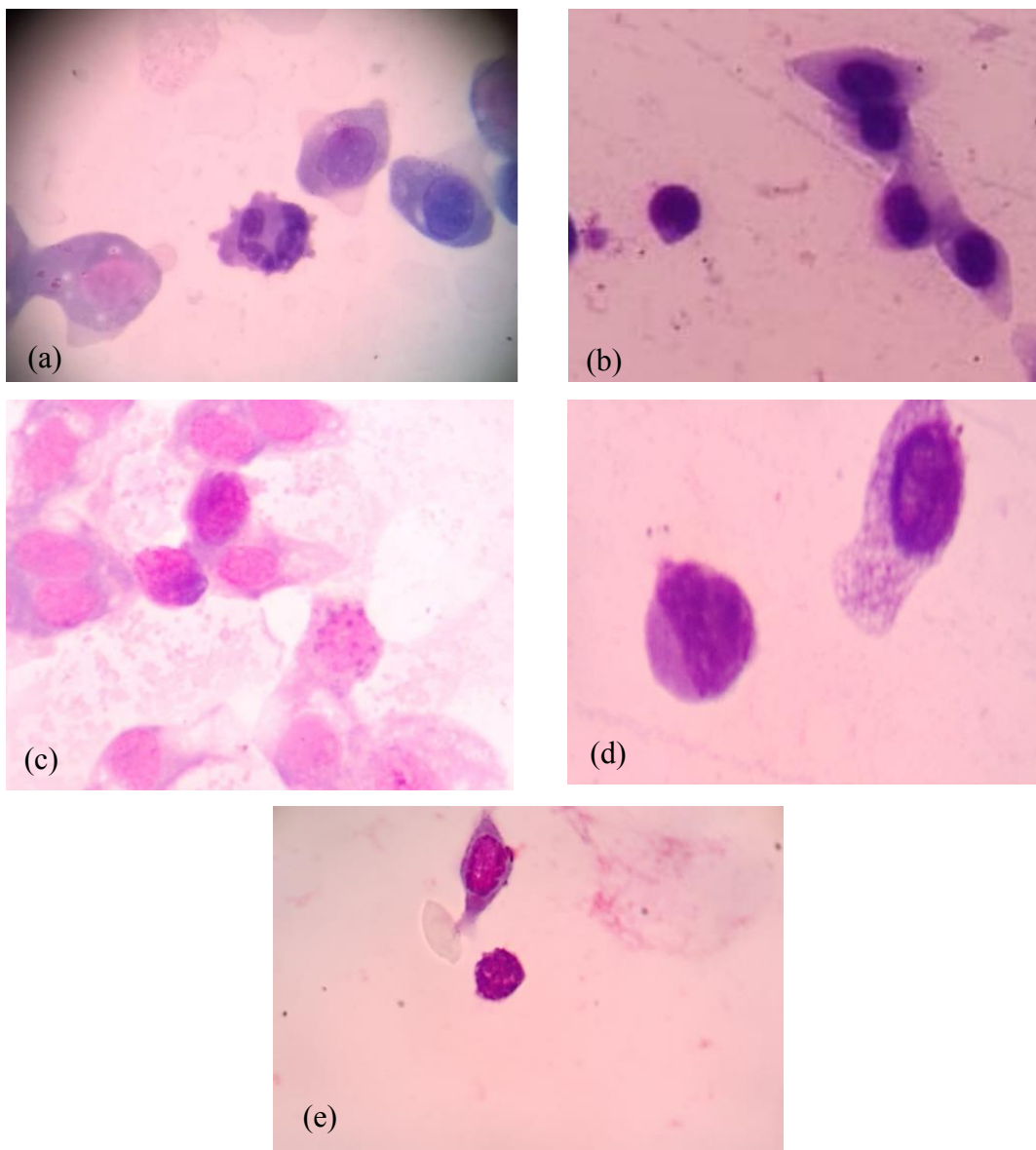
### 3.4 Análise estatística

Foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade; e para constatação de diferenças significativas entre tratamentos foi utilizada a análise não paramétrica Kruskal-Wallis, seguida de teste post-hoc de Dunn para comparação entre os tratamentos e controle, utilizando o software GraphPad Prism 9.3.1. Nos casos em que houve indicação de diferenças, elas foram localizadas por testes de comparações múltiplas. Foram considerados significativos valores de  $P < 0,05$ .

#### 4. RESULTADOS

Durante a realização dos testes não houve mortalidade de indivíduos em nenhum grupo experimental. Conforme especificado, em cada lâmina foram contabilizados 100 leucócitos dos tipos celulares: basófilo, eosinófilo, linfócito, monócito, neutrófilo (Figura 1), com 10 lâminas por concentração mais o controle, totalizando 110 lâminas analisadas e 11.000 leucócitos.

Figura 1- Leucócitos encontrados em amostras de sangue de girinos de *Boana faber*. (a) Neutrófilo; (b) Linfócito; (c) Eosinófilo; (d) Monócito; (e) Basófilo.



Fonte: Autora (2022).

Os girinos expostos a formulação comercial de ATZ apresentaram diferenças nos leucócitos (Tabela 1, Figura 2). Ocorreu um aumento nos linfócitos, principalmente em A2 e A5 (KW= 14,31, p = 0,013) e em eosinófilos em A4 (KW= 12,38, p =0,03), mas diminuição nos basófilos, significativo em girinos expostos a A4 (KW= 10,36, p <0,05). O número nos monócitos também foi maior que o controle, mas não foi significativamente diferente (KW= 6,29, p = 0,278). O número de neutrófilos encontrados foi semelhante em todas as amostras (KW=5,28, p = 0,38).

Os girinos expostos a Glifosato (Tabela 2, Figura 3) apresentaram maior número de linfócitos (KW = 12,98, p =0,02) e menor de basófilos em G2 e G4 (KW= 9,99, p =0,04). Os monócitos foram mais registrados nos girinos em G4 e G5 (KW = 19,06, p = 0,0019) e neutrófilos em G5 (KW= 11,98, p =0,03). Não houve diferença significativa nos eosinófilos observados nas amostras de sangue dos girinos (KW= 7,49, p = 0,18).

As proporções de neutrófilos/linfócitos tenderam a aumentar somente nos tratamentos G4 e G5 de glifosato (Tabela 2). No restante, a relação foi semelhante entre controle e tratamentos.

Tabela 1 - Frequências de leucócitos sanguíneos (100 células) de girinos de *Boana faber* no controle e tratamentos com atrazina. Média  $\pm$  erro padrão.

	Atrazina					
	Linfócitos	Basófilos	Eosinófilos	Monócitos	Neutrófilos	N/L
CA	46,3 $\pm$ 7,62	28,9 $\pm$ 9,19	11,40 $\pm$ 6,70	4,00 $\pm$ 1,82	2,60 $\pm$ 1,58	0,05 $\pm$ 0,03
A1	49,0 $\pm$ 7,10	24,5 $\pm$ 8,76	17,3 $\pm$ 9,48	5,60 $\pm$ 1,71	3,60 $\pm$ 1,90	0,07 $\pm$ 0,03
A2	57,4 $\pm$ 5,19*	21,8 $\pm$ 7,87	12,0 $\pm$ 2,54	5,30 $\pm$ 2,06	3,50 $\pm$ 2,17	0,06 $\pm$ 0,03
A3	52,7 $\pm$ 4,55	25,9 $\pm$ 6,14	12,4 $\pm$ 4,83	5,30 $\pm$ 2,50	3,70 $\pm$ 1,83	0,07 $\pm$ 0,03
A4	52,2 $\pm$ 4,52	19,7 $\pm$ 4,12*	18,4 $\pm$ 5,88*	5,22 $\pm$ 1,39	4,44 $\pm$ 2,01	0,08 $\pm$ 0,04
A5	57,0 $\pm$ 9,65*	21,9 $\pm$ 9,73	13,6 $\pm$ 9,50	4,20 $\pm$ 1,23	3,30 $\pm$ 1,49	0,06 $\pm$ 0,03

\* Diferença significativa pelo teste Kruskal- Wallis, seguido de post-hoc de Dunn (p < 0,05).

