



UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS ERECHIM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL

Geverton Andre Nazario Marion

**TOXICOLOGIA DE ANFÍBIOS *IN SITU*: LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO E
ESTUDO DE CASO COM GIRINOS DE *Leptodatylos luctator***

ERECHIM

2023

GEVERTON ANDRE NAZARIO MARION

**TOXICOLOGIA DE ANFÍBIOS *IN SITU*: LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO E
ESTUDO DE CASO COM GIRINOS DE *Leptodatylylus luctator***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da
Fronteira Sul-UFFS, como requisito para obtenção do título de
Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental sob a orientação da
Professora Dra Marília Teresinha Hartmann

ERECHIM

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL

CAMPUS ERECHIM

ERS 135- KM 72, n° 200

CEP: 99700-970

Caixa Postal 764

Erechim-RS

Brasil

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Marion, Geverton André Nazario
TOXICOLOGIA DE ANFÍBIOS IN SITU: LEVANTAMENTO
BIBLIOGRÁFICO E ESTUDO DE CASO COM GIRINOS DE
Leptodactylus luctator / Geverton André Nazario Marion.
-- 2023.
63 f.

Orientadora: Doutora Marília Teresinha Hartmann

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da
Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia Ambiental, Erechim, RS, 2023.

1. Estudos in situ. 2. Ecotoxicologia em anfíbios. 3.
Anormalidades Nucleares nos Eritrócitos. 4. Micronúcleo.
I. Hartmann, Marília Teresinha, orient. II. Universidade
Federal da Fronteira Sul. III. Título.

GEVERTON ANDRE NAZARIO MARION

TOXICOLOGIA DE ANFÍBIOS *IN SITU*: LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO E
ESTUDO DE CASO COM GIRINOS DE *Leptodatylos luctator*

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da
Fronteira Sul, *campus* Erechim, como requisito para obtenção
do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental.
Orientadora: Prof^a. Dr^a Marília Teresinha Hartmann

Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em: 30/01/2023 .

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Marília Teresinha Hartmann – UFFS
Orientadora

Prof.^a Dr.^a. Caroline Müller-UFFS
Avaliadora

Prof. Dr. Bruno Madalozzo – SENAI/SC
Avaliador

RESUMO

Os anfíbios possuem um papel fundamental no funcionamento dos ecossistemas, principalmente no ciclo de nutrientes, fluxo de energia e controle de pragas. Esse grupo apresenta um declínio populacional massivo, com aproximadamente 41% de todas as espécies em risco, destacando a poluição por uso de agrotóxicos como uma das principais ameaças à perda da biodiversidade anura. Isso ocorre uma vez que os anfíbios possuem epiderme com alta permeabilidade e modo de vida bifásico, onde utilizam tanto o ambiente aquático quando o terrestre, permitindo a exposição e tornando-os suscetíveis aos agentes químicos liberados no ambiente. Os anfíbios representam um grupo considerado modelo nos estudos ecotoxicológicos. No entanto, devido ao maior controle das condições experimentais, a grande maioria dos estudos são realizados em laboratório, mantendo assim uma lacuna no conhecimento sobre os efeitos dos agrotóxicos em anfíbios nos ambientes naturais. Em condições naturais, onde as variáveis ambientais não são controladas, as experimentações devem relacionar toda a dinâmica de interação das substâncias existentes no ambiente, as variáveis ambientais e as influências que elas causam nos organismos. Para avaliar os estudos já realizados em condições naturais, realizou-se um levantamento bibliográfico através de consultas às bases de dados da Web of Science e SCOPUS considerando artigos publicados nos últimos vinte anos, utilizando nas buscas os termos 'field experimentation' ou 'in situ study', associados a 'tadpole' e 'agrochemical' ou 'pesticide', utilizando uma metodologia descritiva. Foram encontrados 21 resumos, dos quais as metodologias foram conferidas para garantir apenas a análise de estudos conduzidos a campo. Assim, dez trabalhos foram selecionados para a construção da revisão. Os trabalhos relacionados ao tema utilizaram espécies de anfíbios nativas, consideradas generalistas, presentes na região do estudo e foram executados em ambientes destinados ao cultivo agrícola com grupos controle em locais preservados. Nesses trabalhos, diferentes metodologias foram utilizadas, como a pulverização intencional de corpos d'água, quantificação de agrotóxicos nos locais de estudo e a verificação das alterações causadas pelo ambiente sobre os girinos. As principais avaliações foram baseadas na sobrevivência e alterações morfológicas dos girinos e, em alguns casos, em ensaios citológicos e bioquímicos. No segundo capítulo, foi realizado um experimento *in situ* com o objetivo de comparar a sensibilidade dos girinos *Leptodactylus luctator* em ambientes lênticos no entorno e no interior da unidade de conservação Parque Estadual do Turvo (PET). Foram avaliados dez ambientes lênticos, sendo cinco no interior e cinco no entorno do PET com a realização da

análise de agrotóxicos e parâmetros físico/químicos das lagoas. Para o estudo dos girinos, foi coletada uma desova, levada para laboratório até atingirem o estágio 25 na tabela Gosner e, posteriormente, realocados nos 10 ambientes amostrais, com 15 girinos em cada ambiente, em triplicata. Cada grupo de girinos foi colocado em uma lagoa, isolados dentro de uma armadilha permitindo a troca de fluídos com o ambiente, porém protegidos de predadores. Após 14 dias, os indivíduos foram retirados, contabilizados e levados para laboratório para determinação do comprimento, massa, e posterior verificação de micronúcleos e alterações nucleares nos eritrócitos (ANEs). Após as análises das lâminas com contagem das células, observou-se, nos dois ambientes, a presença de micronúcleos e ANEs nos indivíduos, principalmente apresentando células binucleadas, anucleadas, núcleo entalhado, núcleo lobado, broto, cariólise e apoptose. Em relação aos agrotóxicos, foi verificada a presença de resíduos de clomazona e clorpirifós no interior, e de atrazina no entorno do PET. Além disso, azoxistrobina ($0,022 \mu\text{g L}^{-1}$) e imidacloprido ($0,028 \mu\text{g L}^{-1}$) foram quantificados na área do entorno do parque. Mais estudos são necessários para verificar os possíveis efeitos nocivos dos agrotóxicos sobre *Leptodactylus luctator* e mesmo em outras espécies presentes na região, assim como em outros períodos do ano.

Palavras-chave: Anura, girinos, agrotóxicos, experimentos de campo.

ABSTRACT

Amphibians play a fundamental role in the functioning of ecosystems, especially in nutrient cycling, energy flow, and pest control. This group shows a massive population decline, with approximately 41% of all species at risk, highlighting pollution from pesticide use as one of the main threats to the loss of anura biodiversity. This is because amphibians have a highly permeable epidermis and a biphasic way of life, where they use both the aquatic and terrestrial environments, allowing exposure and making them susceptible to the chemical agents released into the environment. Amphibians are a group considered a model in ecotoxicological studies. However, due to the greater control of experimental conditions, the vast majority of studies are conducted in the laboratory, thus maintaining a gap in knowledge about the effects of pesticides on amphibians in natural environments. Under natural conditions, where environmental variables are not controlled, experiments must relate all the dynamics of interaction of the substances in the environment, the environmental variables, and the influences they cause on the organisms. To evaluate the studies already carried out under natural conditions, a bibliographical survey was carried out by consulting the Web of Science and SCOPUS databases, considering articles published in the last twenty years, using the terms 'field experimentation' or 'in situ study', associated with 'tadpole' and 'agrochemical' or 'pesticide', using a descriptive methodology. Twenty-one abstracts were found, where they were evaluated and methodologies checked to ensure only the analysis of experiments conducted in the field. Thus, ten papers were selected for the construction of the review. The works related to the theme used native amphibian species, considered generalists, present in the study region and were executed in environments destined to agricultural cultivation with control groups in preserved locations. In these works, different methodologies were used, such as intentional spraying of water bodies, quantification of pesticides in the study sites, and checking the changes caused by the environment on the tadpoles. The main evaluations were based on tadpole survival and morphological changes, and in some cases cytological and biochemical assays. In the second chapter, an insitu test was performed to compare the sensitivity of *Leptodactylus luctator* tadpoles in lentic environments around and inside the Turvo State Park (PET) conservation unit. Ten lentic environments were evaluated, five inside and five around the PET, analyzing pesticides and physical/chemical parameters of the ponds. To study the

tadpoles, one spawning was collected, taken to the laboratory until they reached stage 25 on the Gosner table, and then relocated to the 10 sample environments, with 15 tadpoles in each environment, in triplicate. Each group of tadpoles was placed in a pond, isolated within a trap allowing fluid exchange with the environment, but protected from predators. After 14 days, removed, counted, and taken to the laboratory for determination of length, mass, and subsequent verification of micronuclei and nuclear changes in erythrocytes (ANEs). After the analyses of the slides with cell counts, it was observed in both environments the presence of micronuclei and ANEs in the individuals, mainly showing binucleated, anucleated, notched nucleus, lobed nucleus, nuclear buds, karyolysis, and apoptosis cells. Regarding pesticides, residues of clomazone and chlorpyrifos were found inside the PET, and atrazine was found in the surrounding area. In addition, azoxystrobin ($0.022 \mu\text{g L}^{-1}$) and imidacloprid ($0.028 \mu\text{g L}^{-1}$) were quantified in the area surrounding the park. More studies are needed to verify the possible harmful effects of pesticides on *Leptodactylus luctator* and even on other species present in the region, as well as at other times of the year.

Keywords: Anura, tadpoles, agrochemicals, field experiments.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Mapa do Parque Estadual do Turvo mostrando os ambientes selecionados para os estudos do interior e do entorno..... | 40 |
| Figura 2 – Desova de <i>Leptodactylus luctator</i> utilizada para os experimentos..... | 40 |
| Figura 3 – Girinos de <i>Leptodactylus luctator</i> com anormalidades nucleares nos eritrócitos..... | 46 |
| Figura 4 – Micronúcleo e ANEs registrados em girinos de <i>Leptodactylus luctator</i> no Parque Estadual do Turvo, Derrubadas, RS..... | 47 |

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Resumo dos trabalhos apresentados nesta pesquisa, resumindo as espécies estudadas, a localidade do estudo, quais agrotóxicos encontrados e os efeitos identificados pelas respectivas pesquisas..... | 20 |
|---|----|

Capítulo II

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Parâmetros físico-químicos da água das lagoas do interior e entorno do Parque Estadual do Turvo, Derrubadas, RS..... | 43 |
|---|----|

| | |
|--|----|
| Tabela 2 – Sobrevivência, Comprimento total, massa dos girinos de <i>Leptodactylus luctator</i> analisados nos ambientes Interior e Entorno, no Parque Estadual do Turvo, Rio Grande do Sul, Brasil..... | 44 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| Tabela 3 – Anormalidades nucleares nos eritrócitos (ANEs) e Micronúcleo encontradas nos girinos de <i>Leptodactylus luctator</i> nas lagoas do Interior e Entorno no Parque Estadual do Turvo, Derrubadas, RS..... | 45 |
|--|----|

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------|---|
| ANEs | Anormalidades Nucleares nos Eritrócitos |
| MN | Micronúcleo |
| PET | Parque Estadual do Turvo |
| UC | Unidade de Conservação |
| % | Por mil |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| APRESENTAÇÃO | 14 |
| CAPÍTULO I: TRABALHOS <i>in situ</i> SOBRE ECOTOXICOLOGIA EM ANFÍBIOS: SITUAÇÃO ATUAL DA ARTE | 15 |
| 1 Introdução | 17 |
| 2 Materiais e Métodos | 19 |
| 3 Resultados e Discussões | 19 |
| 4 Considerações finais | 27 |
| Referências | 28 |
| CAPÍTULO II: SENSIBILIDADE DE GIRINOS DE <i>Leptodactylus luctator</i> (Hudson, 1892) EM UM EXPERIMENTO IN SITU: ESTUDO NO PARQUE ESTADUAL DO TURVO, SUL DO BRASIL | 34 |
| 1 Introdução | 36 |
| 2 Objetivos | 38 |
| 2.1 Objetivo geral..... | 38 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 38 |
| 3 Materiais e Métodos | 38 |
| 3.1 Área de estudo..... | 38 |
| 3.2 Parâmetros físico-químicos da água..... | 39 |
| 3.3 Organismo-teste..... | 39 |
| 3.4 Procedimento experimental..... | 41 |
| 3.5 Determinação de agrotóxicos nos corpos d'água..... | 41 |
| 3.6 Avaliações no comprimento e massa..... | 41 |
| 3.7 Anormalidades nucleares nos eritrócitos..... | 42 |
| 3.8 Análises estatísticas..... | 43 |
| 4 Resultados | 43 |
| 4.1 Parâmetros físico-químicos da água..... | 43 |
| 4.2 Análise de resíduos de agrotóxicos..... | 44 |
| 4.3 Sobrevivência e tamanho do corpo..... | 44 |

| | |
|---|-----------|
| 4.4 Anormalidades nucleares nos eritrócitos (ANEs)..... | 44 |
| 5 Discussão..... | 48 |
| 6 Considerações finais..... | 51 |
| Referências..... | 52 |
| | |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 59 |
| | |
| PERSPECTIVAS FUTURAS..... | 60 |
| | |
| ANEXO I..... | 61 |

APRESENTAÇÃO

Essa dissertação é composta por dois capítulos: o primeiro intitulado “Trabalhos *in situ* sobre ecotoxicologia em anfíbios: Situação atual da arte” e o segundo “Sensibilidade de girinos de *Leptodactylus luctator* (Hudson, 1892) em um experimento *in situ*: estudo no Parque Estadual do Turvo, sul do Brasil”. Os estudos foram desenvolvidos no âmbito do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental (PPGCTA), nível de mestrado, da Universidade Federal da Fronteira Sul, campus Erechim. O PPGCTA faz parte da área 49 da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Ciências Ambientais (CiAmb), que tem por objetivo produzir e discutir conhecimentos de forma interdisciplinar. Esta dissertação está vinculada ao Laboratório de Ecologia e Conservação e ao Grupo de Pesquisa Biodiversidade e Conservação da Fauna – GPCON. Os projetos desenvolvidos devem proporcionar o acúmulo de dados para avaliação e análise das relações resultantes da interface entre ambiente e desenvolvimento. Os estudos englobam teses, dissertações, trabalhos de conclusão de curso e de iniciação científica.

Nesta dissertação, no primeiro capítulo partimos da premissa de investigar, através de uma revisão bibliográfica, artigos de pesquisa que avaliaram o impacto dos agrotóxicos sobre a biologia de anuros em fase larval com base em estudos de experimentação *in situ* nos últimos vinte anos. Após análise dos dados, encontramos 10 artigos que apontavam esse objetivo na seção “material e métodos”. No segundo capítulo, a partir de um experimento *in situ* avaliamos a sensibilidade de girinos de *Leptodactylus luctator* (HUDSON, 1892) em lagoas dentro de ambientes do interior (florestado) e no entorno (não florestado) do Parque Estadual do Turvo (PET), utilizando como parâmetros a sobrevivência, tamanho do corpo e avaliação das alterações nucleares nos eritrócitos (ANEs). A presença de micronúcleo (MN) e de diferentes ANEs foram verificados nos girinos criados tanto das lagoas do interior quanto das do entorno do PET, embora as diferenças não tenham sido significativas quando os dois ambientes foram comparados. Foi verificado resíduos de agrotóxicos em ambos os ambientes, com detecção de azoxistrobina ($0,022 \mu\text{g L}^{-1}$) e imidacloprido ($0,028 \mu\text{g L}^{-1}$) no entorno do PET. É possível afirmar que mais estudos *in situ* são necessários para afirmar o real potencial genotóxico de ambientes naturais nas espécies nativas de anfíbios anuros.

CAPÍTULO I

TRABALHOS *in situ* SOBRE ECOTOXICOLOGIA EM ANFÍBIOS: SITUAÇÃO ATUAL DA ARTE

Artigo aceito para publicação na revista Scientific Electronic Archives

RESUMO

Os anfíbios possuem um papel fundamental no funcionamento dos ecossistemas, principalmente no ciclo de nutrientes, fluxo de energia e controle de pragas. Esse grupo apresenta um declínio populacional massivo, com aproximadamente 41% de todas as espécies em risco, destacando a poluição por uso de agrotóxicos como uma das principais ameaças à perda da biodiversidade anura. Isso ocorre uma vez que os anfíbios possuem epiderme com alta permeabilidade e modo de vida bifásico, onde utilizam tanto o ambiente aquático quando o terrestre, permitindo a exposição e tornando-os suscetíveis aos agentes químicos liberados no ambiente. Isso faz com que os anfíbios sejam um grupo considerado modelo nos estudos ecotoxicológicos. No entanto, devido ao maior controle das condições experimentais, a grande maioria dos estudos são realizados em laboratório, mantendo assim uma lacuna no conhecimento sobre os efeitos dos agrotóxicos em anfíbios nos ambientes naturais. Em condições naturais, onde as variáveis ambientais não são controladas, as experimentações devem relacionar toda a dinâmica de interação das substâncias existentes no ambiente, as variáveis ambientais e as influências que elas causam nos organismos. Para avaliar os estudos já realizados em condições naturais, realizou-se um levantamento bibliográfico através de consultas às bases de dados da Web of Science e SCOPUS considerando artigos publicados nos últimos vinte anos, utilizando nas buscas, os termos ‘field experimentation’ ou ‘in situ study’, associado a ‘tadpole’ e ‘agrochemical’ ou ‘pesticide’, utilizando uma metodologia descritiva. Foram encontrados 21 resumos, onde foram avaliados e as metodologias conferidas para garantir apenas a análise de experimentos conduzidos a campo. Assim, dez trabalhos foram selecionados para a construção da revisão. Os trabalhos relacionados ao tema utilizaram espécies de anfíbios nativas, consideradas generalistas, presentes na região do estudo e foram executados em ambientes destinados à cultivo agrícola com grupos controle em locais preservados. Nesses trabalhos, diferentes metodologias foram utilizadas, como a pulverização intencional de corpos d’água, quantificação de agrotóxicos nos locais de estudo e a verificação das alterações causadas pelo ambiente sobre os girinos. As principais avaliações foram baseadas na sobrevivência e alterações morfológicas dos girinos e, em alguns casos, em ensaios citológicos e bioquímicos.

Palavras-chave: Anura; girinos, agrotóxicos; experimentos de campo.

ABSTRACT

Amphibians play a key role in the functioning of ecosystems, especially in nutrient cycles, energy flow, and pest control. This group is experiencing massive population decline, with approximately 41% of all species at risk. Environmental pollution resulting from the use of pesticides is considered a direct threat to the loss of Anura biodiversity since they are susceptible to chemical agents released into the environment due to the high permeability of their epidermis and biphasic way of life that requires both aquatic and terrestrial habitats for breeding and feeding. Due to the wide variety of responses of amphibians to environmental stressors, the group is used for ecotoxicological studies as they interact with both aquatic and terrestrial ecosystems. As most of the studies are conducted in the laboratory, there is a gap in the knowledge regarding the effects of pesticides on the native fauna (amphibians) and, under these conditions where the environmental variables are not controlled, the experiments have to relate all the dynamics of interaction of the existing substances in the environment, the environmental variables, and the influences they cause on the organisms. The bibliographical survey was carried out by consulting Web of Science and SCOPUS databases considering articles published in 20 years on the subject 'field experiment', 'tadpole', and 'agrochemical', for which a descriptive methodology was used. We used search strategies considering the expressions: 'field experimentation' or 'in situ study', associated with 'tadpole' and 'agrochemical' or 'pesticide'. We found 1,398 publications where, after applying the exclusion criteria, 21 abstracts of articles were read and many of these had the "Materials and Methods" section consulted for more details about the manuscript. From these, 10 articles were selected for the construction of the review. The works related to the theme use native species, considered generalists, present in the region of the study and are executed in environments destined for general cultivation with control groups in preserved locations. Various methodologies are used, such as intentional spraying of water bodies for the field experiment, checking the range of pesticides at the study site, and checking the changes caused by the environment on the tadpoles are mostly based on survival and morphological changes in the tadpoles, and in some cases on cytological and biochemical assays.

Keywords: Anura; tadpoles; pesticides; field experiments.

1 INTRODUÇÃO

A lei brasileira, através da resolução 001 do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) de 1986, define impacto ambiental como “qualquer alteração das propriedades físicas, químicas e biológicas do meio ambiente causada por qualquer forma de matéria ou energia resultante das atividades humanas que, direta ou indiretamente afetam a saúde, a segurança e o bem-estar da população, as atividades sociais e econômicas, a biota, as condições estéticas e sanitárias do meio ambiente e a qualidade dos recursos ambientais”. A presença de diferentes tipos de produtos químicos nos corpos d’água ocorre principalmente como resultado da industrialização (ROJAS-HUCKS et al., 2019) e da agricultura (GUIDA et al., 2018; ARAUJO et al., 2019). No entanto, atualmente, um dos principais impactos ambientais é oriundo do uso de agrotóxicos utilizados em ambientes agrícolas. Os agrotóxicos são amplamente descritos por causarem efeitos ambientais negativos, tais como declínios populacionais de espécies não alvo, como organismos aquáticos, sendo considerados uma ameaça direta à perda da biodiversidade dos anfíbios (ATTADEMO et al., 2014; POLLARD et al., 2016; IUCN, 2022)

Em paisagens rurais, os agrotóxicos têm causado alerta por apresentarem um alto risco para as comunidades de anfíbios (AGOSTINI et al., 2020)). Um dos motivos da grande susceptibilidade do grupo de anfíbios aos agrotóxicos liberados no ambiente ocorre devido ao seu modo de vida bifásico, que requer habitats aquáticos e terrestres para reprodução e alimentação (HADDAD et al., 2013; GLINSKI et al., 2018; GONÇALVES et al., 2019). Por utilizarem o ambiente aquático, os anfíbios possuem alta permeabilidade da epiderme (NYSTRÖM et al., 2007; LLEWELYN et al., 2019), o que os torna mais expostos à contaminantes presentes nos recursos hídricos.

Diversos estudos tem demonstrado alterações morfológicas, bioquímicas e comportamentais (RUTKOSKI et al., 2020), efeitos mutagênicos nas células eritrocitárias (GONÇALVES et al., 2015; PAVAN et al., 2021), alterações no desenvolvimento embrionário, atrasando ou inibindo sua metamorfose (LANCTÔT et al., 2014; BONFANTI et al., 2018), redução do sucesso reprodutivo (HEREK et al., 2020), dentre outros, em organismos suscetíveis aos agrotóxicos, o que pode comprometer a população de anfíbios. Em uma abordagem ampla, devido à grande variedade de respostas a agentes estressores ambientais, muitas espécies do grupo anura são consideradas como bioindicadoras e são frequentemente utilizadas como modelos para estudos ecotoxicológicos (GONÇALVES et al., 2019).

De uma maneira geral, a maioria dos ensaios ecotoxicológicos são realizados em condições controladas, com a análise de compostos como agrotóxicos isolados. Como a grande maioria dos estudos ocorre em laboratório, há uma lacuna no conhecimento no que se refere aos efeitos que os agroquímicos causam nos anuros em ambientes naturais (*in situ*). Isso limita o conhecimento sobre os reais efeitos dos produtos químicos no ambiente, uma vez que os organismos são expostos a misturas complexas de agrotóxicos que, ainda, podem ter efeitos exacerbados por outras características ambientais (MATSON et al., 2009). Assim, torna-se importante ampliar as experimentações realizadas nos ambientes naturais dos organismos não-alvo, considerando toda a dinâmica de interação das substâncias existentes no ambiente, as variáveis ambientais e as influências que elas causam no organismo (AGOSTINI et al., 2020). Apesar da experimentação *in situ*, utilizando girinos como organismo modelo, vem sendo usada para traçar um panorama ecotoxicológico em ambientes contaminados. Porém, ainda são poucos os estudos realizados com anfíbios após exposição à agrotóxicos quando comparado a outros grupos taxonômicos (ILHA; SCHIESARI, 2014; ORTIZ-SANTALIESTRA et al., 2018).

Diferentemente das condições controladas de um laboratório, onde a grande maioria dos estudos utiliza a formulação comercial individual de agrotóxicos na avaliação da toxicidade, nas amostragens *in situ*, parte-se da premissa de utilizar lagoas expostas a agrotóxicos e lagoas não expostas ou com a mínima exposição possível, sendo essas últimas, consideradas lagoas de referência (AGOSTINI et al., 2020).

Para a avaliação dos efeitos dos agrotóxicos sobre a anurofauna *in situ*, vários métodos são adotados. Um desses métodos foi executado por Agostini et al. (2020), os quais estudaram 91 pontos, em três áreas diferentes, sendo desse total 71 adjacentes a ambientes agrícolas e 20 lagoas sem parcelas agrícolas próximas. Isso permitiu ter um ambiente como referência (local preservado) a fim de possibilitar a comparação das amostragens. Para comparar esses dois locais, foram colocados 5 recintos por ambiente com 20 girinos (estágio Gosner 29 a 42) por um período de tempo de 7 dias. Após esses 7 dias houve a aplicação programada de agrotóxicos, e após essa aplicação foram realizadas coletas em 24 horas (primeira avaliação) e 48 horas (segunda avaliação). Os autores verificaram que a sobrevivência reduziu em lagoas com detecção de agrotóxicos.

Outro método consiste no enclausuramento de girinos *in situ*. Agostini et al. (2020) verificaram que o uso deste método, com girinos enclausurados obtidos das mesmas lagoas onde ocorreu o enclausuramento demonstrando-se ser eficaz para trabalhos *in situ*, pois facilita a metodologia de trabalho. Esses trabalhos demonstram a importância de se ampliar as

metodologias de estudos, de forma a considerar a real relevância ecológica a partir da real situação dos ambientes naturais. As experimentações *in situ*, utilizando como modelo os girinos dos anuros, vem sendo usada para traçar um panorama ecotoxicológico em ambientes contaminados. Essa metodologia considera toda a dinâmica de interação das substâncias existentes no ambiente, como misturas complexas de agrotóxicos, das variáveis ambientais e das influências que elas causam no organismo (MATSON et al., 2009; AGOSTINI et al., 2020).

Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar, através de uma ampla revisão metodológica, trabalhos de pesquisa que avaliaram o impacto dos agrotóxicos sobre a biologia de anuros em fase larval com base em estudos de experimentação *in situ* nos últimos vinte anos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O levantamento bibliográfico foi realizado através de consultas a bases de dados da Web of Science e SCOPUS. Foram consideradas as produções científicas publicadas a partir de estudos realizados nos últimos 20 (vinte) anos sobre o tema ‘experimento de campo’, ‘girino’ e ‘agrotóxico’, para o qual se utilizou uma metodologia descritiva. Para nortear a revisão bibliográfica foi adotada a questão ‘qual a resposta dos anuros em fase larval expostos à agrotóxicos em ambiente natural através da execução de experimentos de campo?’ A definição de estratégia de busca considerou as seguintes expressões: ‘*field experimentation*’ ou ‘*in situ study*’, associado a ‘*tadpole*’ e ‘*agrochemical*’ ou ‘*pesticide*’. Os critérios de inclusão de estudos foram: (a) executados em campo; (b) estudos realizados no período de 2000 a 2021; (c) publicação em periódico científico; (d) artigos nos idiomas português, espanhol e inglês.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O presente estudo visou revisar trabalhos realizados a campo, com foco nas respostas de anfíbios *in situ* à exposição por agrotóxicos. Considerando as palavras-chave utilizadas, foram encontradas 1.398 publicações nas bases de dados Web of Science e SCOPUS entre os anos de 2000 e 2021. Após a aplicação de critérios de exclusão, 21 artigos foram lidos detalhadamente, considerando principalmente as questões metodológicas utilizadas e, desses, 10 artigos foram selecionados para a construção deste manuscrito, sendo 20% da Web of Science e 80% da SCOPUS (80%), os quais encontram-se resumidos na Tabela 1.

Tabela 1 – Resumo dos trabalhos apresentados nesta pesquisa, resumindo as espécies estudadas, a localidade do estudo, quais agrotóxicos encontrados e os efeitos identificados pelas respectivas pesquisas

| País | Ambiente | Espécie | Agrotóxicos no ambiente de estudo | Metodologias de medição nos girinos | Citação |
|----------------|----------------------------|--|---|---|-------------------------------|
| Argentina | Soja | <i>Boana pulchella</i> ; <i>Leptodactylus latrans</i> [<i>L. luctator</i>]; <i>Rhinella arenarum</i> ; <i>Rhinella fernandezae</i> | cipermetrina + glifosato; cipermetrina + glifosato + endosulfan; clorpirifós + glifosato; Endosulfan; glifosato + 2,4-D; Glifosato | Sobrevivência; mobilidade | AGOSTINI et al., 2020 |
| Argentina | Arroz | <i>Leptodactylus mystacinus</i> ; <i>Scinax squalirostris</i> | Não especificado | Sobrevivência; desenvolvimento; colinesterase; GST; morfologia celular | ATTADEMO et al., 2014 |
| Argentina | Pomares | <i>Rhinella arenarum</i> | Não especificado | carboxilesterase; GST; GSH | ROSENBAUM et al., 2012 |
| Australia | Uso industrial | <i>Litoria aurea</i> | Não especificado | Sobrevivência | POLLARD et al., 2016 |
| Canadá | Milho; Soja; Sorgo | <i>Lithobates pipiens</i> | Acetamiprid; clotianidina; tiامتoxam; imidacloprido; tiaclopride; dinotefuran; Glifosato; Atrazina | Sobre vivência; Desenvolvimento; Eclosão | DYCK et al., 2021 |
| Canadá | - | <i>Lithobates clamitans</i> ; <i>Rana sylvatica</i> [<i>Lithobates sylvaticus</i>] | Glifosato | Sobrevivência; desenvolvimento | EDGE et al., 2014 |
| Canadá | Pulverização de agrotóxico | <i>Rana clamitans</i> ; <i>Rana pipiens</i> | Glifosato | Sobrevivência | THOMPSON et al., 2004 |
| Canadá | Pulverização de agrotóxico | <i>Rana</i> [<i>Lithobates</i>] <i>clamitans</i> ; <i>Rana</i> [<i>Lithobates</i>] <i>pipiens</i> | éster triclopir-2-butoxielílico | Sobrevivência; desenvolvimento; mobilidade | WOJTASZEK et al., 2005 |
| Estados Unidos | Campos agrícolas | <i>Pseudacris regilla</i> | Trans-nonacloro; a-endosulfan; Clordano; y-Endosulfan; Endosulfan; Sulfato; Clorpirifós; Endosulfan; Malation; Trifluralin; Clorotalonil | Sobrevivência; malformações; desenvolvimento; colinesterase; citometria | SPARLING et al., 2014 |
| Inglaterra | Campos agrícolas | <i>Bufo bufo</i> | Não especificado | Sobrevivência | ORTON & ROUTLEDGE, 2011 |

Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

Tendo em vista que as experimentações *in situ* focam nas condições naturais do ambiente, os trabalhos avaliaram principalmente espécies nativas, consideradas generalistas e presentes nas respectivas regiões de estudo. Dentre as espécies estudadas, destacam-se *Rana* [*Lithobates*] *clamitans* (WOJTASZEK et al., 2005; THOMPSON et al., 2004; EDGE et al., 2014), *Rana* [*Lithobates*] *pipiens* (WOJTASZEK et al., 2005; THOMPSON et al., 2004; DYCK et al., 2021), *Rana* [*Lithobates*] *clamitans* e *Rana sylvatica* [*Lithobates sylvaticus*] (EDGE et al., 2014) nativas no Canada, *Boana pulchella*, *Leptodactylus* [*latrans*] *luctator*, *Rhinella fernandezae* (AGOSTINI et al., 2020), *R. arenarum* (AGOSTINI et al., 2020; ROSENBAUM et al., 2012), *L. mystacinus* e *Scinax squalirostris* (ATTADEMO et al., 2014) na Argentina,

Pseudacris regilla nos Estados Unidos (SPARLING et al., 2014), *Bufo bufo* na Inglaterra (ORTO; ROUTLEDGE, 2001) e *Litoria aurea* nativa na Austrália (POLLARD et al., 2016).

Os ambientes utilizados para os experimentos *in situ* envolveram ambientes destinados ao cultivo agrícola geral (ORTO; ROUTLEDGE, 2011; SPARLING et al., 2014), pomares (ROSENBAUM et al., 2012), cultivo de arroz (ATTADEMO et al., 2014), soja (AGOSTINI et al., 2020; DYCK et al., 2021), milho e sorgo (DYCK et al., 2021), além de áreas de uso industrial (POLLARD et al., 2016) e corpos d'água com pulverização controlada de agrotóxicos (THOMPSON et al., 2004; WOJTASZEK et al., 2005; EDGE et al., 2014).

Dentre as principais metodologias utilizadas para avaliar os efeitos dos agrotóxicos presentes no meio ambiente destaca-se a sobrevivência e o crescimento dos girinos (THOMPSON et al., 2004; WOJTASZEK et al., 2005; ORTO; ROUTLEDGE, 2011; EDGE et al., 2014; ATTADEMO et al., 2014; SPARLING et al., 2014; POLLARD et al., 2016; AGOSTINI et al., 2020; DYCK et al., 2021). Além dessas análises, também foram avaliados o sucesso de eclosão (DYCK et al., 2021), alterações na mobilidade (WOJTASZEK et al., 2005; AGOSTINI et al., 2020), presença de malformações (THOMPSON et al., 2004), Citometria (THOMPSON et al., 2004), morfologia celular (ATTADEMO et al., 2014) e marcadores bioquímicos como a atividade da carboxilase (ROSENBAUM et al., 2012), da colinesterase (ATTADEMO et al., 2014; THOMPSON et al., 2004), da glutatona (ROSENBAUM et al., 2012), e da glutatona-S-transferase (ROSENBAUM et al., 2012; ATTADEMO et al., 2014).

Todos os trabalhos discutiram a presença de agrotóxicos nos ambientes em estudo. Quatro desses, apesar de não terem quantificado os níveis de agrotóxico presentes no ambiente, consideraram o histórico da área e possível presença de agrotóxicos decorrente da aplicação em campo agrícola ou arrozais (ORTON; ROUTLEDGE, 2011; ATTADEMO et al., 2014), em pomares (ROSENBAUM, 2012), e de ambientes de uso industrial (POLLARD, 2016). Outros três trabalhos avaliaram os efeitos da exposição pela aplicação direcionada dos agrotóxicos triclopir-2-butoxietil ester (WOJTASZEK et al., 2005) e glifosato (THOMPSON et al., 2004; EDGE et al., 2014), nos ambientes naturais. Os demais estudos relacionaram os efeitos na sobrevivência, morfologia e metabolismo de girinos expostos a misturas de agrotóxicos presentes nos corpos d'água adjacentes às áreas de estudo, como cultivos agrícolas em geral (SPARLING et al., 2014), lavouras de soja (AGOSTINI et al., 2020) e campos de milho, soja e sorgo (DYCK et al., 2021). Dentre os principais agrotóxicos determinados nesses ambientes, com maiores efeitos sobre os girinos destaca-se clordanos, endosulfan, clorpirifós, malation, trifluralina e clorotalonil (SPARLING et al., 2014), cipermetrina+glifosato (AGOSTINI et al., 2020); neonicotinoides totais, atrazina e glifosato (DYCK et al., 2021).

Ao investigar os efeitos do herbicida triclopir-2-butoxietil ester na mortalidade, resposta de evasão e crescimento de girinos, Wojtaszek et al. (2005) utilizaram recintos *in situ* em duas áreas úmidas de floresta e realizou a aplicação do herbicida no ambiente. Os locais foram selecionados para comparar terras úmidas, porém com diferentes profundidades, presença de macrófitas, pH e sedimentos suspensos. Os autores utilizaram 24 recintos no ambiente. Girinos de duas espécies nativas (*Rana [Lithobates] clamitans* e *Rana [Lithobates] pipiens*) foram estudadas e demonstraram que a mortalidade cumulativa foi maior em concentrações de tratamento mais altas, com total mortalidade nas primeiras 96h após a aplicação do herbicida. A interação do herbicida com fatores bióticos e abióticos é apontado como o propulsor dos efeitos biológicos no desenvolvimento, mobilidade e sobrevivência dos girinos (WOJTASZEK et al., 2005). O pH elevado tem sido descrito por aumentar o efeito tóxico de agrotóxicos (CHEN; HATHAWAY; FOLT, 2004) e características físicas, químicas e biológicas da água podem afetar a persistência desses produtos no meio (WOJTASZEK et al., 2005). O inseticida cipermetrina, por exemplo, em pH neutro e ácido, permanece estável; porém, tende a aumentar a sua hidrólise quando em pH alcalino (LASKOWSKI, 2002). Alguns valores de pH mais elevados (7,5) aumentam os efeitos tóxicos dos herbicidas em táxons aquáticos (CHEN; HATHAWAY; FOLT, 2004). Por outro lado, a diminuição do pH pode resultar em atraso na taxa de crescimento e desenvolvimento de girinos, o que pode afetar o tamanho corpóreo dos indivíduos e a menor aptidão (BEATTIE; TYLER-JONES, 1992).