Fonte: Elaborado pela autora, (2022).

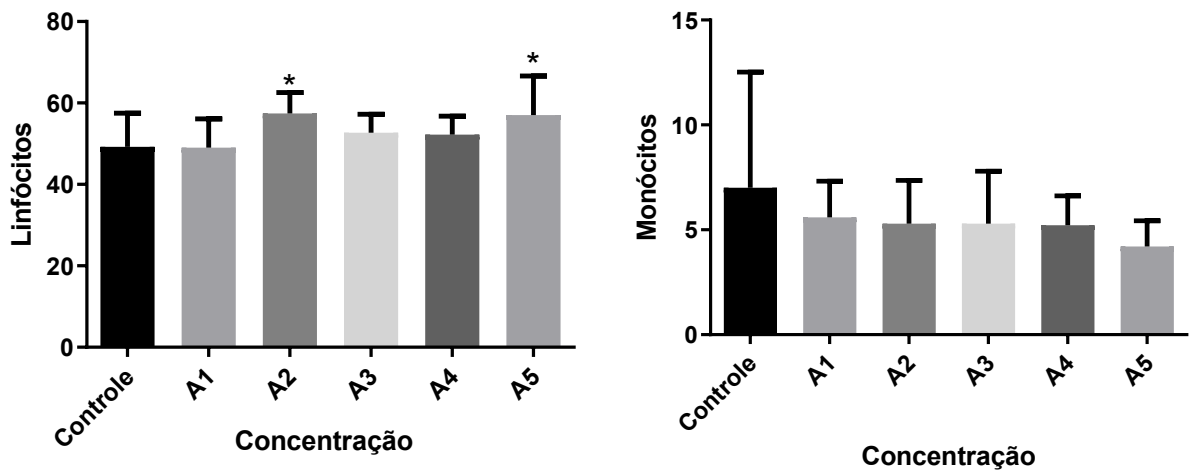
Tabela 2- Frequências de leucócitos sanguíneos (100 células) de girinos de *Boana faber* no controle e tratamentos com glifosato. Média  $\pm$  erro padrão.

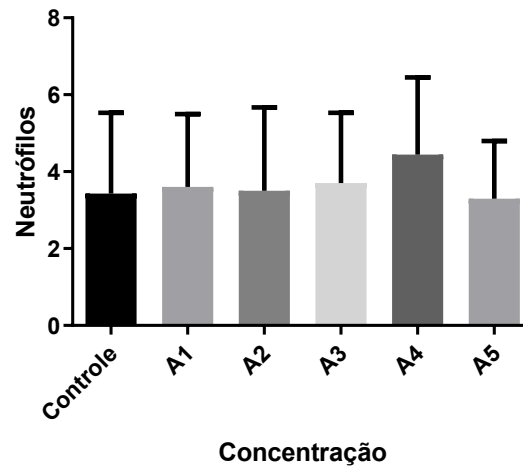
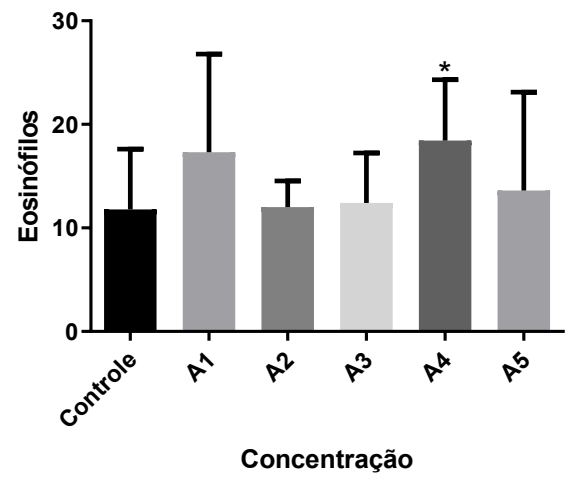
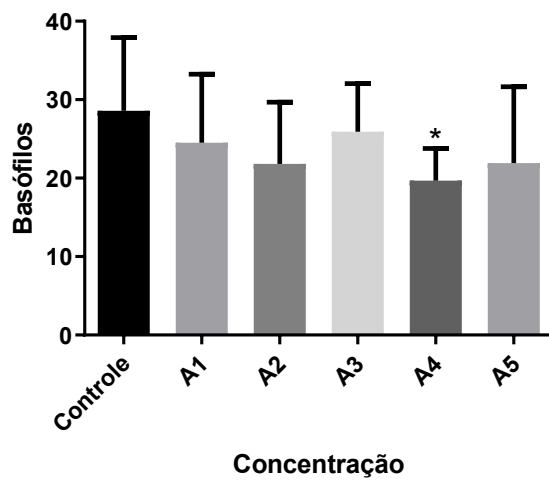
Glifosato						
	Linfócitos	Basófilos	Eosinófilos	Monócitos	Neutrófilos	N/L
CG	46,3 $\pm$ 7,61	28,9 $\pm$ 9,19	11,40 $\pm$ 6,70	4,00 $\pm$ 1,82	2,60 $\pm$ 1,58	0,05 $\pm$ 0,02
G1	52,2 $\pm$ 6,65	19,9 $\pm$ 8,67	18,5 $\pm$ 8,10	6,30 $\pm$ 3,59	3,10 $\pm$ 1,79	0,06 $\pm$ 0,07
G2	58,1 $\pm$ 4,60*	16,5 $\pm$ 6,83*	15,1 $\pm$ 6,04	6,20 $\pm$ 1,55	4,10 $\pm$ 1,79	0,07 $\pm$ 0,03
G3	54,0 $\pm$ 7,67	22,7 $\pm$ 9,46	17,7 $\pm$ 7,47	3,50 $\pm$ 2,59	2,10 $\pm$ 1,52	0,04 $\pm$ 0,02
G4	56,4 $\pm$ 5,62*	15,9 $\pm$ 6,44*	13,5 $\pm$ 6,82	8,80 $\pm$ 2,59*	5,40 $\pm$ 3,06	0,1 $\pm$ 0,06
G5	52,2 $\pm$ 12,4	19,0 $\pm$ 14,15	14,1 $\pm$ 8,24	9,00 $\pm$ 7,09*	5,70 $\pm$ 4,90*	0,12 $\pm$ 0,12

\* Diferença significativa pelo teste Kruskal- Wallis, seguido de post-hoc de Dunn ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Elaborado pela autora, (2022).

Figura 2- Frequência de leucócitos (100 células) em girinos *Boana faber* expostos aos tratamentos de atrazina.