Quantificando a probabilidade e a magnitude da contaminação por glifosato, Thompson et al. (2004) monitoraram 51 áreas úmidas utilizando as espécies *Rana [Lithobates] pipiens* e *Rana [Lithobates] clamitans*. As áreas foram classificadas como pulverizadas em excesso, adjacentes ou tamponadas em relação aos blocos de pulverização. A amostragem físico-química dessas áreas foi realizada pela análise de água 48 horas após a aplicação do herbicida. A vegetação das áreas tamponadas limitou a exposição ao herbicida, apresentando uma concentração dez vezes menor em relação às áreas pulverizadas em excesso. Os fatores relacionados aos locais de amostragem, como interceptação diferencial pela vegetação circundante, grau de oclusão da superfície da água por macrófitas aquáticas, bem como a superfície total e o volume da zona úmida são importantes para a atenuação do alcance e efeitos dos agrotóxicos aplicados (THOMPSON et al., 2004). Já Edge et al. (2014) replicaram, por dois anos, um experimento no Canadá utilizando seis áreas úmidas, onde 24 pequenos pântanos foram divididos com uma barreira impermeável. Os autores testaram a exposição ao glifosato, aplicado de forma isolada e em combinação com o enriquecimento de nutrientes na sobrevivência e desenvolvimento de anfíbios. Foram utilizadas doses contrastantes de glifosato,

sendo alta concentração (2880 µg a.e./L) e baixa concentração (210 µg a.e./L). Em paralelo, uma porção das zonas úmidas foram mantidas como controle, sem a aplicação dos tratamentos. Como espécie modelo, os autores utilizaram girinos de *Rana sylvatica* [*Lithobates sylvaticus*] e *Rana* [*Lithobates*] *clamitans*. Segundo os autores, o enriquecimento de nutrientes associado à aplicação do glifosato minimizou os efeitos negativos do glifosato na abundância de girinos, tornando o glifosato pouco tóxico aos girinos. Apesar dos resultados não indicarem os efeitos tóxicos esperados do glifosato nos girinos no estudo de campo, provavelmente devido a curta duração e mitigação da toxicidade por variáveis ambientais (EDGE et al., 2012), efeitos positivos pelo herbicida na abundância de girinos de *Rana* [*Lithobates*] *clamitans* (EDGE et al., 2014) torna-se preocupante uma vez que essa espécie é capaz de remover completamente outras espécies de áreas úmidas através da predação de massas de ovos (EDGE et al., 2014). Por outro lado, formulações de glifosato são amplamente estudadas em condições de laboratório e indicadas como tóxicas para anfíbios, principalmente em estágio larval, como revisado por Gill et al. (2018). Ainda, alterações na atividade natatória, danos na boca e intestino, genotoxicidade foram observados recentemente em trabalhos *ex situ* pelo nosso grupo de pesquisa em diferentes espécies de girinos, como *Physalaemus cuvieri* e *Physalaemus gracilis* (HEREK et al., 2020; 2021), e *Boana faber* e *Leptodactylus latrans* (PAVAN et al., 2021).

Recentemente, Agostini et al. (2020) trabalharam em 91 lagoas temporárias no Pampa Argentino, em uma mescla de ambiente terrestre e parcelas agrícolas amostrando os girinos das espécies *Boana pulchellus*; *Leptodactylus latrans*; *Rhinella fernandezae* e *Rhinella Arenarum*. A proposta de testagem foi da sobrevivência e mobilidade dos girinos nesses recintos *in situ* separando-os por tanques, onde cada tanque continha cinco recintos e cada recinto com 20 girinos, expostos a diferentes concentrações e combinações de agrotóxicos. Em paralelo, oito lagoas sem agrotóxicos, com 99,8% de sobrevivência e sem detecção de efeitos na mobilidade dos girinos foram utilizadas como controle. Dentre as lagoas contendo agrotóxicos, os autores verificaram maior toxicidade com o tratamento consistindo de cipermetrina (124-354.9 µg/L detectado) + glifosato (18,2 – 320,7 µg/L detectado), o qual causou uma sobrevivência inferior a 3,5% e zero mobilidade após 48h exposição (AGOSTINI et al., 2020).

Tem sido frequentemente reportado a sinergia de fatores, principalmente abióticos, na toxicidade dos agrotóxicos, onde o pH (CHEN; HATHAWAY; FOLT, 2004), e a temperatura (CAMP; BUCHWALTER, 2016) podem aumentar os efeitos tóxicos de agrotóxicos por impactarem a taxa de absorção, atuando como um modulador da toxicidade subletal. Essa sinergia é destacada principalmente em pequenos ambientes lênticos, onde as taxas de agrotóxicos atingem concentrações mais elevadas, comparadas a rios e lagoas maiores

(AGOSTINI et al., 2020). Segundo esses autores, apesar de um maior impacto na mobilidade e na sobrevivência dos girinos ser verificado em 48 horas, esses efeitos podem ser ainda mais negativos ao longo do tempo. Nesse levantamento, a forma da utilização dos agrotóxicos reflete a realidade usual de aplicação e de utilização na América do Sul, incluindo o sul do Brasil, Argentina e Paraguai (LÓPEZ et al., 2012) e, após as aplicações nas lavouras, todas as formulações atingiram altas concentrações nas colunas d'água, aumentando a possibilidade de ocorrer efeitos letais e subletais nos girinos (AGOSTINI et al., 2020).

Em áreas de cultivo agrícola, diversos efeitos negativos foram observados em experimentação *in situ*, em espécies de anfíbios. Attademo et al. (2014) avaliaram as espécies *Scinax squalirostris* e *Leptodactylus mystacinus* em tanques mantidos em canais de plantação de arroz na Argentina, onde o local recebeu pulverização do inseticida lambdacialotrina via aérea. Como ambiente controle foi utilizada uma área nativa preservada. Os animais, em ambos os ambientes naturais, permaneceram em tanques perfurados, para permitir a troca de fluidos com o ambiente, até atingirem o estágio Gosner 36-37, consistindo de três repetições com 90 girinos por sítio reprodutivo. A partir da análise diária foi verificado que as concentrações de nitrato e ortofosfato foram maiores e os níveis de pH, oxigênio dissolvido e condutividade foram menores na área da lavoura de arroz em relação ao ambiente nativo. Isso pode ter contribuído para o aumento da mortalidade e menor tamanho dos girinos avaliados em área agrícola (ATTADAMO et al., 2014). Os autores verificaram, ainda, a inibição da atividade de acetilcolinesterase (AChE) e uma redução (25%) na atividade da carboxilesterase nos girinos expostos aos cursos de água utilizados na irrigação dessas lavouras, o que não foi verificado nas áreas controle. A variação nas colinesterases (AChE e BChE), as quais atuam na hidrólise do neurotransmissor acetilcolina e nas sinapses colinérgicas, e a atividade da enzima glutathione-S-transferases, que atua na detoxificação celular (KHAN et al., 2003; ARAÚJO et al., 2016), associados à diminuição de eritrócitos mitóticos nos girinos mantidos na área agrícola são importantes marcadores bioquímicos de condições indutoras de estresse (BARNI et al., 2007).

O impacto da agricultura na espécie de girino *Bufo bufo*, na Inglaterra e no país de Gales foi avaliado por Orto e Routledge (2011). Os autores obtiveram desovas de *B. bufo* de quatro ambientes agrícolas e as mantiveram em tanques no ambiente nativo (*in situ*). Os ambientes *in situ* foram classificados como nenhuma ou pouca contaminação (referência), um local com pouca atividade agrícola e dois locais com alta atividade agrícola, e, conseqüentemente, maior utilização de agrotóxicos. Os indivíduos foram analisados ao longo de 15 semanas. Os ambientes com baixa atividade agrícola (69,5%) e com alta atividade agrícola (76,7 e 81,5%) apresentaram alto insucesso na eclosão dos ovos (porcentagem de ovos que não eclodiram), em

relação ao ambiente referência (15%). Ainda, um dos ambientes de alta atividade agrícola causou 100% da mortalidade dos girinos (ORTON; ROUTLEDGE, 2011). Situações de estresse podem elevar os níveis de corticosterona, aumentar a taxa metamórfica (HAYES, 1995) desregulada, que pode ocasionar a morte dos girinos. Em comparação com experimento *ex situ*, todos indivíduos mantidos em tanques, no ambiente natural, tiveram um tamanho menor, com peso até 3,5 vezes menor na área com alta atividade agrícola (ORTON; ROUTLEDGE, 2011). Além disso, em condições *in situ*, observou-se um maior dimorfismo sexual, sendo o primeiro relato da ocorrência intersexo de espécies de anfíbios europeus.

Mais recentemente, Pollard et al. (2016) avaliaram uma área inicialmente utilizada para fins industriais e aterros, com contaminação por lixiviados, a qual foi remediada a partir de um programa específico em Sydney, na Austrália (DARCOVICH; O'MEARA, 2008). Para a remediação da área, localizada no Parque Olímpico de Sydney, áreas primárias de habitat da rã-de-sino (*Litoria aurea*) foram estruturadas consistindo em 37 lagoas em um corredor de 40 ha de terra, na década de 90 (DARCOVICH; O'MEARA, 2008; PICKETT et al., 2013). Assim que a reestruturação foi realizada, *L. aurea* ocupava a maioria dos lagos (27 dos 33 lagos disponíveis na época de reprodução de 2000/2001). No entanto, a ocupação diminuiu gradualmente, com apenas sete dos 37 lagos disponíveis ocupados na época de reprodução de 2011/12. Pollard et al. (2016) verificaram, ao colocar desovas em compartimentos nesses lagos, que as maiores taxas de mortalidade ocorreram durante o ovo até o estágio embrionário de *L. aurea*, com alguns ovos não mostrando nenhum desenvolvimento. No entanto, observou-se similar taxa de sobrevivência dos girinos, assim como semelhante qualidade da água de lagoas não reprodutivas em comparação com lagoas de reprodução, o que pode ter permitido a alta taxa de sobrevivência de *L. aurea* nesses ambientes (POLLARD et al., 2016). É de conhecimento que a qualidade química inadequada da água pode dificultar o desenvolvimento dos embriões e os impede a eclosão dos ovos de anfíbios (FREDA; DUNSON, 1985)

Na Argentina, água contaminadas pelo agrotóxico azinfosmetil, determinada em canal de irrigação para pomares de frutas mostraram apresentaram efeitos negativos em girinos da espécie nativa *Rhinella arenarum* (ROSENBAUM et al., 2012). Segundo os autores, a inibição na atividade da AChE e na atividade da carboxilesterase demonstram a importância do uso desses biomarcadores neurotóxicos, permitindo o monitoramento e avaliação de risco a partir da alteração fisiológica e bioquímica desses organismos à exposição química.

Sparling et al. (2014) também avaliaram o efeito de agrotóxicos existentes em poças sobre as populações de anuros nativos. Em lagoas de Sierra Nevada, nos Estados Unidos, os autores verificaram a presença principalmente de malation, trifuralina e endosulfan, os quais

foram relacionados com um aumento na genotoxicidade e reduzidas taxas de desenvolvimento e sobrevivência de girinos de *Pseudacris regilla*.

Em um trabalho similar, realizado no Canadá, Dyck et al. (2021) avaliaram seis áreas de um canal de irrigação para a agricultura intensiva, sendo três em área dragada e três em área não manejada. Os autores verificaram que, com a presença da vegetação, os girinos de *Rana* [*Lithobates*] *pipiens* não sofrem efeitos prejudiciais na sobrevivência, e desenvolvimento, mesmo com o relativo aumento de glifosato no ambiente após a limpeza do canal (DYCK et al., 2021). Já em ambientes gradados/limpos, com maior exposição à alta temperatura, pode ser considerado o parâmetro físico-químico mais influente no desenvolvimento de girinos nas áreas dragadas/limpas, em relação à menor temperatura observada nas áreas com vegetação/não manejadas (CAMP; BUCHWALTER, 2016; DYCK et al., 2021). O aumento da temperatura pode contribuir para a dessecação desses ambientes em períodos mais quentes do ano, eliminando o ambiente aquático e ameaçando a sobrevivência dos sapos caso o estágio de vida terrestre não tenha sido atingido ainda (DYCK et al., 2021). Os anfíbios são conhecidos por acelerar o desenvolvimento metamórfico devido ao risco de dessecação (SZÉKELY et al., 2017; RUTHSATZ et al., 2018). No entanto, antecipar a metamorfose pode diminuir a probabilidade de sobrevivência também no estágio adulto terrestre (ALTWEGG; REYER, 2003) e potencialmente diminuir o sucesso reprodutivo (RUDOLF; RÖDEL, 2007).

Apesar da experimentação *in situ* estar se mostrando uma maneira rápida e mais realista de investigar as condições toxicológicas dos ambientes locais (GONÇALVES et al., 2019), ainda são necessárias descrições mais detalhadas e quantificação de agrotóxicos no meio, além de mais pesquisas que englobem todo o ciclo de vida dos anfíbios, desde os estágios aquáticos até os terrestres (DYCK et al., 2021). O pH elevado pode aumentar o efeito tóxico (CHEN; HATHAWAY; FOLT, 2004) e características físicas, químicas e biológicas da água podem afetar a persistência dos agrotóxicos no meio (WOJTASZEK et al., 2005). Essas visões mais abrangentes e a longo prazo são importantes devido às interações entre os agrotóxicos e fatores abióticos no meio que podem alterar a toxicidade dessas substâncias químicas e mesmo o desenvolvimento tardio dos anfíbios. Além disso, é importante, em paralelo, rever a legislação para o uso de agrotóxicos, uma vez que inúmeros trabalhos já relataram efeitos tóxicos por diferentes classes de agrotóxicos em experimentos controlados (*ex situ*) (MACAGNAN et al., 2017; RUTKOSKI et al., 2018; 2020a; 2020b; WRUBLESWSKI et al., 2018; VANZETTO et al., 2019; HEREK et al., 2020; 2021; PAVAN et al., 2021), possibilitando uma melhor proteção ao meio ambiente e também para a espécie humana (AGOSTINI et al., 2020) que indiretamente fica exposta a esses contaminantes. Relacionar o declínio populacional com o uso de

agrotóxicos, de forma *in situ*, é tarefa árdua e para isso, requer um longo monitoramento de dados em diversas regiões acompanhado de experimentos controlados já que para entender os reais impactos dos agrotóxicos nas populações se necessitam de mais estudos.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As informações disponíveis sobre a interação entre as espécies nativas e os agrotóxicos apontam a ocorrência de malformações, inibição da atividade da AchE, desenvolvimento, redução da atividade natatória, danos estruturais, alterações genotóxicas e na sobrevivência em diferentes espécies de anfíbios. No entanto, as diferentes espécies podem apresentar respostas diferenciais à exposição aos agrotóxicos. Isso ocorre uma vez que as concentrações dos agrotóxicos no meio tendem a variar com fatores ambientais, como o aumento da temperatura, alterações de pH e oxigênio dissolvido.

Mesmo com um número ainda incipiente de estudos, os trabalhos publicados apontam dados críticos principalmente desenvolvimento dos anfíbios, o que a longo prazo, ou seja, em uma exposição contínua, afetam a sobrevivência desses organismos levando a morte ou comprometendo a busca por ingestão de alimentos e fuga de predadores, entre outros. Dentre os agrotóxicos estudados, observou-se um maior número de trabalho relacionados à exposição ao glifosato, o que é justificado por ser um dos herbicidas mais utilizados em todo o mundo. No entanto, o crescente aumento na diversidade de agrotóxicos comercializados anualmente requer ainda mais estudos para evitar um declínio populacional alarmante a curto prazo das espécies de anfíbios.

REFERÊNCIAS

- AGOSTINI, M. G.; ROESLER, I.; BONETTO, C.; RONCO, A. E.; BILENCA, D. Pesticides in the real world: The consequences of GMO-based intensive agriculture on native amphibians. **Biological Conservation**, v. 241, p. 108355, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.108355>.
- ALTWEGG, R.; REYER, H.-U. Patterns of natural selection on size at metamorphosis in water frogs. **Evolution**, v. 57, p. 872-882, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2003.tb00298.x>.
- ATTADAMO, A. M.; PELTZER, P. M.; LAJMANOVICH, R. C.; CABAGNA-ZENKLUSEN, M. C.; JUNGES, C. M.; BASSO, A. Biological endpoints, enzyme activities, and blood cell parameters in two anuran tadpole species in rice agroecosystems of mid-eastern Argentina. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 186, p. 635-649, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10661-013-3404-z>.
- BANK, M. S.; CROCKER, J. B.; DAVIS, S.; BROTHERTON, D. K.; COOK, R.; BEHLER, J.; CONNERY, B. Population decline of northern dusky salamanders at Acadia National Park, Maine, USA. **Biological Conservation**, v. 130, p. 230-238, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.12.033>.
- BANK, M. S.; LOFTIN, C. S.; JUNG, R.E. Mercury bioaccumulation in northern two-lined salamanders from streams in the northeastern United States. **Ecotoxicology**, v. 14, p. 181-191, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10646-004-6268-8>.
- BARNI, S.; BONCOMPAGNI, E.; GROSSO, A.; BERTONE, V.; FREITAS, I.; FASOLA, M.; FENOGLIO, C. Evaluation of *Rana ssk esculenta* blood cell response to chemical stressors in the environment during the larval and adult phases. **Aquatic Toxicology**, v. 81, p. 45-54, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.10.012>.
- BEATTIE, R. C.; TYLER-JONES, R. The effects of low pH and aluminum on breeding success in the frog *Rana temporaria*. **Journal of Herpetology**, v. 26, p. 353-360, 1992. DOI: <https://doi.org/10.2307/1565111>
- BONFANTI, P.; SAIBENE, M.; BACCHETTA, R.; MANTECCA, P.; COLOMBO, A. A. glyphosate micro-emulsion formulation displays teratogenicity in *Xenopus laevis*. **Aquatic Toxicology**, v. 195, p. 103-113, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.12.007>.
- CAMP, A.A.; BUCHWALTER, D.B. Can't take the heat: temperature-enhanced toxicity in the mayfly *Isonychia bicolor* exposed to the neonicotinoid insecticide imidacloprid. **Aquatic Toxicology**, v. 178, p. 49-57, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.07.011>.
- CHEN, C.Y.; HATHAWAY, K.M.; FOLT, C.L. Multiple stress effects of vision herbicide, pH, and food on zooplankton and larval amphibian species from forest wetlands. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, p. 823-831, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1897/03-108>.
- CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução CONAMA N° 001, de 23 de janeiro de 1986**. Dispõe sobre critérios básicos e diretrizes gerais para a avaliação de impacto ambiental. Ministério do Meio Ambiente (MMA). Brasil. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/sophia/cnia/legislacao/MMA/RE0001-230186.PDF>. Acessado em 08 nov. 2022.

DARCOVICH, K.; O'MEARA, J. An olympic legacy: green and golden bell frog conservation at Sydney Olympic Park 1993–2006, 2008. **Australian Zoologist**, v. 34, p. 236-248. DOI: <https://doi.org/10.7882/AZ.2008.001>.

DYCK, A.; ROBINSON, S. A.; YOUNG, S. D.; RENAUD, J. B.; SABOURIN, L.; LAPEN, D. R.; PICK, F. R. The effects of ditch management in agroecosystems on embryonic and tadpole survival, growth, and development of northern leopard frogs (*Lithobates pipiens*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 81, p. 107-122, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00244-021-00836-0>.

EDGE, C. B.; THOMPSON, D. G.; HAO, C.; HOULAHAN, J. E. A silviculture application of the glyphosate-based herbicide VisionMAX to wetlands has limited direct effects on amphibian larvae. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 31, p. 2375-2383, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1002/etc.1956>

EDGE, C.; THOMPSON, D.; HAO C.; HOULAHAN J. The response of amphibian larvae to exposure to a glyphosate-based herbicide (Roundup WeatherMax) and nutrient enrichment in an ecosystem experiment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 109, p. 124-132, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.07.040>.

FREDA, J.; DUNSON, W.A. The influence of external cation concentration on the hatching of amphibian embryos in water of low pH. **Canadian Journal of Zoology**, v. 63, p. 2649-2656, 1985. DOI: <https://doi.org/10.1139/z85-396>.

GILL, J. P. K.; SETHI, N.; MOHAN, A.; DATTA, S., GIRDHAR, M. Glyphosate toxicity for animals. **Environmental Chemistry Letters**, v. 16, p. 401-426, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10311-017-0689-0>.

GLINSKI, D. A.; HENDERSON, W. M.; VAN METER, R. J.; PURUCKER, T. Effect of hydration status on pesticide uptake in anurans following exposure to contaminated soils. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 16192-16201, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1830-8>.

GONÇALVES, M. W.; VIEIRA, T. B.; MACIEL, N. M.; CARVALHO, W. F.; LIMA, L. S. F.; GAMBALE, P. G.; CRUZ, A. D.; NOMURA, F.; BASTOS, R. P.; SILVA, D. M. Detecting genomic damages in the frog *Dendropsophus minutus*: preserved versus perturbed areas. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 3947-3954, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3682-1>.

GONÇALVES, M. W.; CAMPOS, C. B. M.; GODOY, F. R.; GAMBALE, P. G.; NUNES, H. F.; NOMURA, F.; BASTOS, R. P.; CRUZ, A. D.; SILVA, D. M. Assessing genotoxicity and mutagenicity of three common amphibian species inhabiting agroecosystem environment. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 77, p. 409-420, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00244-019-00647-4>.

GUIDA, Y. S.; MEIRE, R. O.; TORRES, J. P. M.; MALM, O. Air contamination by legacy and current-use pesticides in Brazilian mountains: An overview of national regulations by monitoring pollutant presence in pristine areas. **Environmental Pollution**, v. 242, p. 19-30, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.06.061>.

HADDAD, C. F. B.; TOLEDO, L. F.; PRADO, C. P. A.; LOEBMANN, D.; GASPARINI, J. L.; SAZIMA, I. **Guia dos anfíbios da mata atlântica: Diversidade e biologia**. Sao Paulo: Anolis Books. 2013. 544 p. ISBN: 9788565622035.

HAYES, T. B.; WU, T. H. Interdependence of corticosterone and thyroid hormones in toad larvae (*Bufo boreas*). II. Regulation of corticosterone and thyroid hormones. **Journal of Experimental Zoology**, v. 271, n. 2, p. 103–111, 1995. DOI: <https://doi.org/10.1002/jez.1402710205>.

HAYES, T. B.; STUART, A. A.; MENDOZA, M.; COLLINS, A.; NORIEGA, N.; VONK, A.; JOHNSTON, G.; LIU, R.; KPODZO, D. Characterization of atrazine-induced gonadal malformations in african clawed frogs (*Xenopus laevis*) and comparisons with effects of an androgen antagonist (cyproterone acetate) and exogenous estrogen (17 β -estradiol): Support for the demasculinization/feminization hypothesis. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, p. 134-141, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1289/ehp.8067>.

HEREK, J. S.; VARGAS, L.; TRINDADE, S. A. R.; RUTKOSKI, C. F.; MACAGNAN, N.; HARTMANN, P. A.; HARTMANN, M. T. 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). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 22619-22630, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08869-z>.

HEREK, J. S.; VARGAS, L.; TRINDADE, S. A. R.; RUTKOSKI, C. F.; MACAGNAN, N.; HARTMANN, P. A.; HARTMANN, M. T. Genotoxic effects of glyphosate on *Physalaemus* tadpoles. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 81, p. 103516, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103516>.

ILHA P.; SCHIESARI L. Lethal and sublethal effects of inorganic nitrogen on gladiator frog tadpoles (*Hypsiboas faber*, Hylidae). **Copeia** 2014, 221-230, 2014. <https://doi.org/10.1643/OT-13-117>

IUCN. **The IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2022-1. Disponível em: www.iucnredlist.org. Acesso em: 08 nov. 2022.

KHAN, M. Z.; TABASSUM, R.; NAQVI, S. N.-U.-H.; SHAH, E. Z.; TABASSUM, F.; AHMED, 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. DOI: <https://journals.tubitak.gov.tr/zoology/vol27/iss3/11>.

LANCTÔT, C.; NAVARRO-MARTÍN, L.; ROBERTSON, C.; PARK, B.; JACKMAN, P.; PAULI, B. D.; TRUDEAU, V. L. Effects of glyphosate-based herbicides on survival, development, growth and sex ratios of wood frog (*Lithobates sylvaticus*) tadpoles. II: Agriculturally relevant exposures to Roundup WeatherMax® and Vision® under laboratory conditions. **Aquatic Toxicology**, v. 154, p. 291-303, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.05.025>.

LASKOWSKI, D. A. Physical and chemical properties of pyrethroids. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 174, p. 149-170, 2002. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4757-4260-2_3.

LLEWELYN, V. K.; BERGER, L.; GLASS, B. D. Permeability of frog skin to chemicals: effect of penetration enhancers. **Heliyon**, v. 5, p. e02127, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02127>.

LÓPEZ, S. L.; AIASSA, D.; BENÍTEZ-LEITE, S.; LAJMANOVICH, R.; MAÑAS, F.; POLETTA, G.; SÁNCHEZ, N.; SIMONIELLO, M. F.; CARRASCO, A. E. Pesticides used in

South American GMO-based agriculture: a review of their effects on humans and animal models. **Advances in Molecular Toxicology**, v. 6, p. 41-75, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59389-4.00002-1>.

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, p. 20699-20704, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9727-5>.

MAHMOOD, I.; IMADI, S. R.; SHAZADI, K.; GUL, A.; HAKEEM, K. R. Effects of pesticides on environment. In: HAKEEM, K.; AKHTAR, M.; ABDULLAH, S. (eds.) **Plant, Soil and Microbes**. Cham: Springer. p. 253-269, 2016. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-27455-3_13.

MATSON, C. W.; GILLESPIE, A. M.; MCCARTHY, C.; MCDONALD, T. J.; BICKHAM, J. W.; SULLIVAN, R.; DONNELLY, K. C. Wildlife toxicology: biomarkers of genotoxic exposures at a hazardous waste site. **Ecotoxicology**, v. 18, p. 886-898, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10646-009-0350-1>.

NWANI, C. D.; LAKRA, W. S.; NAGPURE, N. S.; KUMAR, R.; KUSHWAHA, B.; SRIVASTAVA, S. K. Toxicity of the herbicide atrazine: Effects on lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in the freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch). **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, p. 3298-3312, 2010. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph7083298>.

NYSTRÖM, P.; HANSSON, J.; MÅNSSON, J.; SUNDSTEDT, M.; RESLOW, C.; BROSTRÖM, A. A documented amphibian decline over 40 years: possible causes and implications for species recovery. **Biological Conservation**, v. 138, p. 399-411, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2007.05.007>.

ORTIZ-SANTALIESTRA, M. E.; MAIA, J. P.; EGEE-SERRANO, A.; LOPES, I. Validity of fish, birds and mammals as surrogates for amphibians and reptiles in pesticide toxicity assessment. **Ecotoxicology**, v. 27, p. 819-833, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10646-018-1911-y>.

ORTON, F.; ROUTLEDGE, E. Agricultural intensity *in ovo* affects growth, metamorphic development and sexual differentiation in the Common toad (*Bufo bufo*). **Ecotoxicology**, v. 10, p. 901-911, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0658-5>.

PAVAN, F. A.; SAMOJEDEN, C. G.; RUTKOSKI, C. F.; FOLADOR, A.; DA FRÉ, S. P.; MÜLLER, C.; HARTMANN, P. A.; HARTMANN, M. T. 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, p. 103637, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2021.103637>.

PICKETT, E. J.; STOCKWELL, M. P.; BOWER, D. S.; GARNHAM, J. I.; POLLARD, C. J.; CLULOW, J.; MAHONY, M. J. Achieving no net loss in habitat offset of a threatened frog required high offset ratio and intensive monitoring. **Biological Conservation**, v. 157, p. 156-162, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2012.09.014>.

POLLARD, C. J.; STOCKWELL, M. P.; BOWER, D. S.; CLULOW, J.; MAHONY, M. J. Combining *ex situ* and *in situ* methods to improve water quality testing for the conservation of

aquatic species. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**, v. 27, p. 559-568, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1002/aqc.2700>.

ROJAS-HUCKS, S.; ROJAS-HUCKS, S.; GUTLEB, A. C.; GONZÁLEZ, C. M.; CONTAL, S.; MEHENNAOUI, K.; JACOBS, A.; WITTERS, H. E.; PULGAR, J. *Xenopus laevis* as a bioindicator of endocrine disruptors in the region of central Chile. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 77, 390-408, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00244-019-00661-6>.

ROSENBAUM, E. A.; DUBOSCQ, L.; SOLEÑO, J.; MONTAGNA, C. M.; FERRARI, A.; VENTURINO, A. Response of biomarkers in amphibian larvae to *in situ* exposures in a fruit-producing region in North Patagonia, Argentina. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 31, p. 2311-2317, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1002/etc.1950>.

RUDOLF, V. H. W.; RÖDEL, M. O. Phenotypic plasticity and optimal timing of metamorphosis under uncertain time constraints. **Evolutionary Ecology**, v. 21, p. 121-142, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10682-006-0017-9>.

RUTHSATZ, K.; PECK, M. A.; DAUSMANN, K. H.; SABATINO, N. M.; GLOS, J. Patterns of temperature induced developmental plasticity in anuran larvae. **Journal of Thermal Biology**, v. 74, p. 123-132, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.03.005>.

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, p. 587-593, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00244-017-0501-y>.

RUTKOSKI, C. F.; MACAGNAN, N.; FOLADOR, A.; SKOVRONSKI, V. J.; AMARAL, A. M. B.; LEITEMPERGER, J.; DORNELLES, M.; HARTMANN, P. A.; MÜLLER, C.; LORO, V. L.; HARTMANN, M. T. Cypermethrin- and fipronil-based insecticides cause biochemical changes in *Physalaemus gracilis* tadpoles. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 4377-4387, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10798-w>.

RUTKOSKI, C. F.; MACAGNAN, N.; FOLADOR, A.; SKOVRONSKI, V. J.; AMARAL, A. M. B.; LEITEMPERGER, J.; DORNELLES, M.; HARTMANN, P. A.; MÜLLER, C.; LORO, V. L.; HARTMANN, M. Morphological and biochemical traits and mortality in *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae) tadpoles exposed to the insecticide chlorpyrifos. **Chemosphere**, v. 250, p. 126162, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126162>.

SÁNCHEZ-BAYO, F.; WYCKHUYS, K. A. G. Worldwide decline of the entomofauna: a review of its drivers. **Biological Conservation**, v. 232, p. 8-27, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.01.020>.

SPADOTTO, C. A.; GOMES, M. A. F.; LUCHINI, L. C.; ANDRÉA, M. M. **Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. 2004. 29 p. ISSN 1516-4691.

SPARLING, D. W.; BICKMAN, J.; COWMAN, D.; FELLERS, G. M.; LACHER, T.; MATSON, C. W.; MCCONNELL, L. In situ effects of pesticides on amphibians in the Sierra Nevada. **Ecotoxicology**, v. 24, p. 262-278, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10646-014-1375-7>.

SZÉKELY, D.; DENOËL, M.; SZÉKELY, P.; COGĂLNICEANU, D. Pond drying cues and their effects on growth and metamorphosis in a fast developing amphibian. **Journal of Zoology**, v. 303, p. 129-135, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1111/jzo.12468>.

THOMPSON, D. G.; WOJTASZEK, B. F.; STAZNIK, B.; CHARTRAND, D. T.; STEPHENSON, G. R. Chemical and biomonitoring to assess potential acute effects of vision® herbicide on native amphibian larvae in forest wetlands. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, p. 843-849, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1897/02-280>.

VANZETTO, G. V.; SLAVIERO, J.; STURZA, P. F.; RUTKOSKI, C. F.; MACAGNAN, N.; KOLCENTI, C.; HARTMANN, P. A.; FERREIRA, C. M.; HARTMANN, M. T. Toxic effects of pyrethroids in tadpoles of *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae). **Ecotoxicology**, v. 28, p. 1105-1114, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10646-019-02115-0>.

VENTURINO, A.; ROSENBAUM, E.; CASTRO, A. C.; ANGUIANO, O. L.; GAUNA, L.; SCHROEDER, T. F.; D'ANGELO, A. M. P. 2003 Biomarkers of effect in toads and frogs. **Biomarkers**, v. 8, p. 167-186, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1080/1354700031000120116>.

WOJTASZEK B. F.; STAZNIK, B.; CHARTRAND, D. T.; STEPHENSON, G. R.; THOMPSON, D. G. Effects of Vision herbicide on mortality, avoidance response, and growth of amphibian larvae in two forest wetlands. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, p. 832-842, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1897/02-281>.

WRUBLESWSKI J.; REICHERT JR, F. W.; GALON, L.; HARTMANN, P. A.; HARTMANN, M. T. Acute and chronic toxicity of pesticides on tadpoles of *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leptodactylidae). **Ecotoxicology**, v. 27, p. 360-368, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10646-018-1900-1>.

CAPÍTULO II

SENSIBILIDADE DE GIRINOS DE *Leptodactylus luctator* (Hudson, 1892) EM UM EXPERIMENTO *IN SITU*: ESTUDO NO PARQUE ESTADUAL DO TURVO, SUL DO BRASIL

RESUMO

O bioma Mata Atlântica detém uma elevada concentração de biodiversidade e endemismo. O Parque Estadual do Turvo (PET) engloba o maior remanescente de Floresta Estacional Semidecidual do Rio Grande do Sul. No entanto, apesar da ampla biodiversidade, fatores estressores, como agrotóxicos, podem comprometer o desenvolvimento e a sobrevivência de diferentes espécies. Anfíbios são sensíveis a mudanças ambientais devido suas características ecológicas e biológicas e, por isso, são considerados sentinelas ambientais. Assim, o objetivo deste trabalho foi comparar a sensibilidade dos girinos de *Leptodactylus luctator* em ambientes lênticos do entorno e do interior da unidade de conservação Parque Estadual do Turvo. O estudo foi realizado no interior e no entorno (zona de amortecimento) do PET, o qual está localizado no município de Derrubadas, sul do Brasil. Foram avaliados dez ambientes lênticos, sendo cinco no interior e cinco no entorno do PET. Foi realizada a análise de agrotóxicos presentes nas amostras de água coletadas nas 10 lagoas. Para o estudo dos girinos, foi coletada uma desova de *L. luctator* em uma lagoa no interior do PET, levada para laboratório até atingirem o estágio 25 na tabela Gosner e, posteriormente, os girinos foram realocados nos 10 ambientes previamente definidos, com 15 girinos em cada ambiente, em triplicata. Cada grupo de girinos foi colocado em uma lagoa, isolados dentro de uma armadilha de maneira permitindo a troca de fluídos com o ambiente, porém protegidos de predadores. Após 14 dias, os girinos foram retirados das armadilhas, contabilizados e levados para laboratório para determinação do comprimento e a massa dos indivíduos, e verificação da presença de micronúcleos e alterações nucleares nos eritrócitos (ANEs). Para as análises de genotoxicidade, uma gota de sangue de foi coletada em uma lâmina histológica e corada com kit panóptico. Foram analisadas um total de 59 lâminas, sendo 20 lâminas para os indivíduos do interior e 39 lâminas para os indivíduos do entorno do PET, com a contagem de mil células por lâmina. Em relação aos agrotóxicos, foi verificada a presença de resíduos de clomazona e clorpirifós no interior do PET e de atrazina no entorno. Além disso, azoxistrobina ($0,022 \mu\text{g L}^{-1}$) e imidacloprido ($0,028 \mu\text{g L}^{-1}$) foram quantificados na área do entorno do parque. Nos dois ambientes analisados (interior e entorno do PET), observou-se a presença de micronúcleos e ANEs nos indivíduos, principalmente apresentando células binucleadas, anucleadas, núcleo entalhado, núcleo lobado, broto, cariólise e apoptose. Mesmo com baixa ocorrência, houve a presença de micronúcleos e ANES em nosso estudo. Mais estudos são necessários para verificar os possíveis efeitos nocivos dos agrotóxicos sobre *Leptodactylus luctator* e mesmo em outras espécies presentes na região, assim como em outros períodos do ano.

Palavras-chave: Agrotóxico; girinos; experimento *in situ*.

SENSITIVITY OF *Leptodactylus luctator* TADPOLES (Hudson, 1892) IN AN *IN SITU* EXPERIMENT: A STUDY IN THE TURVO STATE PARK, SOUTH BRAZIL

ABSTRACT

The Atlantic Forest biome holds a high concentration of biodiversity and endemism. The Turvo State Park (PET) encompasses the largest remnant of Semideciduous Seasonal Forest in Rio Grande do Sul. However, despite the wide biodiversity, stressors such as pesticides can compromise the development and survival of different species. Amphibians are sensitive to environmental changes due to their ecological and biological characteristics and are therefore considered environmental sentinels. Thus, the objective of this work was to compare the sensitivity of *Leptodactylus luctator* tadpoles in lentic environments around and inside the conservation unit Turvo State Park (PET). The study was conducted within and around the PET (buffer zone), which is located in the municipality of Derrubadas, southern Brazil. Ten lentic environments were evaluated, five within and five surrounding the PET. Analysis of pesticides present in the water samples collected from the 10 ponds was performed. For the study of tadpoles, a spawning of *L. luctator* was collected from a pond inside the PET, taken to the laboratory until they reached stage 25 in the Gosner table, and then the tadpoles were relocated to the 10 previously defined environments, with 15 tadpoles in each environment, in triplicate. Each group of tadpoles was placed in a pond, isolated within a trap in a way that allowed fluid exchange with the environment, but protected from predators. After 14 days, the tadpoles were removed from the traps, counted, and taken to the laboratory to determine the length and mass of the individuals, and to check for the presence of micronuclei and nuclear alterations in erythrocytes (ANEs). For genotoxicity analyses, a drop of blood was collected and stained with a panoptic kit on a histological slide. A total of 59 slides were analyzed, 20 slides for the individuals inside the PET and 39 slides for the individuals around the PET, with a count of one thousand cells per slide. Regarding pesticides, residues of clomazone and chlorpyrifos were found inside the PET, and atrazine was found in the surrounding area. In addition, azoxystrobin ($0.022 \mu\text{g L}^{-1}$) and imidacloprid ($0.028 \mu\text{g L}^{-1}$) were quantified in the area surrounding the park. In the two environments analyzed (inside and around the PET), the presence of micronuclei and ANEs was observed in the individuals, mainly showing binucleated, anucleated, notched nucleus, lobed nucleus, nuclear buds, karyolysis, and apoptosis cells. Even low, the presence of Micronuclei and ANES occurred in our study. More studies are needed to verify the possible harmful effects of pesticides on *Leptodactylus luctator* and even on other species present in the region, as well as at other times of the year.