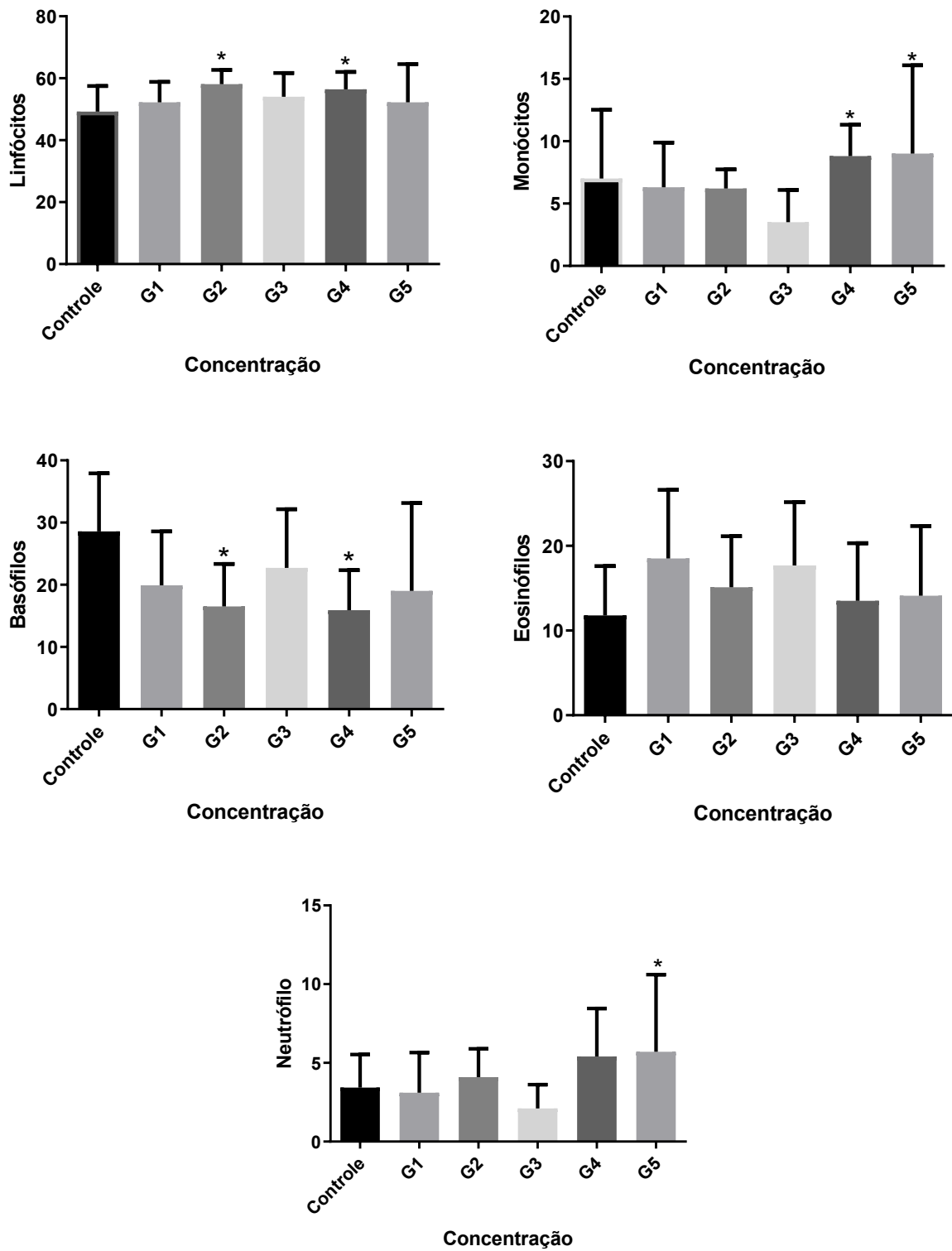


As barras representam a média  $\pm$  erro padrão.

\* Diferença significativa pelo teste Kruskal- Wallis, seguido de post-hoc de Dunn ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Figura 3- Frequência de leucócitos (100 células) em girinos *Boana faber* expostos aos tratamentos de glifosato.



As barras representam a média  $\pm$  erro padrão.

\* Diferença significativa pelo teste Kruskal- Wallis, seguido de post-hoc de Dunn ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Elaborado pela autora (2022).



## 5. DISCUSSÃO

As células do sistema imune têm grande papel adaptativo frente a adversidades (DE SOUZA, 2019). Apesar de haver poucos estudos avaliando o efeito de agrotóxicos em perfis de leucócitos de anfíbios, há evidências que sugerem que eles podem induzir respostas leucocitárias (ROBINSON et al., 2021). Há relatos de mudanças de tipos de células brancas do sangue ocorrerem de acordo com o tipo do agrotóxico usado e essa resposta está relacionada com o estresse (FANALI, 2016), onde isto pode estar relacionado com o aumento da sensibilidade contra doenças pelo enfraquecimento do sistema imune (WEDEMEYER, 1997; REHULKA; MINARIK, 2004).

A contagem de leucócitos pode variar dependendo do sexo, da idade, da estação do ano, da dieta, da reprodução e de fatores ambientais e patológicos (DAVIS; MANEY; MAERZ, 2008; LIU et al., 2013; ARIKAN; ÇIÇEK, 2014; BUNJERDLUK; KITANA; POMCHOTE, 2021; DE GREGORIO; FRANCO-BELUSSI; de OLIVEIRA, 2021; FRANCO-BELUSSI et al., 2021), complicando as referências. Também, a duração da exposição pode afetar a detecção da resposta ao estresse (DAVIS; MANEY; MAERZ, 2008) como a exposição ao herbicida glifosato diminuiu o número de linfócitos e aumentou o número de neutrófilos após 20 dias (BURRACO; DUARTE; GOMEZ-MESTRE, 2013), porém em 10 dias não houve essa alteração (BURRACO; GOMEZ-MESTRE, 2016) em estudos semelhantes.

Um dos eventos fisiológicos em que os leucócitos são relacionados é a defesa do organismo contra patógenos, já que pode ocorrer um aumento de células leucocitárias (leucocitose) em sangue periférico, devido a um processo infeccioso e/ou inflamatório (CERNY; ROSMARIN, 2012; WIDICK; WINER, 2016) e se houver leucopenia (depressão do sistema imune), o organismo fica mais suscetível a patógenos (DALLAL; LEIGHTON; TRANG, 2012). Isso pode ser ocasionado pela exposição a xenobióticos (MARCANTONIO, 2005).

Nos anfíbios, cada leucócito desempenha funções imunes específicas, assim como para os demais vertebrados (DE SOUZA, 2019). Conforme Cabagna Zenklusen et al. (2014), os leucócitos são divididos em dois grandes grupos, granulócitos e agranulócitos, seguindo a presença ou não de granulações específicas.

Os linfócitos são as células mais comuns no sangue periférico dos anfíbios, (DUELLMAN E TRUEB, 1986; CABAGNA ZENKLUSEN et al., 2014; DE GREGÓRIO, 2019) e junto com os monócitos, constituem os agranulócitos, sendo 80% da contagem de leucócitos (ALLENDER; FRY, 2008; ARIKAN; ÇIÇEK, 2014). Os chamados granulócitos são encontrados como eosinófilos, basófilos e neutrófilos (ou heterófilos), e também trombócitos (ALLENDER; FRY, 2008; ARIKAN; ÇIÇEK, 2014). Os trombócitos não foram tratados neste estudo.

A composição leucocitária de girinos de *Boana faber* expostos a ATZ e GLI seguiu a sequência linfócito – basófilo – eosinófilo – monócito – neutrófilo. Isso pode significar que esse é o padrão comum para a espécie, já que é a primeira vez que as células sanguíneas de *B. faber* são descritas. Os linfócitos são glóbulos brancos observados em anfíbios, apresentam um núcleo redondo com cromatina densa e citoplasma basofílico e, algumas vezes, microvilosidades (DUELLMAN; TRUEB, 1986). Além disso, essas células fazem parte do sistema imunológico adaptativo (DAVIS; MANEY; MAERZ, 2008; ARIKAN; ÇIÇEK, 2014), estão relacionadas à produção de fatores de crescimento hematopoiéticos (ARIKAN; ÇIÇEK, 2014) e respondem a estressores com expressão de antígenos específicos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; DAVIS; MANEY; MAERZ, 2008; ROBERT; OHTA, 2009; LEWIS; BLUTT, 2019), através de uma reorganização genética de receptores, em que são geralmente classificados em células B (produtoras de imunoglobulinas-anticorpos) e células T citotóxicas e não-citotóxicas (LEWIS; BLUTT, 2019), uma vez que produzem imunoglobulinas e recrutam outros tipos de células (CABAGNA et al. 2005; DAVIS; MANEY; MAERZ, 2008).

Os basófilos são granulócitos pequenos com núcleo não lobado centralizado que possivelmente pode não ser reconhecido e que possuem grânulos basofílicos escuros (ARIKAN; ÇIÇEK, 2014). Já para Fenerick Junior et al. (2006), os basófilos são comuns e apresentam núcleos sem segmentação e citoplasma com exuberantes grânulos basofílicos. Estes estão associados à hipersensibilidade, onde a histamina dos grânulos é liberada no tecido alvo com o intuito de recrutar eosinófilos e neutrófilos para auxiliar na resposta imune (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Para Nakashima et al. (2018), o principal papel dos basófilos está relacionado a respostas inflamatórias alérgicas. Apesar disso, o papel dos basófilos no sistema imunológico dos anfíbios não é muito claro (SALINAS et al., 2015), por isso não sabemos afirmar sobre os valores desse leucócito em *B. faber*.