Keywords: Pesticides; tadpoles; *in situ* experiment.

1 INTRODUÇÃO

Como boa parte da matriz produtiva brasileira está inserida no bioma Mata Atlântica, a biodiversidade e o endemismo de espécies estão concentrados principalmente em fragmentos de mata (MYERS et al., 2000; EISENLOHR et al., 2015). Esses fragmentos estão comumente em áreas protegidas pelo código florestal (BRASIL, 2012), dentre as quais as Áreas de Preservação Permanente (APPs), incluindo-se as matas ciliares e poças naturais no entorno de nascentes. No entanto, muitos desses fragmentos estão sendo afetados com a perda de biodiversidade, principalmente devido as ações antrópicas (DE LIMA et al., 2020).

O Parque Estadual do Turvo (PET), inserido no bioma Mata Atlântica, possui 17.491,4 ha de matas bem protegidas e é o maior fragmento florestal do Rio Grande do Sul (SEMA, 2005). São encontradas no parque e em seus arredores 32 espécies de anfíbios, sendo 30 espécies pertencentes à ordem Anura, 1 espécie da ordem Gymnophiona, e 1 espécie exótica (IOP et al., 2011). Os ambientes aquáticos da área interna do parque estão envoltos por uma floresta bem estabelecida e protegida. No entanto, as áreas do entorno do PET fazem divisa com áreas agrícolas, com o cultivo principalmente de soja, trigo e milho, sem uma gradual transição entre a unidade de conservação e as áreas de produção agrícola.

As populações nativas de anfíbios anuros são particularmente vulneráveis à degradação dos ambientes naturais, principalmente por serem um grupo monofilético (ATKINS et al., 2019) tendo como característica principal a pele permeável, o que potencializa sua vulnerabilidade às alterações da qualidade ambiental (SIGURDSEN; GREEN, 2011; LARSEN & RAMLØV, 2013). Por requererem ambientes aquáticos nos ciclos iniciais de vida, esses organismos ficam expostos aos possíveis contaminantes presentes nesses corpos d'água, como agrotóxicos.

Os agrotóxicos são amplamente utilizados no controle de plantas daninhas e pragas que podem ocorrer nos cultivos agrícolas. No entanto, parte desses produtos podem ser lixiviados e acumularem em ambientes aquáticos naturais (SPADOTTO, 2004; DOMINGUES, 2005; PÉREZ-LUCAS et al., 2019). Além disso, a contaminação dos ambientes aquáticos localizados no entorno das áreas agrícolas também pode ocorrer devido a utilização inadequada desses produtos químicos (AGOSTINI et al., 2020).

Declínios populacionais de anfíbios têm sido observados em diversas regiões do mundo, com a contaminação ambiental por agrotóxicos sendo a principal causa reportada (ATTADAMO et al., 2014; EDGE et al., 2014; SPARLING et al., 2014; AGOSTINI et al., 2020; DYCK et al., 2021). Esses compostos químicos podem afetar o desenvolvimento de

girinos, com efeitos negativos na função reprodutiva, comportamento e morfologia dos indivíduos (ATTADEMO et al., 2014; DYCK et al., 2021; ADAMS et al., 2021). Alterações genotóxicas como a presença de micronúcleos e anormalidades nucleares de eritrócitos (ANEs) também têm sido relatadas em espécies de anfíbios expostas a agrotóxicos (ROCHA et al., 2020; HEREK et al., 2021; ASCOLI-MORRETE et al., 2022; SAMOJEDEN et al., 2022). A sensibilidade desses organismos às alterações no meio torna os anfíbios espécies potencialmente bioindicadoras de perturbação ambiental (SMALLING et al., 2015; HARTMANN et al., 2023 *in press*).

Dentre as mais de 8.578 espécies de anfíbios (AMPHIBIAWEB, 2023), *Leptodactylus luctator* (Hudson, 1892), pertencente à família Leptodactylidae, é uma espécie amplamente distribuída ocorrendo nas regiões tropicais e subtropicais da América do Sul a leste dos Andes (MAGALHÃES et al., 2020). Essa espécie se adapta facilmente a diferentes ambientes, ocorrendo em habitats modificados e não modificados, de campos úmidos a agroecossistemas alterados, e climas tropicais a temperados (LÓPEZ et al., 2017; FROST, 2022). Nos ambientes úmidos e temperados, essa espécie possui hábitos forrageiros e reprodutivos durante todo o ano, mas com um aumento de atividade durante a primavera e o verão (LÓPEZ et al., 2017). É um anfíbio de tamanho grande, cujos adultos podem atingir 120-149 mm de comprimento rostro-cloacal (MARTINS et al., 2015). Possui hábitos noturnos e diurnos, é altamente dependente de ambientes aquáticos para reprodução, como lagoas ou áreas alagadas, e se reproduz através de ninhos de espuma depositados em contato com a água (BERNARDE, 2012; WOLTER et al., 2022). Seu *status* de conservação está como pouco preocupante (LC) pela IUCN (2020) devido a sua ampla distribuição e adequabilidade a diferentes habitats.

No entanto, alguns estudos laboratoriais realizados com *L. luctator* demonstraram que essa espécie é sensível a toxicidade por agrotóxicos, como cipermetrina+glifosato (AGOSTINI et al., 2020), glifosato+2,4-D (PAVAN et al., 2021), clorpirifós (SILVA et al., 2021) e imidacloprido (SAMOJEDEN et al., 2022). Após a exposição a essas substâncias, girinos de *L. luctator* apresentaram alterações morfológicas, comportamentais e genotóxicas (PAVAN et al., 2021; SAMOJEDEN et al., 2022), podendo, portanto, ser considerada uma espécie bioindicadora.

Apesar do conhecimento laboratorial adquirido ao longo dos anos, ainda existem poucos dados que mostram a sensibilidade das espécies de anfíbios nos ambientes naturais. Neste caso, a experimentação *in situ* tem se mostrado uma maneira rápida e mais realista de investigar as condições toxicológicas dos ambientes locais (GONÇALVES et al., 2019), requerendo, no

entanto, descrições metodológicas mais detalhadas e quantificação de agrotóxicos no meio para um completo entendimento dos efeitos desses compostos nos anfíbios (DYCK et al., 2021).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do estudo foi avaliar a sensibilidade dos girinos de *L. lucinator* criados em lagoas em dois ambientes distintos, no interior e entorno do Parque Estadual do Turvo, uma importante Unidade de Conservação do Sul do País.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar a mortalidade dos indivíduos criados em lagoas em ambientes do interior e entorno do PET;
- b) Avaliar o desenvolvimento, medido pelo comprimento e massa corporal dos girinos de *L. lucinator* nos dois ambientes avaliados;
- c) Analisar a presença de micronúcleos e anormalidades nucleares nos eritrócitos nos girinos utilizados no experimento *in situ*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ÁREA DE ESTUDO

O estudo foi realizado no Parque Estadual do Turvo (PET) e seus entornos (27°13'57,58 "S, 53°51'04,58" O, 120-436m de altitude). O PET possui uma área total de 17.491 ha e está localizado no município de Derrubadas, na região Sul do Brasil. A fitofisionomia florestal é classificada como decidual, a qual estende-se até o nordeste da Argentina e oeste do Paraguai (IBGE, 2012).

O PET possui uma grande área preservada, porém com uma larga área agrícola no seu entorno, sem possuir zona de amortecimento efetiva entre a floresta e a área agrícola. A matriz da paisagem do entorno é composta principalmente pelo cultivo de soja, milho, pastagens ou culturas mistas. Assim, para o presente estudo, as áreas internas foram consideradas com uma distância mínima de 500 metros da borda do PET, e as áreas de entorno foram consideradas às

externas ao PET. Esse ambiente possibilita a execução de estudos voltados para a conservação de ambientes, facilitando a obter comparativos diretos entre áreas preservadas e alteradas.

A coleta de dados foi realizada em 5 lagoas localizadas na área interna do PET, onde a matriz de inserção é floresta decidual preservada, com dossel semifechado e com sub-bosque dominado por *Chusquea* sp., e em 5 lagoas da área do entorno, inseridas em uma matriz de produção agrícola, onde não existe nenhum tipo de proteção por floresta.

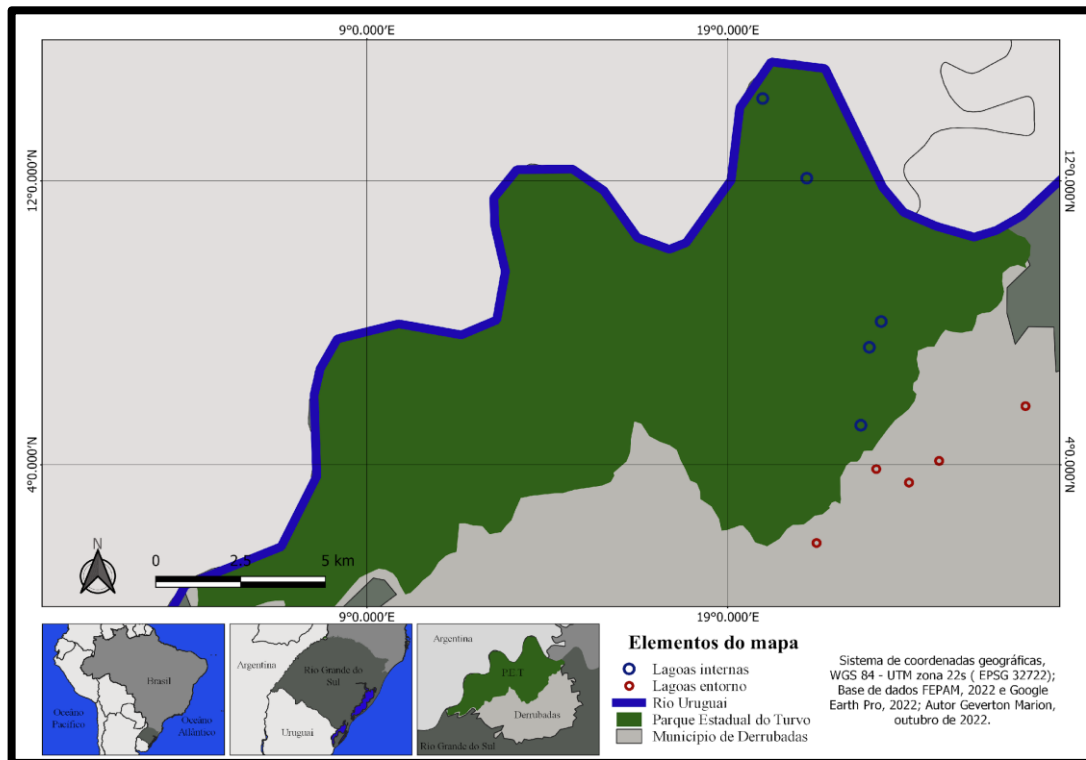
3.2 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA

Foram verificados os parâmetros físico-químicos da água nos ambientes amostrais do interior e do entorno do PET com auxílio de uma sonda multiparâmetro (HI9829, Hanna Instruments, Barueri, Brasil). A temperatura, turbidez, amônia, oxigênio dissolvido, pH e a condutividade foram amostrados no primeiro dia, quando os girinos foram colocados no ambiente *in situ*, no sétimo (07°) dia, e no último dia (14° dia) do período experimental.

3.3 ORGANISMO-TESTE

Uma desova de *L. luctator* foi coletada em um ambiente bem preservado, dentro do PET, em um corpo de água afastado da borda da unidade de conservação e de culturas agrícolas presentes no entorno (Figura 1). A coleta da desova (Figura 2) foi realizada em um corpo d'água lântico, utilizado naturalmente para a reprodução da espécie (HADDAD et al., 2013). Foi coletada apenas uma desova, manualmente, utilizando luvas plásticas e com o auxílio de uma peneira. A desova foi acomodada em uma caixa plástica (41cm x 29 cm x 14 cm) contendo 8 litros de água declorada e aerada em temperatura ambiente. Após a coleta, os ovos foram incubados em laboratório até o estágio de desenvolvimento 25 (GOSNER, 1960). Posteriormente, os girinos foram separados em 10 lagoas com 3 grupos de 15 girinos cada, totalizando 450 indivíduos. Os indivíduos foram acondicionados em potes cilíndricos de plástico (10 cm diâmetro x 15 cm altura) e levados às lagoas, nos ambientes no interior e no entorno do parque. A espécie em questão foi escolhida por ser bem conhecida e abundante nas áreas do interior e entorno do parque(IOP et al., 2011; 2012)

Figura 1 – Localização das lagoas onde foram realizados os experimentos *in situ*, com girinos de *Leptodactylus luctator*, no interior e entorno do Parque Estadual do Turvo, Derrubadas, RS.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

Figura 2 – Desova de *Leptodactylus luctator* utilizada nos experimentos *in situ*, Parque Estadual do Turvo, Derrubadas, RS.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

3.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Para a realização do experimento *in situ*, foram selecionados cinco ambientes lênticos (lagoas) no interior do PET, considerados como áreas preservadas, e cinco no entorno, na zona de amortecimento, considerados áreas alteradas, com uma distância mínima de 500 metros entre si (Figura 1). Cada lagoa recebeu três grupos amostrais com 15 girinos-cada, contidos em armadilhas plásticas cilíndricas (20 cm diâmetro x 30 cm altura), recobertas e tapadas com tela (gramatura 1mm), com furos para garantir a circulação de água. Em cada armadilha foram colocados 15 girinos em estágio 25 de desenvolvimento de acordo com a tabela Gosner (1960). Foram utilizadas 3 armadilhas por lagoa, totalizando 45 girinos por lagoa. No início do ensaio, uma amostra de 10 girinos foi medido com auxílio de um paquímetro digital (Absolute, Mitutoyo Corporation, Japão), os quais apresentaram, em média, $5,52 \pm 0,55$ mm de comprimento total. Os girinos permaneceram no ambiente amostral por um período de 14 dias, com revisões diárias para a inserção de alimentação com espinafre de forma *ad libitum* e as manutenções necessárias.

3.5 CARACTERDETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS NOS CORPOS D'ÁGUA

A análise dos agrotóxicos foi realizada no Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). A determinação de agroquímicos foi realizada pela extração em fase sólida com solvente polimérico e quantificado por cromatografia gasosa (GC-MS/MS) e líquida (LC-MS/MS) acopladas à espectrometria de massa, utilizando padrão de 55 resíduos de agrotóxicos, conforme descrito por Donato et al. (2015). As amostragens do LARP mostraram, através do método de determinação de resíduos de agrotóxicos empregando extração em fase sólida (SPE) e LC-MS/MS com limite de detecção do método (LOD) de $0,020 \mu\text{g L}^{-1}$ e limite de quantificação do método (LOQ) de $0,006 \mu\text{g L}^{-1}$.

3.6 AVALIAÇÕES DO COMPRIMENTO E MASSA

Ao final dos 14 dias do experimento *in situ*, cada girino sobrevivente foi contabilizado. Para a análise de tamanho do corpo, o excesso de água foi removido com um papel toalha e, posteriormente, os girinos foram medidos quanto ao comprimento total utilizando um paquímetro digital (Absolute, Mitutoyo Corporation, Japão), e pesados para obtenção da massa corpórea utilizando uma balança analítica (BM-A07, B-Max, China).

3.7 ANORMALIDADES NUCLEARES NOS ERITRÓCITOS

Para as análises de genotoxicidade, os indivíduos, ao final do período experimental, foram anestesiados com solução de lidocaína 2% e, imediatamente, foi coletada uma gota de sangue com auxílio de seringas de insulina descartáveis e heparinizadas para evitar a coagulação. Com as amostras de sangue foram realizados esfregaços em lâminas de microscopia esterilizadas, as quais foram, em seguida, fixadas com metanol 100% (v/v) frio (4°C), durante 2 minutos, e coradas com kit Panótico Rápido® (Laborclin Ltda, Pinhais, PR, Brasil), por cinco minutos. As lâminas foram analisadas em microscopia óptica sob lente objetiva 100x (CX31®, Olympus, Tóquio, Japão).

A análise de Anormalidades Nucleares Eritrocitárias (ANEs) foi realizada através da análise de 1.000 células por girino com o uso de microscópio óptico utilizando lente objetiva 100X, conforme descrito por Carrasco, Tilbury e Myres (1990) e Fenech et al. (2011). Foram obtidas fotografias digitais, a partir das quais foram identificadas a presença de micronúcleos e as seguintes anormalidades: (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) *Micronúcleos*: estruturas com diâmetro de até 25% do núcleo principal, sem conexão com ele, não refratável quando acionado o micrométrico do microscópio e coloração de intensidade semelhante ao do núcleo principal. O micronúcleo ocorre quando, em uma célula alterada, se inicia o reparo e eliminação da cromatina, a qual é movida para a periferia do núcleo, sendo eliminada por exocitose (LOPEZ-GONZÁLEZ et al., 2017). O micronúcleo foi identificado considerando três fatores: (a) não haver sobreposição ao núcleo principal e estar localizado dentro do citoplasma; (b) intensidade de coloração igual à do núcleo principal da célula; (c) formato arredondado e sem ligação com o núcleo principal (PÉREZ-IGLESIAS et al., 2015). A frequência das anormalidades nucleares encontradas é contada a cada mil células, ou seja, em ‰.

3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para a análise dos resultados obtidos e confecção dos gráficos foi utilizado o programa GraphPad Prism v. 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Os dados obtidos foram previamente submetidos às análises de homogeneidade da variância (teste de Levene) e normalidade dos erros (Shapiro-Wilk), e, por não serem homogêneos e/ou normais, foram submetidos à análise não-paramétrica, utilizando o teste de Mann-Whitney (MW). Em todas as situações foram considerados níveis de significância de 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA

Os parâmetros físico e químico da água diferiram entre os dois ambientes, com menores valores no interior em relação ao entorno do PET (Tabela 1). A temperatura (M-W = 46,5, $p = 0,005$), turbidez (M-W = 58,0; $p = 0,005$), amônia (M-W = 2,5, $p = 0,04$), e o oxigênio dissolvido (M-W = 36,0; $p = 0,0002$) diferiram significativamente entre os dois ambientes. Por outro lado, o pH (M-W = 68,0; $p = 0,06$) e a condutividade (M-W = 69,5; $p = 0,07$) não diferiram entre os ambientes avaliados (Tabela 1).