Os eosinófilos geralmente possuem núcleos menos lobados do que os dos neutrófilos com grânulos grandes, geralmente esféricos, e corados com um núcleo excêntrico. (ARIKAN; ÇIÇEK, 2014). Para Fenerick Junior et al. (2006), os eosinófilos têm núcleos segmentados e citoplasma com numerosos grânulos ovalados ou esféricos, fracamente acidófilos. Estudos mostraram que estão ligados a reações de hipersensibilidade, sendo recrutadas para áreas com inflamação (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004) e que respondem a estímulos como infecções parasitárias ou poluentes (KIESECKER, 2002; BARNI et al., 2007; YOUNG et al. 2012; ZHELEV; POPGEORGIEV; ANGELOV, 2013), além de estarem associadas a metamorfose e decomposição de tecidos, com aumento no seu número comumente observados em girinos durante seu clímax metamórfico (DAVIS, 2009).

Os monócitos tem sua morfologia parecida e são frequentemente confundidos com os grandes linfócitos (ARIKAN; ÇIÇEK, 2014). Já conforme Fenerick Junior et al, (2006) e Arauco (2006), são raros com núcleo geralmente excêntrico, que ocupa quase totalmente a célula, com citoplasma levemente vacuolizado e fracamente basofílico. Também atuam na resposta imune adquirida (LEWIS; BLUTT, 2019) exercendo papel fagocítico (DAVIS; MANEY; MAERZ, 2008; LEWIS; BLUTT, 2019), são precursores de macrófagos teciduais e ficam no sistema sanguíneo por pouco tempo (DAVIS; MANEY; MAERZ, 2008). Estão ligados a infecções e podem agir como células apresentadoras de antígenos (APCs) (ROBERT; OTA, 2009).

Os neutrófilos apresentam núcleo segmentado e citoplasma com extensas áreas de retículo endoplasmático granular bem desenvolvido (FENERICK JUNIOR et al, 2006). Os grânulos são eosinofílicos, alongados ou fusiformes e em grande número, sendo que, a morfologia pode mudar possivelmente pelos estágios de desenvolvimento dos neutrófilos (ARIKAN; ÇIÇEK, 2014). Também são associados ao sistema imune inato e, quando presente no tecido alvo, tem funções fagocitárias e citotóxicas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; ROBERT; OTA, 2009; PRIEL; KUHNS, 2019), sendo sua principal atribuição a colaboração em respostas imunológicas contra infecções ou intoxicações (THRALL et al., 2004). Além disso, estão relacionadas com a quimiotaxia e a morte de bactérias com fagocitose (ARIKAN; ÇIÇEK, 2014).

Já a proporção neutrófilos/linfócitos (N/L) demonstra mudanças no estresse e equilíbrio entre funções imunológicas e respostas não específicas (DAVIS; MANEY; MAERZ, 2008) ainda que seja difícil encontrar consistência na razão. Os neutrófilos e

linfócitos são os tipos celulares mais relevantes, além da contagem total de leucócitos para caracterizar os parâmetros do leucograma em anuros (FRANCO-BELUSSI et al., 2022). Neutrófilos e linfócitos têm respostas opostas aos estressores ambientais. Alguns estudos demonstram que o aumento da relação é referente ao maior estresse que afeta os girinos e que isso seria uma resposta comum em anfíbios que são sujeitos a presença de agrotóxicos (DAVIS; MANEY; MAERZ, 2008; LAJMANOVICH et al., 2015). Conforme Davis et al. (2008), uma N/L mais alta mostra, confiavelmente, níveis de glicocorticoides altos. Esses hormônios são liberados e provocam alterações no perfil leucocitário em resposta ao estresse (Silva et al., 2020), já que conforme Barsotti (2014), o efeito da resposta do estresse no sistema imunológico depende da intensidade e da duração dos níveis elevados desse hormônio, concordando com o estudo de Vila (2013), que mostra que a relação N/L pode ser afetada se houver perturbações por um longo tempo, dependendo da intensidade e persistência do estresse exposto.

A comparação de N/L pode facilitar a distinção entre populações expostas a estressores utilizada como um ponto de partida para as avaliações de qualidade de habitat em locais preocupantes já que teve uma implementação com iniciativa de comparação populacional de conservação (LITMER; FREAKER; MURRAY, 2020). Alguns estudos já analisaram essa razão. Gavel et al. (2019) notaram um aumento na relação N/L em relação ao controle quando expuseram sapos madeira a uma alta concentração de tiametoxan por sete dias, que indicaram estresse leve a moderado. No estudo de Robinson et al. (2021), a proporção N/L aumentou com a exposição à clotianidina, em 1 mg/L, mostrando uma resposta ao estresse, com maiores proporções, indicando maior estresse fisiológico. No estudo de Santana et al. (2021), a razão N/L teve uma variação entre locais, intermediários e de referência poluídos (todos com valores  $<2.0$ ) podendo indicar efeitos prejudiciais da poluição com aumento ou não da suscetibilidade a doenças parasitárias. Porém, a diminuição da razão N/L em resposta a exposições a contaminantes estão se tornando mais prevalentes (GAVEL et al., 2021).

Em relação à razão N/L do presente estudo, os linfócitos foram mais presentes entre os leucócitos, resultando em vários valores da razão com a proporção  $<1$ , e além disso, observando os valores N/L obtidos pelas médias, apenas duas proporções foram  $>1$  e com maior elevação em relação ao controle. Esses dois valores foram vistos nas duas concentrações mais altas de glifosato, mostrando que esse herbicida prejudicou o sistema imune dos girinos em 500  $\mu\text{g/L}$  (G4) e 1000  $\mu\text{g/L}$  (G5) indicando estresse, assim como o

estudo de Ruso et al. (2021), que também mostrou que os linfócitos tiveram maior presença do que neutrófilos dentre o sangue coletado, resultando em mais valores  $<1$  e com Falso et al., (2015) em que os perfis leucocitários indicaram/sugeriram sensibilidade dos indivíduos a perturbações ambientais, no nível imunológico, pelo aumento da razão N/L. Os valores de controle e dos tratamentos do nosso estudo foram parecidos com os encontrados no estudo semelhante de Gavel et al., (2021) que teve as relações médias  $N/L \pm$  desvio padrão de  $0,04 \pm 0,04$ .

Os resultados de De Gregório (2019), apontam que conforme o desenvolvimento animal as respostas imunes tornam-se mais especializadas e desta forma aumentam a produção de células mais eficientes na defesa do organismo, como os linfócitos e, a contagem dos demais leucócitos diminui. Houve aumento dos linfócitos nos girinos expostos a ATZ e GLI, semelhantes ao encontrado por Lajmanovich et al. (2015) e Viriato et al. (2021) em anfíbios expostos ao 2,4-D, afetando os parâmetros hematológicos e imunológicos dos animais e também por Carvalho et al. (2017), com a exposição a metais pesados, indicando uma mobilização das células como proteção dos organismos contra infecções. Ao mesmo tempo, houve diminuição dos basófilos, e redistribuição nos números de monócitos, neutrófilos e eosinófilos, concordando com De Gregório (2019).

A comparação entre anuros de áreas poluídas com os de áreas preservadas, mostrou uma elevação na contagem de eosinófilos e basófilos, indicando uma tentativa de neutralizar os efeitos dos agentes tóxicos (ROMANOVA; EGORIKHINA, 2006). No presente estudo houve um aumento no número de eosinófilos, concordando com o estudo de De Gregório (2019) que expôs girinos da espécie *Rana catesbeiana* (Anura) ao acetato de Ciproterona (CPA), em duas concentrações, e teve um aumento no número de eosinófilos no estudo indicando que possivelmente ocorreram efeitos adversos somáticos pelo CPA, que pode ser um mecanismo adaptativo de sobrevivência em ambientes contaminados (FOURNIER et al., 2005).