Tabela 1 – Parâmetros físico-químicos da água das lagoas do interior e entorno do Parque Estadual do Turvo (PET), Derrubadas, RS

| Parâmetros | Interior do PET | Entorno do PET |
|---|-------------------------------|-------------------------------|
| pH | 6,47 ± 0,31 (5,86 - 6,87) | 6,68 ± 0,14 (6,36 - 6,87) |
| Condutividade (S m ⁻¹) | 43,73 ± 28,89 (12,00 - 83,00) | 64,53 ± 13,87 (48,00 - 86,00) |
| Temperatura (°C) | 20,76 ± 1,40 (18,90 - 23,00) | 22,50 ± 1,41 (20,50 - 24,00)* |
| Turbidez (UNT) | 9,06 ± 9,39 (0,50 - 29,00) | 13,79 ± 2,44 (9,90 - 17,10)* |
| Oxigênio dissolvido (mg L ⁻¹) | 0,02 ± 0,07 (0,00 - 0,27) | 2,20 ± 2,29 (0,00 - 5,96)* |
| Amônia (mL) | 0,25 ± 0,00 (0,25 - 0,25) | 0,65 ± 0,33 (0,25 - 1,00)* |

Médias ± desvio padrão ($n = 5$). Valores entre parênteses indicam valores de mínimo e máximo. Asterisco (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$), entre interior e entorno do PET, pelo teste de Mann-Whitney. Unidade de medida: Siemens por metro (S m⁻¹), Escala Termométrica Celsius (°C), Unidades Nefelométricas de Turbidez - UNT, miligramas por litro (mg L⁻¹), miligramas por litro (mL)

Fonte: Elaborada pelo autor, 2023

4.2 ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS

Nas análises de agrotóxicos presentes nos ambientes em estudo, foi verificada a presença de resíduo) dos agrotóxicos clomazona e clorpirifós na área interna do PET e detectados os agrotóxicos atrazina (em valor abaixo de detecção do método) azoxistrobina ($0,022 \mu\text{g L}^{-1}$) e imidacloprido ($0,028 \mu\text{g L}^{-1}$) na área do entorno do parque (Anexo 1).

4.3 SOBREVIVÊNCIA E TAMANHO DO CORPO

Ao final de 14 dias de experimento *in situ*, sobreviveram, em média, 20 girinos (8,8%) no interior e 39 girinos (17,33%) no entorno do PET, dos 225 indivíduos colocados em cada ambiente. A porcentagem de sobrevivência não diferiu entre as áreas avaliadas pelo teste de Mann-Whitney ($M-W = 7,0$; $p = 0,27$; Tabela 2).

O comprimento dos girinos, após 14 dias nos ambientes naturais, foi de 10,67 mm e 14,06, nas lagoas do interior e entorno, respectivamente (Tabela 2). Os indivíduos que se desenvolveram nas lagoas do interior tiveram um comprimento total significativamente menor ($M-W = 164,0$; $p = 0,01$) em relação aos indivíduos do entorno do PET. De forma similar ao comprimento, a massa dos girinos do entorno do PET foi significativamente maior quando comparada à massa dos girinos das lagoas do interior do PET ($M-W = 176,5$; $p = 0,0004$) (Tabela 2). Dessa forma, o tamanho do corpo, medido pelo comprimento e massa foi maior nos girinos das lagoas do entorno do PET.

Tabela 2 – Sobrevivência, comprimento total e massa dos girinos de *Leptodactylus luctator* analisados nos ambientes Interior e Entorno, no Parque Estadual do Turvo (PET), Rio Grande do Sul, Brasil

| Parâmetros | Interior do PET | Entorno do PET |
|-------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Sobrevivência (%) | 8,89±13,05 (0,00 – 28,89) | 17,33±7,59 (6,67 – 24,44) |
| Comprimento total (mm) | 10,67±2,53 (6,73 – 14,70) | 14,06±4,84 (4,02 – 28,09) |
| Massa (g) | 0,88±0,08 (0,70 – 1,03) | 1,01±0,14 (0,73 – 1,50) |

Médias ± desvio padrão ($n = 5$). Valores entre parênteses indicam valores de mínimo e máximo.
Fonte: Elaborada pelo autor, 2023

4.4 ANORMALIDADES NUCLEARES NOS ERITRÓCITOS (ANEs)

O micronúcleo, assim como as ANEs (células anucleadas, células binucleadas, núcleo entalhado, bolha ou broto nuclear, núcleo lobado, cariólise e apoptose), foram verificados nos indivíduos presentes nos dois ambientes avaliados (Tabela 4, Figuras 3 e 4). Não foram observadas diferenças significativas para a presença de micronúcleos ($M-W = 389,5$; $p = 0,89$)

e/ou ANEs totais entre os ambientes avaliados (interior e entorno do PET) sendo a cariólise a anormalidade que apresentou diferença significativa entre os ambientes (M-W = 225,0; $p = 0,004$), com maior presença nos indivíduos do entorno, em relação ao interior do PET (Tabela 3).

Tabela 3 – Anormalidades Nucleares nos Eritrócitos (ANEs) e Micronúcleo encontradas nos girinos de *Leptodactylus luctator* nas lagoas do Interior e Entorno no Parque Estadual do Turvo (PET), Derrubadas, RS. A frequência das anormalidades nucleares é apresentada em %

| Parâmetros | Interior do PET | Entorno do PET |
|-------------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Micronúcleo | 0,05±0,22 (0,00 - 1,00) | 0,05±0,22 (0,00 - 1,00) |
| Célula Anucleada | 2,80±1,73 (0,00 - 6,00) | 3,43±2,24 (0,00 - 8,00) |
| Célula Binucleada | 1,05±0,94 (0,00 - 3,00) | 1,41±1,27 (0,00 - 5,00) |
| Núcleo Entalhado | 0,85±1,13 (0,00 - 4,00) | 0,89±1,23 (0,00 - 5,00) |
| Bolha/Broto Nuclear | 0,45±0,75 (0,00 - 2,00) | 0,79±1,17 (0,00 - 4,00) |
| Núcleo Lobado | 0,35±0,74 (0,00 - 2,00) | 0,58±0,96 (0,00 - 4,00) |
| Cariólise | 0,35±0,74 (0,00 - 2,00)* | 1,10±1,09 (0,00 - 4,00) |
| Apoptose | 4,95±1,76 (2,00 - 9,00) | 4,23±2,96 (0,00 - 10,00) |
| Número de células analisadas | 20.000 | 39.000 |
| Total de ANEs (%) | 1,08 | 1,25 |

Médias ± desvio padrão ($n = 5$). Valores entre parênteses indicam valores de mínimo e máximo. Asterisco (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$), entre interior e entorno do PET, pelo teste de Mann-Whitney.

Fonte: Elaborada pelo autor, 2023

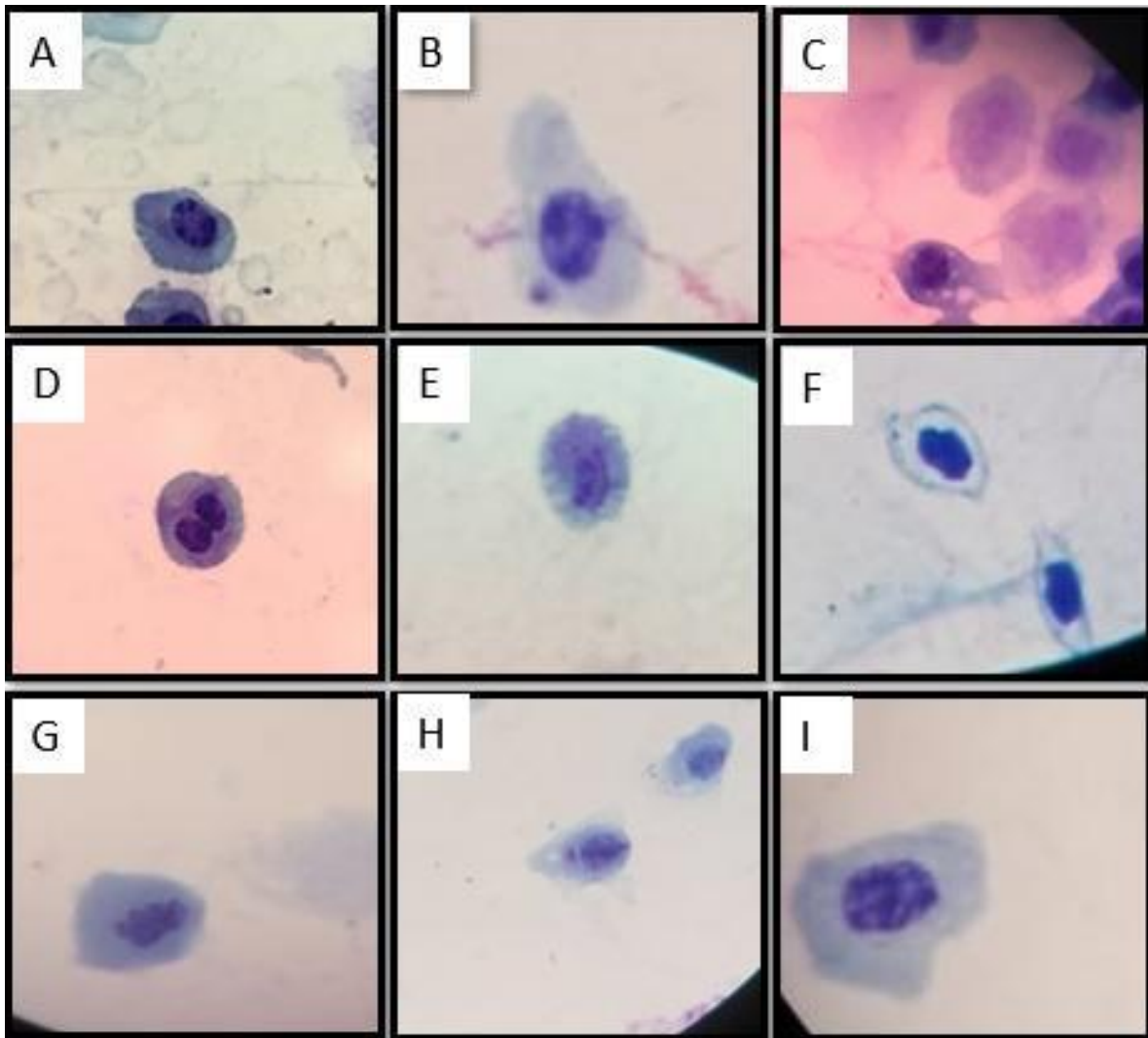


Figura 3 – Eritrócitos de girinos de *Leptodactylus luctator* mostrando anormalidades nucleares. A = Micronúcleo; B = Célula anucleada; C = Célula binucleada; D = Núcleo entalhado; E = Bolha ou broto nuclear; F = Núcleo lobado; G = Cariólise; H = Apoptose.

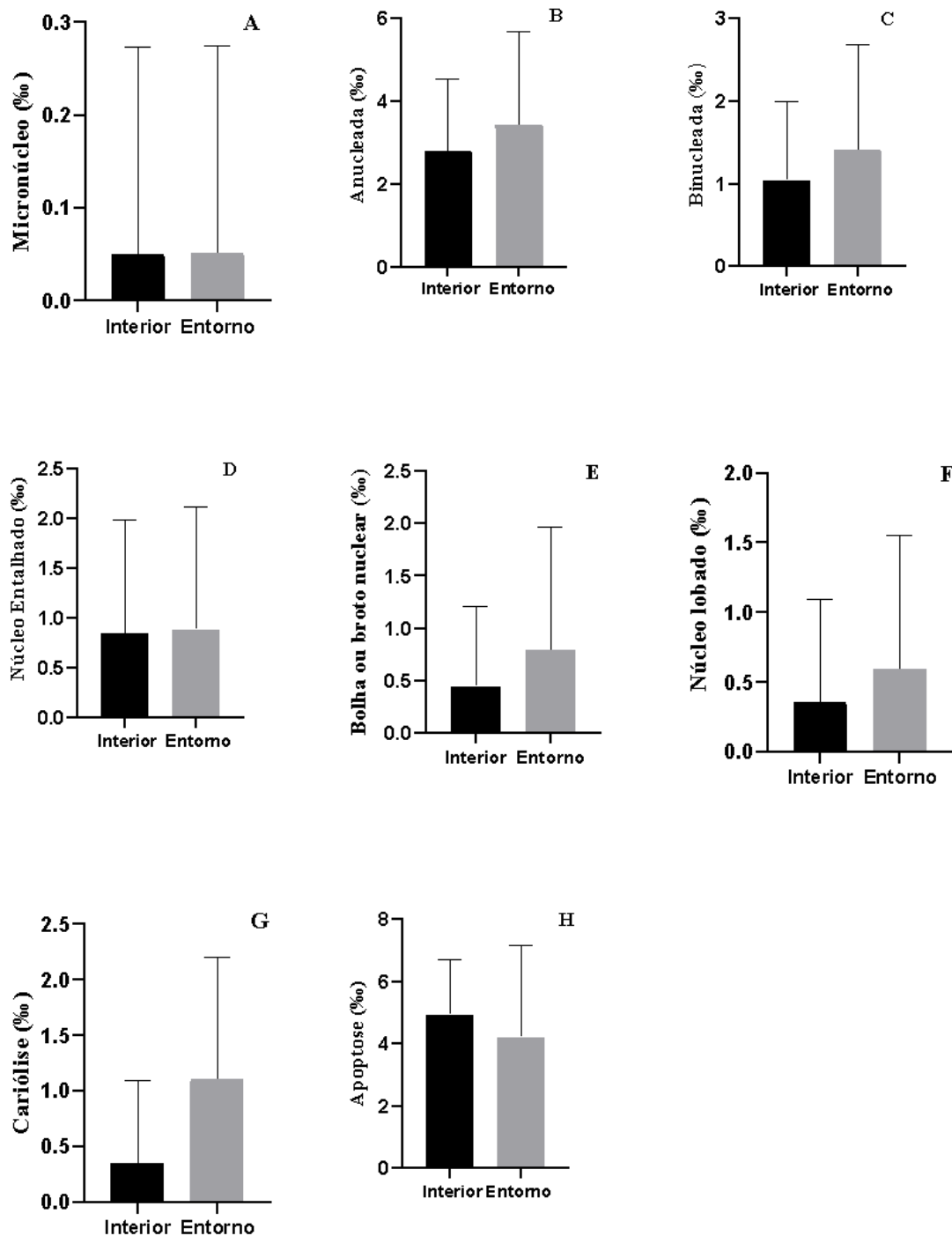


Figura 4 – Micronúcleo e Anormalidades nucleares nos eritrócitos registrados em girinos de *Leptodactylus luctator* no Parque Estadual do Turvo, Derrubadas, RS. A = Célula normal; B = Micronúcleo; C = Célula anucleada; D = Célula binucleada; E = Núcleo entalhado; F = Bolha ou broto nuclear; G = Núcleo lobado; H = Cariólise; I = Apoptose. Barras representam média \pm desvio padrão ($n = 15$). Asterisco (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$), entre interior e entorno do PET, pelo teste de Mann-Whitney. Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

5 DISCUSSÃO

Anfíbios são animais sensíveis a alterações em seu ambiente, especialmente à poluição e fragmentação, principalmente por viverem na interface de dois ambientes – terra e água –, onde podem facilmente absorver poluentes pela pele. Por esse motivo, experimentos *in situ* são complexos e podem indicar a susceptibilidade desses animais. Neste estudo, o primeiro passo é analisar a sobrevivência, que foi extremamente baixa. Já havia sido demonstrado em laboratório que girinos dessa espécie respondem a toxicidade de agrotóxicos (AGOSTINI et al., 2020; PAVAN et al., 2021; SILVA et al., 2021; SAMOJEDEN et al., 2022), e agora sabemos que esse grupo também é sensível a mudanças em seu hábitat natural, ou seja, em ambientes lânticos.

A água das lagoas do interior e do entorno do PET foram diferentes, apresentando menores valores de temperatura, turbidez e oxigênio dissolvido no ambiente do interior em relação ao entorno. Os agrotóxicos foram encontrados em baixa quantidade, porém com maior ocorrência em no entorno do PET. Seria esperado que houvesse maior mortalidade nas lagoas fora do parque, porém essa ocorreu em ambos os ambientes – com maior sobrevivência no entorno. Provavelmente, o fato de ter sido observado mais girinos vivos ao final do experimento nas lagoas do entorno pode estar associado ao fato de *L. luctator* ser uma espécie generalista, mas possivelmente se adaptar melhor em ambientes abertos (BRITO & COSTA, 2022). Assim como demonstrado por Saccol et al. (2022), espécies generalistas podem ser persistentes e dominantes em áreas agrícolas. Outra resposta seria a época em que o experimento foi conduzido, no final do mês de março, que representa o final do período reprodutivo da espécie na região, sendo que a reprodução dessa espécie normalmente ocorre entre os meses de novembro e fevereiro, na estação do verão (KWET et al., 2010) e, portanto, as desovas utilizadas seriam as últimas desta estação.

Entre os girinos que sobreviveram, os que se desenvolveram nas lagoas do entorno apresentaram maior crescimento, tanto em comprimento quanto em massa. Os anfíbios são animais ectotérmicos, portanto sua regulação corporal e suas funções metabólicas são dependentes da temperatura do meio (WELLS, 2007). Assim, a temperatura mais elevada pode ter estimulado a maior movimentação e alimentação, favorecendo o crescimento dos indivíduos. Braga e Lima (2001) verificaram que a espécie exótica *Lithobates castebeianus* teve um maior consumo de alimento e maior ganho de massa em temperaturas mais elevadas, em relação às temperaturas mais baixas. Por outro lado, as espécies nativas *Pleurodema diplolister* e *Rhinella granulosa*, que utilizam poças temporárias para a reprodução, apresentaram

respostas distintas em relação à mesma temperatura (30°C), onde girinos de *P. diplolister* apresentaram redução no crescimento, enquanto que girinos de *R. granulosa* aumentaram seu tamanho corporal nas mesmas condições (MACIEL e JUNCA, 2009). Ainda, a influência da temperatura associada à presença de agrotóxicos poderia ter interferido no tamanho do corpo, como já demonstrado anteriormente, onde o tebutiuron influenciou a metamorfose de girinos de *Lithobates catesbeianus* (GROTT et al., 2022). Os autores verificaram que o herbicida, em concentrações ambientalmente realistas, é capaz de interromper a tireoidogênese de girinos de *L. catesbeianus* e que, associado à temperatura de 25°C, a metamorfose foi acelerada, enquanto o herbicida associado à temperatura de 32 °C atrasou a metamorfose dos girinos, causando perdas consideráveis de massa corporal (GROTT et al., 2022). Scaramella et al. (2022) verificou que girinos de *Rana arvalis*, independentemente de serem provenientes de populações de ambiente ácido ou neutro, foram menos ativos no pH ácido, porém com maiores níveis de corticosterona nos indivíduos provenientes de ambiente ácido e cultivados em ambiente ácido. Todos esses resultados indicam que as espécies de anfíbios podem possuir uma plasticidade comportamental e hormonal de acordo com as características da água.