Embora não tenha sido significativo, o aumento de eosinófilos, especialmente nos girinos expostos a GLI, pode ser explicado como uma resposta ao contaminante, pois os eosinófilos respondem a estímulos como infecções parasitárias ou poluentes (ZHELEV; POPGEORGIEV; ANGELOV, 2013). Girinos expostos a concentração A4 de Atrazina foram os que mais se diferenciaram em relação aos eosinófilos, apresentando ao mesmo tempo significativa diminuição em basófilos e leve aumento em neutrófilos. No presente estudo, os

grupos expostos principalmente a A4 provavelmente desencadearam uma resposta inflamatória, ativando o recrutamento e ativação de diferentes leucócitos no organismo-teste. O tratamento A4 corresponde a 47,21 µg/L de ATZ, uma concentração já registrada em águas superficiais no Brasil (MOREIRA et al., 2012), e, portanto, passível de ser encontrada no ambiente.

Os girinos apresentaram maior diferenciação nos leucócitos quando expostos as diferentes concentrações de glifosato. Os linfócitos aumentaram e basófilos diminuíram significativamente na exposição a G2 e G4, enquanto monócitos e neutrófilos aumentaram em G5 (monócitos também aumentaram em G4). Os neutrófilos são células fagocíticas primárias que atacam partículas e organismos estranhos, e da mesma forma, os monócitos também são fagocitários e podem aumentar na circulação durante infecções (DAVIS; COOK; ALTIZER, 2004). Isso explicaria o aumento de monócitos e neutrófilos na concentração mais alta de Glifosato, pois os girinos estariam tentando se proteger do agrotóxico podendo indicar presença de intoxicações

O número de linfócitos é proporcionalmente inverso ao número dos outros leucócitos, ou seja, se eles aumentam, mudam os valores em basófilos, monócitos eosinófilos e neutrófilos. Desta maneira, é possível dizer que a partir de G2, ou seja, de 144 µg/L de GLI os leucócitos começam a sofrer diferenciação para a resposta imune, possivelmente mostrando os efeitos sofridos pelo agrotóxico. Todas as concentrações testadas no presente estudo são ambientalmente relevantes e em todas houve mudanças no perfil leucocitário dos girinos de *B. faber*. A concentração de 144 µg/L (G2) foi registrada em água superficiais no Brasil (DORNELLES; OLIVEIRA, 2014), 280 µg/L é o máximo permitido em águas superficiais classe III no Brasil (BRASIL, 2005) (G3), 500 µg/L (G4) é o máximo permitido água de consumo humano no Brasil (BRASIL, 2017) e 1000 µg/L (G5) foi registrada em águas superficiais na Argentina (PERUZZO et al., 2008).

Essa reestruturação dos leucócitos nos girinos expostos as concentrações de ATZ pode mostrar uma adaptação ao meio tóxico e conseqüentemente uma tendência de retorno ao normal padrão de leucócitos. No sangue dos girinos expostos a GLI a diferença mais explícita mostra clara resposta do sistema imunológico a um agente estressor. Ao mesmo tempo que o perfil hematológico apresenta mudanças, outros sistemas dos indivíduos podem ser permanentemente feridos e afetados para o resto da vida do animal pela exposição a estes agrotóxicos.

Outro estudo realizado com girinos de *B. faber* expostos a ATZ e GLI mostrou diferenças no tamanho do corpo, malformações corporais e formação de micronúcleos (PAVAN, 2021). Essas respostas indicam como agrotóxicos podem afetar diferentemente a espécie, e corrobora com o presente estudo. Embora Pavan (2021) não tenha identificado diferença na toxicidade de ATZ e GLI, analisando o perfil leucocitário, o GLI parece ter ativado uma maior reação imunológica e em mais concentrações, quando comparado a ATZ.

## 6. CONCLUSÃO

Relacionar os biomarcadores de estresse com resultados biológicos é um desafio, porém, necessário para compreender os efeitos da exposição a herbicidas. Assim, a análise de perfis de leucócitos de anfíbios pode demonstrar que estes agrotóxicos aumentam as consequências gerais para a saúde e alteram os processos futuros da história de vida dos anfíbios.

No geral, os resultados sugerem que a exposição a atrazina e especialmente a glifosato afetaram o perfil leucocitário, sugerindo ajustes nos parâmetros como forma de aumentar o número de linfócitos e eosinófilos e diminuindo os outros leucócitos indicando um aumento geral na suscetibilidade do animal às mudanças ambientais com o aumento da defesa celular do organismo, indicando que este método pode ser utilizado como biomarcador. O glifosato apresentou maior diferença no perfil, mostrando uma maior resposta dos organismos frente a este estressor do que em relação a atrazina.

Sendo assim, espera-se que este trabalho possa ter contribuído com os estudos relacionados aos perfis de leucócitos como biomarcadores, podendo auxiliar em estudos futuros relacionados ao tema e na compreensão de como o sistema imunológico dos anfíbios funciona, mais especificamente de *B. faber*, quando expostos a formulações comerciais de agrotóxicos. Sugere-se mais pesquisas que utilizem o perfil de leucócitos como biomarcador para poder haver comparação já que é necessário um entendimento de ameaças que os anfíbios sofrem por diversas condições e suas interações.



## REFERÊNCIAS

- ADAMS, S. M. *et al.* The use of biomarkers in ecological risk assessment: recommendations from the Christchurch conference on Biomarkers in Ecotoxicology. **Biomarkers**, vol. 6, n. 1, p. 1–6, set. 2001. doi:10.1080/135475001452724
- ALLENDER, M. C.; FRY, M. M. Amphibian hematology. **Veterinary Clinics of North America**, v. 11, n. 3, p. 463–480, set. 2008. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2008.03.006>
- ALMEIDA, P. R.; RODRIGUES, M. V.; IMPERADOR, A. M. Toxicidade aguda (LC50) e efeitos comportamentais e morfológicos de formulado comercial com princípio ativo glifosato em girinos de *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leptodactylidae) e *Rhinella ictérica* (Anura, Bufonidae). **Engenharia Sanitaria e Ambiental [online]**, v. 24, n. 6, p. 1115-1125, dez. 2019. ISSN 1809-4457. doi: <https://doi.org/10.1590/S1413-41522019166886>.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **A14 – Atrazina**. Brasília, DF, c2021. Disponível em: <[https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias\\_autorizadas/a/4141json-file-1/view](https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias_autorizadas/a/4141json-file-1/view)> Acesso em: 15 jul. 2021.
- ARAUCO, L. R. R. **Efeito do extrato hidroalcoólico de própolis em girinos de rã touro (*Rana Catesbeiana*)**. Jaboticabal, 2006 vi, 102 f. il. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2006.
- ARIKAN, H.; CICEK, K. Haematology of amphibians and reptiles: a review. North West. **J. Zool.**, vol. 10, n. 1, p. 190-209, 2014.
- ATSDR. **Potential for human exposure**. In: Toxicological Profile for Atrazine. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, p. 129-160, 2003.
- BALCI, B. *et al.* Degradation of atrazine in aqueous medium by electrocatalytically generated hydroxyl radicals. A kinetic and mechanistic study. **Water Res.** v. 43, n. 7, p.1924–1934, abr. 2009. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.01.021>
- BARANOWSKA, I., *et al.* ELISA and HPLC methods for atrazine and simazine determination in trophic chains samples. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** v. 70, n. 2, p. 341–348, jun. 2008. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.06.012>.
- BARNI, S. *et al.* Evaluation of *Rana snk esculenta* blood cell response to chemical stressors in the environment during the larval and adult phases. **Aquatic Toxicology**, vol. 81, n. 1, p. 45–54, fev. 2007. doi:10.1016/j.aquatox.2006.10.012
- BARSOTTI, A. M. G. Modulação dos níveis plasmáticos de corticosterona e imunocompetência em resposta ao tratamento exógeno com ACTH em *Hypsiboas fabar*. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia. 59 p. 2014.
- BRASIL, 2017. **Ministério da Saúde**. Portaria de consolidação Nº 5, de 28 de setembro de 2017. Dispõe sobre a Consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde. Disponível em: [http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2017/prc0005\\_03\\_10\\_2017.html](http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2017/prc0005_03_10_2017.html). Acesso em: 24 out. 2021.

BRASIL. **Resolução nº 357 de 17 de março de 2005**. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, n. 053, p. 58-63, 18 mar. 2005. Disponível em: [https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Resolucao/2005/res\\_conama\\_357\\_2005\\_classificacao\\_corpos\\_agua\\_rtfcd\\_a\\_altrd\\_res\\_393\\_2007\\_397\\_2008\\_410\\_2009\\_430\\_2011.pdf](https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Resolucao/2005/res_conama_357_2005_classificacao_corpos_agua_rtfcd_a_altrd_res_393_2007_397_2008_410_2009_430_2011.pdf). Acesso em: 24 out. 2021.

BUNJERDLUK, K.; KITANA, J.; POMCHOTE, P. Blood cell morphology and leukocyte profile of the Himalayan Newt *Tylototriton verrucosus* Anderson, 1871 (*Urodela: Salamandridae*) in Thailand. **Tropical Natural History**, vol. 21, n. 2, p. 274-284, 2021.

BURRACO, P.; DUARTE, L.J.; GOMEZ-MESTRE, I. Predator-induced physiological responses in tadpoles challenged with herbicide pollution. **Curr. Zool.** vol. 59, n. 4, p. 475-484, ago. 2013. doi: <https://doi.org/10.1093/czoolo/59.4.475>.

BURRACO, P.; GOMEZ-MESTRE, I. Physiological stress responses in amphibian larvae to multiple stressors reveal marked anthropogenic effects even below lethal levels. **Physiol. Biochem. Zool.** vol, 89, n. 6, p. 462-472, 2016. doi: <https://doi.org/10.1086/688737>.

CABAGNA ZENKLUSEN, M. C. *et al.* Generalidades sobre la Hematología de anfibios anuros. Ministerio de Innovación y Cultura. Secretaría de Producciones, Industrias y Espacios Culturales. Museo Provincial de Ciencias Naturales Florentino Ameghino. Comunicaciones del Museo Provincial de Ciencias Naturales "Florentino Ameghino". **Nueva Serie**, vol. 18, n. 1, p. 1-18, abr. 2014.

CABAGNA, M.C. *et al.* Hematological parameters of health status in the common toad *Bufo arenarum* in agroecosystems of Santa Fe Province, Argentina. **Applied Herpetology**, vol 2, n. 4, p. 373–380, jan. 2005. Doi: 10.1163/157075405774483085

CAREY, C. How Physiological Methods and Concepts Can Be Use in Conservation Biology, **Integrative and Comparative Biology**, v. 45, n. 1, p. 4–11, jan. 2005. doi:10.1093/icb/45.1.4

CARMO, D.A. *et al.* Comportamento ambiental e toxicidade dos herbicidas atrazina e simazina. **Ambi-Agua**. v. 8, n. 1, p. 133–143, abr. 2013. doi: <https://doi.org/10.4136/ambi-agua.1073>.

CARVALHO, C.S. *et al.* Blood cell responses and metallothionein in the liver, kidney and muscles of bullfrog tadpoles, *Lithobates catesbeianus*, following exposure to different metals, **Environmental Pollution**, v. 221, p. 445-452, fev. 2017. ISSN 0269- 7491. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.12.012>.

CERNY, J.; ROSMARIN, A. G. Why Does My Patient Have Leukocytosis?. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, vol. 26, n. 2, p. 303-319, abr. 2012. doi: 10.1016/j.hoc.2012.01.001.

CLAVER, J. A.; QUAGLIA, A. I. E. Comparative morphology, development, and function of blood cells in nonmammalian vertebrates. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 18, n. 2, p. 87–97, 2009.

CONCEA (Brasil). 2015. **Resolução normativa Nº 25, 29 de setembro de 2015**. Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais para Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal – CONCEA. Disponível em:

<https://antigo.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html>. Acesso em: 20 set. 2021.

DALLAL, R. M.; LEIGHTON, J.; TRANG, A. Analysis of leukopenia and anemia after gastric bypass surgery. **Surgery for Obesity and Related Diseases**, v. 8, n. 2, p. 164-168, abr. 2012. DOI: 10.1016/j.soard.2011.02.006.

DAVIDSON, C.; KNAPP, R. A. Multiple stressors and amphibian declines: dual impacts of pesticides and fish on yellow-legged frogs. **Ecological Applications**, v. 17, n. 2, p. 587–597, mar. 2007. doi:10.1890/06-0181

DAVIS, A. K.; MAERZ, J. C. Effects of larval density on hematological stress indices in salamanders. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology**, v. 311, n. 9, p. 697-704, jul. 2009. doi: <https://doi.org/10.1002/jez.557>

DAVIS, A.K. Metamorphosis-related changes in leukocyte profiles of larval bullfrogs (*Rana catesbeiana*). **Comp Clin Pathol** vol. 18, p. 181–186, mai. 2009. doi: <https://doi.org/10.1007/s00580-008-0773-8>

DAVIS, A.K.; COOK, K.C.; ALTIZER, S. Leukocyte profiles of House Finches with and without mycoplasmal conjunctivitis, a recently emerged bacterial disease. **Ecohealth** vol. 1, p. 362–373, 2004. doi: <https://doi.org/10.1007/s10393-004-0134-2>

DAVIS, A.K.; MAERZ, J.C. Effects of exogenous corticosterone on circulating leukocytes of a salamander (*Ambystoma talpoideum*) with unusually abundant eosinophils. **Int J Zool.** vol. 2010, n. 3, pp. 8, mar. 2010. doi: <https://doi.org/10.1155/2010/735937>

DAVIS, A.K.; MANEY, D.L.; MAERZ, J.C. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. **Functional Ecology**, v. 22, n. 5, p. 760- 772, out. 2008. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01467.x>

DE GREGÓRIO, L. S. **Ação de desreguladores endócrinos em *Rana catesbeiana* (Anura) em estágio larval e juvenil: efeitos genotóxicos, morfológicos e respostas imunológicas.** 2019. Tese (Doutorado em Biologia Animal) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, 2019.

DE GREGORIO, L.S.; FRANCO-BELUSSI, L.; de OLIVEIRA, C. Leukocyte profile of tadpoles and juveniles of *Lithobates catesbeianus* Shaw, 1802 (Anura) and the effects of nonylphenol and cyproterone acetate. **South American Journal of Herpetology**, v. 20, n. 1, p. 75-83, 2021. doi: 10.2994/SAJH-D-19-00111.1.

DE SOUZA, B. F. S. **Efeito de nanotubos de carbono de parede múltipla em girinos de *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802) sobre biomarcadores em diferentes níveis de organização biológica.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental) – Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba, 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/11171>.

DEPLEDGE, M. H.; FOSSI, M. C. The role of biomarkers in environmental assessment(2). **Invertebrates. Ecotoxicology**, v. 3, n. 3, p. 161–172, set. 1994. doi:10.1007/bf00117081

DORNELLES, M.F.; OLIVEIRA, G.T. Effect of Atrazine, Glyphosate and Quinclorac on Biochemical Parameters, Lipid Peroxidation and Survival in Bullfrog Tadpoles (*Lithobates catesbeianus*). **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** v. 66, p. 415–429. 2014. doi: <https://doi.org/10.1007/s00244-013-9967-4>.

DUELLMAN, X.; TRUEB, L. Biology of Amphibians. New York McGraw-Hill, 1986.

EDGE, C. B. *et al.* A silviculture application of the glyphosate-based herbicide Visionmax to wetlands has limited direct effects on amphibian larvae. **Toxicology and Chemistry**. v. 31, n. 10, p. 2375-2383, jul. 2012. doi: <https://doi.org/10.1002/etc.1956>.

EFSA. Panel on Plant Protection Products and their and Ockleford. Scientific Opinion on the state of the science on pesticide risk assessment for amphibians and reptiles. **EFSA Journal**, vol. 16, n. 2, p. 331, fev. 2018. doi: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5125>

FALSO, P. G., *et al.* The effect of long-term corticosterone treatment on blood cell differentials and function in laboratory and wild-caught amphibian models. **General and comparative endocrinology**. v. 212, p. 73-83, jan. 2015. doi:10.1016/j.ygcen.2015.01.003

FANALI, L. Z. **Descrição anatômica e efeitos do benzo[ $\alpha$ ]pireno no fígado e no sangue das espécies *Physalaemus cuvieri* e *Leptodactylus fuscus* (Anura: Leptodactylidae)**. 2016. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal). Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto, 2016.