A questão dos agrotóxicos é complexa e, apesar de em baixa concentração, foi registrada a presença de resíduos de agrotóxicos em ambos os ambientes, com detecção de azoxistrobina (0,022 µg L⁻¹) e imidacloprido (0,028µg L⁻¹) no entorno do PET. Em um estudo anterior realizado em riachos no PET foi registrada a presença de 28 agrotóxicos em diferentes lagoas (ROCHA et al., 2020). Nesse estudo, os autores afirmaram que a floresta reduz em 2,7 vezes a entrada de agroquímicos de culturas agrícolas adjacentes, o que concorda com os resultados aqui apresentados, pois no interior do PET, embora tenham sido observados resíduos, os mesmos ficaram abaixo do limite de detecção. Outra questão interessante na diferença entre esse estudo e o de Rocha et al., (2020) é que azoxistrobina e imidacloprido não foram detectados nos riachos, mas somente nas lagoas e essa informação ainda precisa ser melhor analisada em futuros trabalhos. A azoxistrobina é da classe das estrobilurinas (AGROLINK, 2022), a qual atua inibindo a oxidação do ubiquinol da mitocôndria, reduzindo a fosforilação oxidativa e diminuindo a produção de ATP, uma molécula importante fisiologicamente dentro da célula (KOEHLER e SHEW, 2018). O imidacloprido apresenta uma toxicidade seletiva sendo classificado como carcinógeno do “Grupo E”, não ocorrendo evidência de carcinogenicidade em humanos (EPA, 2003). Inseticidas neonicotinóides como o imidacloprido atuam como receptores nicotínicos de acetilcolina de insetos, que desempenham papel na transmissão sináptica no sistema nervoso (DI MUCCIO et al., 2006), causando alguns efeitos como irritação gastrointestinal, sintomas neurológicos graves, podendo levar a morte (MIKOLIĆ E

KARAČONJI, 2018). A baixa detecção de agrotóxicos nos ambientes lênticos estudados pode estar associada ao experimento ter sido realizado em período entressafra, com um intervalo longo da última aplicação de agrotóxicos nas áreas agrícolas próximas ao entorno do PET. Agostini et al. (2020) observou altos níveis após 24 e 48 h da aplicação dos agrotóxicos, o que reduziu significativamente a sobrevivência de indivíduos de quatro espécies nativas de anfíbios, incluindo *L. luctator*, em lagoas localizadas nos pampas da Argentina central.

A análise de micronúcleos (MNs) e outras diferentes ANEs, nos girinos criados tanto das lagoas do interior quanto das do entorno do PET, demonstrou a presença dessas anormalidades nas células do sangue, embora as diferenças não tenham sido significativas quando os dois ambientes foram comparados. Os MNs são pequenos fragmentos de cromatina intracitoplasmática que surgem a partir de quebras cromossômicas ou cromossomos inteiros, após a ação de substâncias potencialmente causadoras de mutações (GAUTHIER et al., 1993; LAJMANOVICH et al., 2005). O surgimento dos micronúcleos é caracterizado por uma falha na divisão mitótica durante a anáfase, no processo de divisão celular, podendo ocorrer alterações onde as cromátides onde os fragmentos cromossômicos acêntricos (efeito clastogênico) não são transportados pelas fibras do fuso para os pólos opostos, não sendo incluídas no núcleo das células filhas (OBIAKOR et al., 2012). A formação dos micronúcleos inclui erros no processo de reparação de danos na quebra de moléculas de DNA, falhas na segregação cromossômica, falhas na ligação, captura e transporte dos cromossomos e falhas no fuso mitótico, resultando em fraca ligação cromossômica (FENECH et al., 2011). Assim, as frequências de MNs têm sido consideradas índices confiáveis tanto de quebra quanto de perda cromossômica (NORPPA & FALCK., 2003; NÜSSE et al., 1996; LAJMANOVICH et al., 2005). A presença de MNs tem sido amplamente verificada em anfíbios em contato com agrotóxicos, como em *Hyla pulchella* expostos ao endossulfan (LAJMANOVICH et al., 2005), e *L. luctator* expostos ao glyphosate+2,4-D (PAVAN et al., 2021) e ao imidacloprido (SAMOJEDEN et al., 2022).

No estudo de Rocha et al. (2020) também foi analisada a presença de micronúcleos em girinos em ambiente natural. Os autores avaliaram *Boana curupi* e *Crossodactylus schmidtii* em riachos, e relacionaram a presença de danos cromossômicos com agrotóxicos e raios ultravioletas. O número de micronúcleos encontrados nos girinos dessas espécies nos riachos mais de interior do parque é próximo ao registrado em *L. luctator* no presente experimento. É possível que os micronúcleos tenham maior relação com a exposição ultravioleta do que ao próprio agrotóxico, já que *L. luctator* no experimento estavam protegidos desse fator, mas não os girinos de *B. curupi* e *C. schmidtii* analisados por Rocha et al. (2020). Como poucos estudos

fizeram a relação de mais de uma causa, ainda são necessários mais estudos *in situ* com anfíbios para elucidar os danos cromossômicos.

Outras ANEs identificadas nos núcleos das células também são importantes indicativos da integridade do DNA em anfíbios. Algumas células, com bloqueio da citocinese, são chamadas de células binucleadas (ÇAVAS & GOZUKARA, 2005). Já o broto nuclear é semelhante ao micronúcleo (PRIETO et al., 2008) e são bolhas tendo a mesma citomorfologia nuclear (BORGES et al., 2019). Os núcleos lobados podem representar um precursor de formação de MNs (HARABAWY & MOSLEH, 2014) e as células anucleadas podem representar um mecanismo que aumenta a eficiência de transporte de oxigênio (GLOMSKI et al., 1997) em locais com água poluída (BARNI et al., 2007). Ainda, a apoptose desempenha um papel de regulação no número de células durante o processo de desenvolvimento e homeostase do tecido (KIECHLE & ZHANG, 2002) e os núcleos entalhados são vacúolos anormais de uma profundidade apreciável (ARCAUTE et al., 2014).

Danos celulares podem ser causados por diversos fatores externos, como o aumento da fragmentação florestal (CUSHMAN, 2006). A formação do micronúcleo ocorre principalmente por variações ambientais ou pela presença de agentes contaminantes no ambiente (FENECH, 2003). A formação de MNs e ANEs são importantes para avaliar danos cromossômicos que podem levar à indução de morte celular em anfíbios (PÉREZ-IGLESIAS et al., 2015; SCHUCH et al., 2015; GETELINA et al., 2022). Embora os resultados de ANEs registrados em *L. lucifera* não tenham sido diferentes entre os ambientes de interior e entorno do PET, esses dados são importantes para comparações futuras, e para subsidiar delineamentos experimentais mais eficientes, que possam responder os efeitos resultantes da fragmentação e/ou contaminação por agrotóxicos nesses animais.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Existe um crescente número de trabalhos realizados nos últimos anos sobre o efeito de agrotóxicos em diferentes espécies de anfíbios, no entanto ainda são escassos trabalhos *in situ*, os quais demonstram de maneira mais realista as condições toxicológicas dos ambientes locais. Os estudos publicados sobre efeitos de agrotóxicos em anfíbios demonstram ocorrência de malformações, alterações no desenvolvimento, redução da atividade natatória e redução na sobrevivência das espécies de anuros expostos a esses produtos. A temperatura e outros fatores físico/químico da água também podem interferir no desenvolvimento dos anfíbios. Apesar de

não verificarmos efeitos dos agrotóxicos sobre a sobrevivência e alterações genotóxicas em indivíduos de *L. luctator*, foi possível observar que os parâmetros da qualidade da água e a própria espécie utilizada são importantes na avaliação de experimentos *in situ*. A presença de alterações genotóxicas foram verificadas tanto no interior quanto no entorno do PET. Porém, novos experimentos são importantes e necessários, tanto com espécies generalistas quanto não generalistas, para se verificar os efeitos dos ambientes preservados e antropizados no desenvolvimento de diferentes espécies de anfíbios, principalmente em áreas próximas a cultivos agrícolas onde a presença de agrotóxicos pode ser um fator relevante.

REFERÊNCIAS

ADAMS, E.; LEEB, C.; BRÜHL, C. A. Pesticide exposure affects reproductive capacity of common toads (*Bufo bufo*) in a viticultural landscape. **Ecotoxicology**, v. 30, n. 2, p. 213-223, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10646-020-02335-9>.

AGOSTINI, M.G.; ROESLER, I.; BONETTO, C.; RONCO, A.E.; BILENCA, D. Pesticides in the real world: The consequences of GMO-based intensive agriculture on native amphibians. **Biological Conservation**, v. 241, p. 108355, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.108355>.

AGROLINK. **Bula Azoxistrobina** [2022]. Disponível em: https://www.agrolink.com.br/agrolinkfito/produto/amistar-500-wg_7485.html. Acesso em: 26 dez. 2022.

AMPHIBIAWEB. **Current number of amphibian species in our database** [University of California, Berkeley, CA, USA, 2023]. Disponível em: <https://amphibiaweb.org/>. Acesso em: 16 jan. 2023.

ARCAUTE, C. R.; PÉREZ-IGLESIAS, J. M.; NIKOLOFF, N.; NATALE, G.S.; SOLONESKI, S.; LARRAMENDY, M. L. Genotoxicity evaluation of the insecticide imidaclopridon 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. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2014.05.034>.

ASCOLI-MORRETE, T.; BANDEIRA, N. M. G.; SIGNOR, E.; GAZOLA, H. A.; HOMRICH, I. S.; BIONDO, R.; ROSSATO-GRANDO, L. G.; ZANELLA, N. Bioaccumulation of pesticides and genotoxicity in anurans from southern Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, p. 45549-45559, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-022-19042-z>.

ATKINS, J. B.; REISZ, R. R.; MADDIN, H. C. Braincase simplification and the origin of lissamphibians. **PLoS One**, v. 14, n. 3, p. e0213694, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213694>.

ATTADEMO, A. M.; PELTZER, P. M.; LAJMANOVICH, R. C.; CABAGNA-ZENKLUSEN, M. C.; JUNGES, C. M.; BASSO, A. Biological endpoints, enzyme activities, and blood cell parameters in two anuran tadpole species in rice agroecosystems of mid-eastern Argentina. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 186, p. 635-649, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10661-013-3404-z>.

BARNI, S.; BONCOMPAGNI, E.; GROSSO, A.; BERTONE, V.; FREITAS, I.; FASOLA, M.; FENOGLIO, C. Evaluation of *Rana snk esculenta* blood cell response to chemical stressors in the environment during the larval and adult phases. **Aquatic Toxicology**, v. 81, n. 1, p. 45-54, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.10.012>.

BERNARDE, P. S. **Anfíbios e Répteis Introdução ao Estudo da Herpetofauna Brasileira**. Curitiba: Anolisbooks, 2012. 320 p. ISBN 9788565622004.

BORGES, R. E.; SANTOS, L. R. D.; BENVINDO-SOUZA, M.; MODESTO, R. S.; ASSIS, R. A.; DE OLIVEIRA, C. Genotoxic evaluation in tadpoles associated with agriculture in the central Cerrado, Brazil. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 77, n. 1, p. 22-28, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00244-019-00623-y>.

BRAGA, L. G. T.; LIMA, S. L. Influência da temperatura ambiente no desempenho da rã-touro, *Rana catesbeiana* (Shaw, 1802) na fase de recria. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 6, p. 1659-1663, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982001000700001>.

BRASIL. **Lei nº 12.651, de 25 de maio de 2012**. Dispõe sobre a proteção da vegetação nativa e dá outras providências. Brasília, DF: Presidência da República, [2012]. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2011-2014/2012/lei/112651.htm. Acesso em: 19 mar. 2020.

BRITO, W. J. B.; COSTA, R. D. L. Niche partitioning between species of the Leptodactylidae family: a brief account of siblings. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 3, p. e37111326826, 2022. DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i3.26826>.

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, n. 11, p. 2123-2136, 1990. DOI: <https://doi.org/10.1139/f90-237>.

ÇAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. **Aquatic Toxicology**, v. 74, n. 3, p. 264-271, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.06.001>.

CUSHMAN, S. Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: A review and prospectus. **Biological Conservation**, v. 128, n. 2, p. 231-240, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.09.031>.

DE LIMA, R. A. F.; OLIVEIRA, A. A.; PITTA, G. R.; DE GASPER, A. L.; VIBRANS, A. C.; CHAVE, J.; STEEGE, H. t.; PRADO, P. I. The erosion of biodiversity and biomass in the Atlantic Forest biodiversity hotspot. **Nature Communications**, v. 11, p. 6347, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20217-w>.

DI MUCCIO, A.; FIDENTE, P.; BARBINI, D. A.; DOMMARCO, R.; SECCIA, S.; MORRICA, P. Application of solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry to the determination of neonicotinoid pesticide residues in fruit and vegetables.

Journal of Chromatography A, v. 1108, n. 1, p. 1-6, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.12.111>.

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

DONATO, F. F.; MARTINS, M. L.; MUNARETTO, J. S.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Development of a multiresidue method for pesticide analysis in drinking water by solid phase extraction and determination by gas and liquid chromatography with triple quadrupole tandem mass spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 10, p. 2077-2087, 2015. DOI: <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150192>.

DYCK, A.; ROBINSON, S. A.; YOUNG, S. D.; RENAUD, J. B.; SABOURIN, L.; LAPEN, D. R.; PICK, F. R. The effects of ditch management in agroecosystems on embryonic and tadpole survival, growth, and development of northern leopard frogs (*Lithobates pipiens*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 81, n. 1, p. 107-122, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00244-021-00836-0>.

EDGE, C.; THOMPSON, D.; HAO C.; HOULAHAN J. The response of amphibian larvae to exposure to a glyphosate-based herbicide (Roundup WeatherMax) and nutrient enrichment in an ecosystem experiment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 109, p. 124-132, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.07.040>.

EISENLOHR, P. V.; DE OLIVEIRA-FILHO, A. T.; PRADO, J. The Brazilian Atlantic Forest: new findings, challenges and prospects in a shrinking hotspot. **Biodiversity and Conservation**, v. 24, p. 2129-2133, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10531-015-0995-4>.

EPA - US Environmental Protection Agency. **Imidacloprid; Pesticide tolerances**. 22245–52. Washington (DC): US EPA; 2003.

FENECH, M.; CHANG, W. P.; KIRSCH-VOLDERS, M.; HOLLAND, N.; BONASSI, S.; ZEIGER, E.; HUman MicronNucleus project. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. **Mutation Research**, v. 534, n. 1-2, p. 65-75, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1383-5718\(02\)00249-8](https://doi.org/10.1016/s1383-5718(02)00249-8).

FENECH, M.; KIRSCH-VOLDERS, M.; NATARAJAN, A. T.; SURRALLES, 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: <https://doi.org/10.1093/mutage/geq052>.

FROST, R. **Amphibian Species of the World: An online reference**. [American Museum of Natural History, New York, USA, 2022]. Versão 6.1. Disponível em: <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.php>. Acesso em: 26 dez. 2022.

GAUTHIER, L.; VAN DER GAAG, M. A.; L'HARIDON, J.; FERRIER, V.; FERNANDEZ, M. In vivo detection of waste water and industrial effluent genotoxicity: use of the Newt Micronucleus Test (Jaylet Test). **The Science of the Total Environment**, v. 138, n. 1-3, p. 249-269, 1993. DOI: [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(93\)90419-7](https://doi.org/10.1016/0048-9697(93)90419-7).

GETELINA, M. A.; SCHWANTES, J. B.; GRAICHEN, D. A. S.; SCHUCH, A. P. Influence of anthropogenic pressure on the genetic diversity and chromosomal instability of an

endangered forest-specialist anuran. **Hydrobiologia**, v. 849, p. 2463-2475, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10750-022-04840-w>.

GLOMSKI, C. A.; TANBURLIN, J.; HARD, R.; CHAINAMI, M. The phylogenetic odyssey of the erythrocyte. IV. The amphibians. **Histology and Histopathology**, v. 12, n. 1, p. 147-170, 1997.

GONÇALVES, M. W.; DE CAMPOS, C. B. M.; GODOY, F. R.; GAMBALÉ, P. G.; NUNES, H. F.; NOMURA, F.; BASTOS, R. P.; DA CRUZ, A. D.; DE MELO E SILVA, D. Assessing genotoxicity and mutagenicity of three common amphibian species inhabiting agroecosystem environment. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 77, p. 409-420, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00244-019-00647-4>.

GOSNER K. L. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. **Herpetologica**, v. 16, n. 3, p. 183-190, 1960.

GROTT, S. C.; ISRAEL, N.; LIMA, D.; BITSCHINSKI, D.; ABEL, G.; ALVES, T. C.; SILVA, E. B.; ALBUQUERQUE, C. A. C.; MATTOS, J. J.; BAINY, A. C. D.; ALMEIRA, E. A. Influence of temperature on growth, development and thyroid metabolism of American bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*) exposed to the herbicide tebuthiuron. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 94, p. 103910, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2022.103910>.

HADDAD, C. F. B.; TOLEDO, L. F.; PRADO, C. P. A.; LOEBMANN, D.; GASPARINI, J. L.; SAZIMA, I. **Guia de Anfíbios da Mata Atlântica: diversidade e biologia**. São Paulo: Anolisbooks, 2013. 544 p. ISBN 9788565622035.

HARABAWY, A. S. A.; MOSLEH, Y. Y. I. The role of vitamins A, C, E and selenium as antioxidants against genotoxicity and cytotoxicity of cadmium, copper, lead and zinc on erythrocytes of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 104, p. 28-35, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.02.015>.

HARTMANN, M. T.; HARTMANN, P. A.; MÜLLER, C. Pesticide effects on tadpole's survival. In: ALMEIDA, E. A.; FREITAS, J. S. (eds.) **Toxicology of amphibian tadpoles**. Boca Raton: CRC Press, 2023. cap. 11, p. 1-20. (in press)

HEREK, J. S.; VARGAS, L.; TRINDADE, S. A. R.; RUTKOSKI, C. F.; MACAGNAN, N.; HARTMANN, P. A.; HARTMANN, M. T. Genotoxic effects of glyphosate on *Physalaemus* tadpoles. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 81, p. 103516, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103516>.

HUDSON, W. H. **The Naturalist in La Plata**. London: Chapman and Hall. 1892. 258 p.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Manual Técnico da Vegetação Brasileira: sistema fitogeográfico, inventário das formações florestais e campestres, técnicas e manejo de coleções botânicas, procedimentos para mapeamentos**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2012. 2. ed., 275 p. ISBN 978-85-240-4272-0.

IOP, S.; CALDART, V. M.; DOS SANTOS, T. G.; CECHIN, S. Z. Anurans of Turvo State Park: Testing the validity of Seasonal Forest as a new biome in Brazil. **Journal of Natural History**, v. 45, n. 39-40, p. 2443-2461, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1080/00222933.2011.596951>.

IOP, S.; CALDART, V. M.; DOS SANTOS, T. G.; CECHIN, S. Z. What is the role of heterogeneity and spatial autocorrelation of ponds in the organization of frog communities in Southern Brazil?. **Zoological Studies**, v. 51, n. 7, p. 1094-1104, 2012.

IUCN. **The IUCN Red List of Threatened Species**. Versão 2020-1. [2020]. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org>. Acesso em: 19 mar. 2020.

KIECHLE, F. L.; ZHANG, X. Apoptosis: biochemical aspects and clinical applications. **Clinica Chimica Acta**, v. 326, n. 1-2, p. 27-45, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0009-8981\(02\)00297-8](https://doi.org/10.1016/s0009-8981(02)00297-8).

KOEHLER, A.M., SHEW, H.D. Field efficacy and baseline sensitivities of *Septoria steviae* to fungicides used for the management of Septoria leaf spot of stevia. **Crop Protection**, v. 109, p. 95-101, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.03.006>.

KWET, A; LINGNAU, R; DI-BERNARDO, M. Pró-Mata: **Anfíbios da serra gaúcha, sul do Brasil**. University of Tübingen-EdiPUCRS: Pró-Mata. 148p. 2010.

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

LARSEN, E. H.; RAMLØV, H. Role of cutaneous surface fluid in frog osmoregulation **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology**, v. 165, n. 3, p. 365-370, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.04.005>.

LÓPEZ, J. A.; ANTONIAZZI, C. E.; LLANES, R. E.; GHIRARDI, R. Age structure, growth pattern, sexual maturity, and longevity of *Leptodactylus latrans* (Anura: Leptodactylidae) in temperate wetlands. **Amphibia-Reptilia**, v. 38, n. 3, p. 371-379, 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 different pesticide formulations. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 136, p. 84-91, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.10.035>.

MACIEL, T. A.; JUNCÁ, F. A. Effects of temperature and volume of water on the growth and development of tadpoles of *Pleurodema diplolister* and *Rhinella granulosa* (Amphibia: Anura). **Zoologia**, v. 26, n. 3, p. 413-418, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1984-46702009000300005>.

MAGALHÃES, F. M.; LYRA, M. L.; CARVALHO, T. R.; BALDO, D.; BRUSQUETTI, F.; BURELLA, P.; COLLI, G. R.; GEHARA, M. C.; GIARETTA, A. A.; HADDAD, C. F. b.; LANGONE, J. A.; LÓPEZ, J. A.; NAPOLI, M. F.; SANTANA, D. J.; DE SÁ, R. O.; GARDA, A. A. Taxonomic review of South American Butter frogs: phylogeny, geographic patterns, and species delimitation in the *Leptodactylus latrans* species group (Anura: Leptodactylidae). **Herpetological Monographs**, v. 34, p. 131-177, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1655/0733-1347-31.4.131>.

MARTINS, L. A.; KWET, A.; LEMA, T. **Anfíbios do Rio Grande do Sul: Lista sistemática comentada, com distribuição e iconografia das espécies de anfíbios ocorrentes no Rio Grande do Sul, Brasil, registradas até 2013**. Porto Alegre: EdiPUCRS, 2015.

MIKOLIĆ, A.; KARAČONJI, I. B. Imidacloprid as reproductive toxicant and endocrine

disruptor: investigations in laboratory animals. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, v. 69, n. 2, p. 103-108, 2018. DOI: <https://doi.org/10.2478/aiht-2018-69-3144>.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1038/35002501>.

NORPPA, G. C.; Falck, G; C.-M. What do human micronuclei contain? **Mutagenesis**, v. 18, n. 3., p. 221-233, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1093/mutage/18.3.221>.

NÜSSE, M.; MILLER, B. M.; VIAGGI, S.; GRAWÉ, J. Analysis of the DNA content distribution of micronuclei using flow sorting and fluorescent in situ hybridization with a centromeric DNA probe. **Mutagenesis**, v. 11, n. 4, p. 405-413, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1093/mutage/11.4.405>.

OBIAKOR, M. O.; OKONKWO, J. C.; NNABUDE, P. C.; EZEONYEJIAKU, C. D. Eco-genotoxicology: Micronucleus assay in fish erythrocytes as in situ aquatic pollution biomarker: a Review. **Journal of Animal Science Advances**, v. 2, n. 1, p. 123-133, 2012.

PAVAN, F. A.; SAMOJEDEN, C. G.; RUTKOSKI, C. F.; FOLADOR, A.; FRÉ, S. P.; MÜLLER, C.; HARTMANN, P. A.; HARTMANN, M. T. 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, p. 103637, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2021.103637>.

PÉREZ-IGLESIAS, J. M.; 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 *Boana pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 119, p. 15-24, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.04.045>.

PÉREZ-LUCAS, G.; VELA, N.; EL AATIK, A.; NAVARRO, S. Environmental risk of groundwater pollution by pesticide leaching through the soil profile. pesticides - use and misuse and their impact in the environment. *In*: LARRAMENDY, M.; SOLONESKI, S. (eds.) **Pesticides - use and misuse and their impact in the environment**. London: IntechOpen, 2019. cap. 3, p. 1-27. DOI: <https://doi.org/10.5772/intechopen.82418>.

PRIETO, Z.; LEÓN-INCIO, J.; QUIJANO-JARA, C.; FERNÁNDEZ, R.; POLO-BENITES, E.; VALLEJO-RODRÍGUEZ, R., VILLEGAS-SANCHEZ, L. Efecto genotóxico del dicromato de potasio en eritrocitos de sangre periférica de *Oreochromis niloticus* (Tilapia). **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**, v. 25, n. 1, p. 51-58.

ROCHA, M. C.; SANTOS, M. B.; ZANELLA, R.; PRESTES, O. D.; GONÇALVES, A. S.; SCHUCH, A. P. Preserved riparian forest protects endangered forest-specialists amphibian species against the genotoxic impact of sunlight and agrochemicals. **Biological Conservation**, v. 249, p. 108746, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2020.108746>.

SACCOL, S. S. A.; UCHA, J. L. C. D.; MADALOZZO, B.; CECHIN, S. Z.; SANTOS, T. G. Influence of land use on the diversity of pond-breeding anurans in South Brazilian grasslands. **Biodiversity and Conservation**, v. 31, p. 21–37, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10531-021-02317-1>.

SAMOJEDEN, C. G.; PAVAN, F. A.; RUTKOSKI, C. F.; FOLADOR, A.; FRÉ S. P.; MÜLLER, C.; HARTMANN, P. A.; HARTMANN, M. Toxicity and genotoxicity of

imidacloprid in the tadpoles of *Leptodactylus luctator* and *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leptodactylidae). **Scientific reports**, v. 12, p. 11926, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-16039-z>.

SCARAMELLA, N.; MAUSBACH, J.; LAURILA, A.; RÄSÄNEN, K. Short-term responses of *Rana arvalis* tadpoles to pH and predator stress: adaptive divergence in behavioural and physiological plasticity? **Journal of Comparative Physiology B**, v. 192, p. 669–682, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00360-022-01449-2>.

SCHUCH, A. P.; SANTOS, M. B.; LIPINSKI, V. M.; PERES, L. V.; SANTOS, C. P.; CECHIN, S. Z.; SCHUCH, N. J.; PINHEIRO, D. K.; LORETO, E. L. S. Identification of influential events concerning the Antarctic ozone hole over southern Brazil and the biological effects induced by UVB and UVA radiation in an endemic treefrog species. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 118, p. 190-198, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.04.029>.

SEMA - Secretaria do Meio Ambiente. **Plano de manejo do Parque Estadual do Turvo - RS**. Porto Alegre: Divisão de Unidades de Conservação do Estado do Rio Grande do Sul, 2005. 355p. Disponível em: <https://www.sema.rs.gov.br/upload/arquivos/201610/24172430-plano-manejo-peturvo.pdf>. Acesso em 19 mar. 2020.

SIGURDSEN, T.; GREEN, D. M. The origin of modern amphibians: a re-evaluation. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 162, n. 2, p. 457-469, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.2010.00683.x>.

SILVA, F. L.; PRADO, I. S.; FRAGA, R. E.; ROCHA, M. A.; JUNCÁ, F. A.; SILVA, M. B. Swimming ability in tadpoles of *Physalaemus cf. cuvieri*, *Scinax x-signatus* and *Leptodactylus latrans* (amphibia: anura) exposed to the insecticide chlorpyrifos. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 16, n. 1, p. 13-18, 2021. DOI: <https://doi.org/10.5132/eec.2021.01.02>.

SMALLING, K. L.; REEVES, R.; MUTHS, E.; VANDEVER, M.; BATTAGLIN, W. A.; HLADIK, M. L.; PIERCE, C. L. Pesticide concentrations in frog tissue and wetland habitats in a landscape dominated by agriculture. **Science of The Total Environment**, v. 502, p. 80-90, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.08.114>.

SPADOTTO, C. A.; GOMES, M. A. F.; LUCHINI, L. C.; ANDRÉA, M. M. **Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações**. São Paulo: Embrapa Meio Ambiente, 2004. 29 p. (Documentos 42). ISSN 1516-4691. Disponível em: https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPMA/5810/1/documentos_42.pdf. Acesso em 19 mar. 2020.

SPARLING, D. W.; BICKHAM, J.; COWMAN, D.; FELLERS, G. M.; LACHER, T.; MATSON, C. W.; McCONNELL, L. In situ effects of pesticides on amphibians in the Sierra Nevada. **Ecotoxicology**, v. 24, n. 2, p. 262-278, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10646-014-1375-7>.

WELLS, K. **The ecology and behavior of amphibians**. Chicago: University of Chicago Press. 2007. ISBN: 9780226893334.


WOLTER, J. H.; MASCARENHAS, C. S.; CHAVIEL, B. M.; HENZEL, A. B. D.; SILVA, R. R. C.; LIRA, F.; MÜLLER, G. *Hannemania* sp. larvae (Acari: Leeuwenhoekiidae) in

Leptodactylus luctator (Anura: Leptodactylidae) in the Pampa biome, southern Brazil.
Cuadernos de Herpetología, v. 36, n. 1, p. 5-10, 2022.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Apesar do crescente número de trabalhos realizados nos últimos anos sobre o efeito de agrotóxicos em diferentes espécies de anfíbios, ainda são escassos trabalhos *in situ*, os quais demonstram de maneira mais realista as condições toxicológicas dos ambientes locais.
- Apesar da quantidade pequena de trabalhos em relação ao número de espécies de anfíbios existentes e a quantidade de agrotóxicos utilizados nos cultivos agrícolas, é possível verificar a extensa ocorrência de malformações, alterações no desenvolvimento, redução da atividade natatória e redução na sobrevivência das espécies de anuros expostos a esses produtos.
- A presença de micronúcleo e alterações nucleares nos eritrócitos são importantes biomarcadores de agrotóxicos em espécies de anfíbios, os quais indicam o potencial genotóxico ambiental.
- Anfíbios são bons bioindicadores para a avaliação de ambientes aquáticos contaminados por agrotóxicos pois fornecem informações relevantes sobre as possíveis consequências ocasionadas por esses químicos no ambiente.
- *L. luctator* é uma espécie generalista de habitats, o que facilita o uso da espécie em estudos comparativos de habitats. No entanto, outras espécies mais sensíveis são importantes de serem avaliadas em estudos futuros.


ANEXO I



LARP
LABORATÓRIO DE ANÁLISE
DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS

LARP – LABORATÓRIO DE ANÁLISE DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS

Campus UFSM- Rua E, Prédio 13D-LARP, CEP 97 105-900, Camobi, Santa Maria, RS Fone: (055) 3220-8011 e-mail: larp@ufsm.br



Universidade Federal de Santa Maria
1960

RELATÓRIO DE ENSAIO

Cliente: Geverton Marion
CPF/CNPJ: 009 223 320-10
Endereço: Rua Tenente Portella, nº 604 – Apto. 101, bairro Centro, 98.400-000, Frederico Westphalen/RS

Tipo de amostra: Água
Data do recebimento da amostra: 12/05/2022 **Data da análise:** 20/05/2022
Método utilizado: Determinação de Resíduos de Pesticidas empregando Extração em Fase Sólida (SPE) e LC-MS/MS
Procedimento: POP 113 rev.05

| COMPOSTOS ANALISADOS | LOD (µg L ⁻¹) | LOQ (µg L ⁻¹) |
|--|------------------------------|------------------------------|
| Ametrina, azoxistrobina, carbanil, carbofurano, cianazina, clomazona, clorimurrom-etílico, clorpirifós-etílico, cresoxim-metílico, difenoconazol, dimetoato, epoxiconazol, etoxisulfurom, fenamidona, fentiona, flutolanil, imazamoxi, imazapique, imazapir, imazaquim, imazetapir, imidacloprido, metalaxil, metconazol, metsulfurom-metílico, monolinuron, nicosulfurom, penoxsulam, piraclostrobina, pirimifós-metílico, profenofós, propanil, propiconazol, propoxur, quincloraque, saflufenacil, simazina, sulfometurom-metílico, tebuconazol, terbutilazina, tetraconazol, tiabendazol, tiametoxam, tiobencarbe, tolclofós-metílico, triciclazol | 0,006 | 0,020 |
| Atrazina, carbendazim, diurom, linurom, quizalofop-p-etílico | 0,012 | 0,040 |
| Carbofurano-3-hidróxido, fluoxipir, molinato, pirazosulfurom-etílico | 0,024 | 0,080 |

LOD = Limite de detecção do método; LOQ = Limite de quantificação do método.

RESULTADOS

RELATÓRIO DE ENSAIO Nº 2616-II /LARP – Página 1/2


LARP – LABORATÓRIO DE ANÁLISE DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS

 Campus UFSM, Rua E, Prédio 13D-LARP, CEP 97.105-900, Camobi, Santa Maria, RS Fone: (055) 3220-8011 e-mail: larp@ufsm.br

RELATÓRIO DE ENSAIO

| Código LARP | 2616-08 | 2616-09 | 2616-10 | 2616-11 |
|---|------------------------------------|---------|---------|---------|
| Identificação pelo cliente | 8 | 9 | 10 | 11 |
| Compostos | Concentração (µg L ⁻¹) | | | |
| Atrazina | n.d. | n.d. | < LOQ | n.d. |
| Os compostos analisados que não constam em Resultados não foram detectados (≤ LOD). | | | | |

< LOQ = menor que o LOQ, ou seja, o composto está presente na amostra em nível de concentração que não pode ser quantificado pelo método.
n.d. = não detectado (≤ LOD).

Os resultados são apresentados para as amostras entregues no LARP pelo cliente.

Este documento somente poderá ser reproduzido em sua totalidade. A reprodução parcial requer aprovação do laboratório.

Data de emissão: 07/07/2022

Verificação: Y. A.

Signatário Autorizado
Prof. Dr. Renato Zanella
 CRQ. 5ª REGIÃO REG. 05200599
 LARP - QUÍMICA - UFSM

RELATÓRIO DE ENSAIO

Nº 2616-II /LARP – Página 2/2


LARP – LABORATÓRIO DE ANÁLISE DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS

 Campus UFSM, Rua E, Prédio 13D-LARP, CEP 97.105-900, Camobi, Santa Maria, RS Fone: (055) 3220-8011 e-mail: larp@ufsm.br

RELATÓRIO DE ENSAIO

Cliente: Geverton Marion

CPF/CNPJ: 009.223.320-10

Endereço: Rua Tenente Portella, nº 604 – Apto. 101, bairro Centro, 98.400-000,
Frederico Westphalen/RS

Tipo de amostra: Água

Data do recebimento da amostra: 12/05/2022 Data da análise: 20/05/2022

Método utilizado: Determinação de Resíduos de Pesticidas empregando Extração em Fase Sólida (SPE) e LC-MS/MS

Procedimento: POP 113 rev.05

COMPOSTOS ANALISADOS

| | LOD (µg L ⁻¹) | LOQ (µg L ⁻¹) |
|---|------------------------------|------------------------------|
| Ametrina, azoxistrobina, carbaril, carbofurano, cianazina, clomazona, clorimurum-etílico, clorpirifós-etílico, cresoxim-metílico, difenoconazol, dimetoato, epoxiconazol, etoxisulfurum, fenamidona, fentiona, flutolanil, imazamoxi, imazapique, imazapir, imazaquim, imazetapir, imidacloprido, metalaxil, metconazol, metsulfurum-metílico, monolinuron, nicosulfurum, penoxsulam, piraclostrobina, pirimifós-metílico, profenofós, propanil, propiconazol, propoxur, quincloraque, saflufenacil, simazina, sulfometurum-metílico, tebuconazol, terbutilazina, tetraconazol, tiabendazol, tiametoxam, tiobencarbe, tolclofós-metílico, triciclazol | 0,006 | 0,020 |
| Atrazina, carbendazim, diurom, linurom, quizalofope-p-etílico | 0,012 | 0,040 |
| Carbofurano-3-hidróxido, fluoxipir, molinato, pirazosulfurum-etílico | 0,024 | 0,080 |

LOD = Limite de detecção do método; LOQ = Limite de quantificação do método.

RESULTADOS

RELATÓRIO DE ENSAIO

Nº 2616-I /LARP – Página 1/2



LARP – LABORATÓRIO DE ANÁLISE DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS
 Campus UFSM, Rua E, Prédio 13D-LARP, CEP 97.105-900, Camobi, Santa Maria, RS Fone: (055) 3220-8011 e-mail: larp@ufsm.br



RELATÓRIO DE ENSAIO

| Código LARP | 2616-01 | 2616-02 | 2616-03 | 2616-04 | 2616-05 | 2616-06 | 2616-07 |
|---|------------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Identificação pelo cliente | <u>1</u> | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| Compostos | Concentração (µg L ⁻¹) | | | | | | |
| Azoxistrobina | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 0,022 |
| Clomazona | n.d. | n.d. | < LOQ | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| Clorpirifós | n.d. | n.d. | < LOQ | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| Imidacloprido | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 0,028 |
| Os compostos analisados que não constam em Resultados não foram detectados (≤ LOD). | | | | | | | |

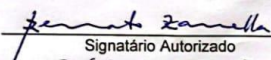
< LOQ = menor que o LOQ, ou seja, o composto está presente na amostra em nível de concentração que não pode ser quantificado pelo método.
 n.d. = não detectado (≤ LOD).

Os resultados são apresentados para as amostras entregues no LARP pelo cliente.

Este documento somente poderá ser reproduzido em sua totalidade. A reprodução parcial requer aprovação do laboratório.

Data de emissão: 07/07/2022

Verificação: K. A.


 Signatário Autorizado
Prof. Dr. Renato Zanella
 CRQ. 5ª REGIÃO REG. 05200599
 LARP - QUÍMICA - UFSM

RELATÓRIO DE ENSAIO

Nº 2616-1 /LARP – Página 2/2