FENERICK JUNIOR, J. *et al.* Parâmetros hematológicos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, alimentadas com diferentes rações comerciais. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 32, p. 173 - 181, jul. 2006.

FORSON, D. D.; STORFER, A. Atrazine increases ranavirus susceptibility in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. **Ecological Applications**, v. 16, n. 6, p. 2325–2332, dez 2006. doi:10.1890/1051-0761(2006)016[2325:airsit]2.0.co;2

FOURNIER, M. *et al.* Immunotoxicology of amphibians. **Applied Herpetology**, v.2, p. 297-309, 2005. doi: 10.1163/1570754054507451

FRANCO-BELUSSI, L., *et al.* Hematological parameters of a Neotropical wild frog population, with a phylogenetic perspective on blood cell composition in Anura. **Current Zoology**, vol. 68, n. 3, p. 361-369, 2021. doi: 10.1093/cz/zoab059.

FREEMAN, J.L.; RAYBURN, A.L. Developmental impact of atrazine on metamorphosing *Xenopus laevis* as revealed by nuclear analysis and morphology. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n. 7, p. 1648-1653, jul. 2005. doi:10.1897/04-338r.1

GALLI, A. J. B.; MONTEZUMA, M. C. **Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura**. São Paulo: Monsanto do Brasil; 2005. 60 p.

GAVEL, M. J., *et al.* Effects of two pesticides on northern leopard frog (*Lithobates pipiens*) stress metrics: Blood cell profiles and corticosterone concentrations. **Aquatic Toxicology**, vol. 235, 105820, jun. 2021. doi:10.1016/j.aquatox.2021.105820

GAVEL, M.J., *et al.* Effects of two neonicotinoid insecticides on blood cell profiles and corticosterone concentrations of wood frogs (*Lithobates sylvaticus*). **Environmental Toxicology & Chemistry**, vol. 38, n. 6, p. 1273–1284, 2019. doi: <https://doi.org/10.1002/etc.4418>

GOSNER, K.L. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. **Herpetologica**. 16, p. 183–190, 1960.

HAYES, T. B. *et al.* The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist’s perspective. **The Journal of Experimental Biology**, v. 213, n. 6, p.921-933, mar. 2010. doi: 10.1242/jeb.040865

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.

HEREK, J.S. *et al.* Can environmental concentrations of glyphosate affect survival and cause malformation in amphibians? Effects from a glyphosate-based herbicide on *Physalaemus cuvieri* and *P. gracilis* (Anura: Leptodactylidae). **Environ. Sci. Pollut. Res.**, v. 27, p. 22619-22630, abr. 2020. doi:10.1007/s11356-020-08869-z

HOUCK, A.; SESSIONS, S. K. Research Article: Could atrazine affect the immune system of the frog, *Rana pipiens*?, **BIOS**, v. 77, n. 4, p. 107-112, dez. 2006. doi: [https://doi.org/10.1893/0005-3155\(2006\)77\[107:RACAAT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1893/0005-3155(2006)77[107:RACAAT]2.0.CO;2)

IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis). **Relatórios de comercialização de agrotóxicos**. 2021. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#historicodecomercializacao>. Acesso em: 19 jul. 2021.

JAYAWARDENA, U. A. *et al.* Toxicity of agrochemicals to common hourglass tree frog (*Polypedates cruciger*) in acute and chronic exposure. **International Journal of Agricultural and Biological Engineering**, v. 12, n. 5, p. 641-648, 2010. ISSN : 1560- 8530.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 488 p, 2004.

KIESECKER, J. M. Synergism between trematode infection and pesticide exposure: A link to amphibian deformities in nature? **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 99, n. 15, p. 9900–9904. 2002. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.152098899>.

LAJMANOVICH, R. C. *et al.* Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in tadpoles of the common toad (*Rhinella arenarum*) treated with glifosinate –ammonium. **Mutation Research**, v. 769, p. 7-12, jul. 2014. doi: 10.1016/j.mrgentox.2014.04.009.

LAJMANOVICH, R. C., *et al.* Harmful effects of the dermal intake of commercial formulations containing chlorpyrifos, 2, 4-D, and glyphosate on the common toad *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae). **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 226, n. 12, p. 1-12, 2015. doi: <https://doi.org/10.1007/s11270-015-2695-9>

LAVILLA, E. *et al.* ***Hypsiboas faber***. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T55479A11303155. 2010. doi: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-2.RLTS.T55479A11303155.en>.

LEWIS, D. E.; BLUTT, S. E. **Organization of the Immune System**. In: RICH, R. R.; FLEISHER, T. A.; SHEARER, W. T.; SCHROEDER, H. W.; FREW, A. J. WEYAND, C. M. **Clinical Immunology: Principles and Practice**. 5 Ed. Elsevier, 2019. ISBN: 978-0-7020-6896-6. DOI: 10.1016/B978-0-7020-6896-6.00024-7.

LITMER, A. R.; FREAKE, M; MURRAY, C.M. Neutrophil: Lymphocyte Ratios as a Measure of Chronic Stress in Populations of the Hellbender (*Cryptobranchus alleganiensis*) across a Habitat Quality Gradient. **Copeia**. v. 108, n. 2, p. 403-415, jun. 2020. doi: <https://doi.org/10.1643/CP-19-265>

LIU, C., *et al.* A research of peripheral blood cells annually in *Bufo bufo gargarizans*. **International Journal of Morphology**, vol. 31, n. 4, p. 1282–1288, 2013. doi: 10.4067/S0717-95022013000400022.

MACAGNAN, N. *et al.* 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, set. 2017. doi: 10.1007/s11356-017-9727-5.

MACBEAN, C. **The Pesticide Manual**. 15 ed., Reino Unido: British Crop Protection Council, 2010.

MAGALHÃES, D. de P.; FERRÃO FILHO, A. da S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecol. Bras.**, v.12, n.3, p. 355-381, 2008.

MANIERO, G. D.; CAREY, C. Changes in selected aspects of immune function in the leopard frog, *Rana pipiens*, associated with exposure to cold. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 167, n. 4, p. 256–263, mai. 1997. doi:10.1007/s003600050072

MARCANTONIO, A. S. **Toxicidade do sulfato de cobre e do sulfato de zinco para rã touro, *Rana catesbeiana* Shaw, 1802: toxicidade aguda e crônica e parâmetros hematológicos**. Tese (Doutorado em Aquicultura de Águas Continentais). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005. 96 p.

METER, R. J. V. *et al.* Pesticide Uptake Across the Amphibian Dermis Through Soil and Overspray Exposures. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 69, n. 4, p. 545–556, nov. 2015. doi:10.1007/s00244-015-0183-2

MOREIRA, J. C. *et al.* Contaminação de águas superficiais e de chuva por agrotóxicos em uma região do estado do Mato Grosso. **Ciência & Saúde Coletiva**. v. 17, n. 6, p. 1557-1568, 2012. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/s1413-81232012000600019>.

NAKASHIMA, C.; OTSUKA, A.; KABASHIMA, K. Recent advancement in the mechanism of basophil activation. **Journal of Dermatological Science**, v. 91, n. 1, p. 3-8, 2018. doi: 10.1016/j.jdermsci.2018.03.007.

NOVO, A. F. N. **Gestão ambiental associada ao uso de bioindicadores ambientais**. 2012. 48 p. Monografia (Especialista em Gestão Ambiental) – Universidade Candido Mendes., Rio de Janeiro. 2012. Disponível em: [http://www.avm.edu.br/docpdf/monografias\\_publicadas/K222021.pdf](http://www.avm.edu.br/docpdf/monografias_publicadas/K222021.pdf). Acesso em: 19 jul. 2021.

PATERSON, M. **Glyphosate Analysis of Risks to Endangered and Threatened Salmon and Steelhead**. 2004. Disponível em: <https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.168.5829&rep=rep1&type=pdf>. Acesso em: 19 jun. 2021.

PAVAN, F. A. *et al.* Morphological, behavioral and genotoxic effects of glyphosate and 2,4-D mixture in tadpoles of two native species of South American amphibians, **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 85, 2021. ISSN 1382-6689, doi: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2021.103637>.

PAVAN, F. A. **Influência da exposição de herbicidas em duas espécies de anfíbios anuros nativas do sul do Brasil**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) -

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Fronteira Sul, Erechim, 2021.

PERUZZO, P.J.; PORTA, A.A.; RONCO, A.E. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. **Environ. Pollut.** v. 156, p. 61–66, 2008. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.01.015>.

POMPÊO, M. *et al.* **Ecologia de reservatórios e interfaces**, São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 2015. doi: <https://doi.org/10.11606/9788585658526>

PRIEL, D. L.; KUHNS, D. B. **Assessment of Neutrophil Function**. In: RICH, R. R.; FLEISHER, T. A.; SHEARER, W. T.; SCHROEDER, H. W.; FREW, A. J. WEYAND, C. M. **Clinical Immunology: Principles and Practice**. 5 Ed. Elsevier, jan. 2019. ISBN: 978-0-7020-6896-6. doi: 10.1016/B978-0-7020-6896-6.00094-6.

QUARANTA, A. *et al.* Why amphibians are more sensitive than mammals to xenobiotics. **Plos One**, v. 4, n. 11 p. 1–4, nov. 2009. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007699>.

REHULKA, J. B.; MINARIK B. Effect of polychlorinated biphenyls (Delor 103) on haematological and enzyme parameters of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Dis Aquat Organ**. vol. 62. p 147-153. 2004.

REINIER M. M. *et al.*, Amphibians and agricultural chemicals: Review of the risks in a complex environment, **Environmental Pollution**, v. 157, n. 11, p. 2903-2927, nov. 2009. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.05.015>.

RELYEA, R.A.; JONES, D.K., The toxicity of Roundup Original Max® to 13 species of larval amphibians. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 28, n. 9, p. 2004-2008, set. 2009. doi: <https://doi.org/10.1897/09-021.1>

ROBERT, J.; OHTA, Y. Comparative and developmental study of the immune system in *Xenopus*. **Developmental Dynamics**, v. 238, n. 6, p. 1249-1270, fev. 2009. doi: <https://doi.org/10.1002/dvdy.21891>

ROBINSON, S. A., *et al.* Clothianidin alters leukocyte profiles and elevates measures of oxidative stress in tadpoles of the amphibian, *Rana pipiens*, **Environmental Pollution**, v. 284, set. 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117149>.

ROHR, J. R.; MCCOY, K. A. A Qualitative Meta-Analysis Reveals Consistent Effects of Atrazine on Freshwater Fish and Amphibians. **Environmental Health Perspectives**, v. 118, n. 1, p. 20-30, jan. 2010. doi: <https://doi.org/10.1289/ehp.0901164>

ROMANOVA, E. B.; EGORIKHINA, M. N. Changes in hematological parameters of *Rana* frogs in a transformed urban environment. **Russian Journal of Ecology**, v. 37, n. 3, p.188-192. 2006. doi: 10.1134/S1067413606030076

RUSO, G. E. *et al.*, Effects of Agricultural Stressors on Growth and an Immune Status Indicator in Wood Frog (*Lithobates sylvaticus*) Tadpoles and Metamorphs. **Environmental Toxicology and Chemistry** v. 40, n. 8, p. 2269-2281, ago. 2021. doi:10.1002/etc.5107

RUTKOSKI, C. F. *et al.* Efeito teratogênico e neurotóxico do herbicida atrazina em embriões e larvas de *Physalaemus gracilis* (anura: Leptodactylidae). **VI Jornada de Iniciação Científica e Tecnológica**, Universidade Federal da Fronteira do Sul, Chapecó. p. 1-4, 2016.

SALINAS, Z. A. *et al.* Hematological biomarkers of common toad *Bufo arenarum* in altered ecosystems in the province of Córdoba. **Acta Toxicol. Argent**, v. 23, n. 1, p. 25-35, mai. 2015.

SANTANA, E. *et al.* Morphophysiological traits of an amphibian exposed to historical industrial pollution in a Brazilian biodiversity hotspot. **Amphibia-Reptilia**. v. 42, n.3, p 283-295, 2021. doi:<https://doi.org/10.1163/15685381-bja10050>

SANTOS, E. A. *et al.* Atrazine levels in the Jaboticabal water stream (São Paulo State, Brazil) and its toxicological effects on the pacu fish *Piaractus mesopotamicus*. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**. vol. 66, n. 1, p. 73 – 82, 2015. doi: <https://doi.org/10.1515/aiht-2015-66-257>.

SILVA *et al.* Toxicidade aguda e genotoxicidade do agrotóxico comercial Folisuper 600BR a girinos de *Physalaemus cuvieri* (anura: Leiuperidae). **Pesticidas: r. ecotoxicol. e meio ambiente**, Curitiba, v.23, p.1-10, jan/dez. 2013. doi: <http://dx.doi.org/10.5380/pes.v23i0.34994>.

SILVA J.F.; FERREIRA L.R.; FERREIRA F.A. Herbicidas: absorção, translocação, metabolismo, formulação e misturas. In: SILVA, A.A.; SILVA, J.F. (Eds.). **Tópicos em manejo de plantas daninhas**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, p. 367, 2007.

SILVA, M. B. da *et al.* Leukocyte Profiles in *Odontophrynus carvalhoi* (Amphibia: Odontophrynidae) Tadpoles Exposed to Organophosphate Chlorpyrifos Pesticides. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 231, n. 372, jun. 2020. doi:10.1007/s11270-020- 04726-4

SOLOMON, K. R., *et al.* Effects of Atrazine on Fish, Amphibians, and Aquatic Reptiles: A Critical Review. **Critical Reviews In Toxicology**. v. 38, n. 9, p. 721 772, fev. 2008. doi: <http://dx.doi.org/10.1080/10408440802116496>

THRALL, M. A. *et al.*, **Veterinary Hematology and clinical Chemistry**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004.

VILA, L. G. **Hematologia de Aves: Revisão de literatura**. Disciplina Seminários do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Goiás. 2013, 46 p.

VIRIATO, C., *et al.* Evaluation of the potential teratogenic and toxic effect of the herbicide 2, 4-D (DMA® 806) in bullfrog embryos and tadpoles (*Lithobates catesbeianus*). **Chemosphere**, vol. 266, 2021, 129018.

WEDEMEYER, G.A. Effects of rearing conditions on the health and physiological quality of fish in intensive culture. In: IWAMA, G.K., PICKERING, A.D., SUMPTER, J.P. C.B. Chreck. (eds). **Fish stress and health in aquaculture**. Cambridge University Press, Cambridge, 1997, p 35–71.

WIDICK, P.; WINER, E. S. Leukocytosis and Leukemia. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, vol. 43, n. 4, p. 575-587, dez. 2016. doi: 10.1016/j.pop.2016.07.007.

WIJESINGHE, M.R., *et al.* Chlorpyrifos induced toxicity in *Duttaphrynus melanostictus* (Schneider 1799) larvae. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 60, n. 4, p.690-696, mai. 2011. doi: 10.1007/s00244-010-9577-3.



YOUNG, S., *et al.* Hematologic and plasma biochemical reference intervals for health monitoring of wild Australian tree frogs. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 41, n. 4, p. 478–492, 2012. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2012.00470.x>.

ZHELEV, Z. M.; POPGEORGIEV, G. S.; ANGELOV, M. V. Investigating the changes in the morphological content of the blood of *Pelophylax ridibundus* (Amphibia: Ranidae) as a result of anthropogenic pollution and its use as an environmental bioindicator. **Acta zool. bulg.**, vol. 65, n. 2, p. 187–196, 2013.

ZIMDAHL, R. C. **Fundamentals of weed science**. San Diego: Academic Press. 1999.556p.