



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

**SILVIA PRICILA DA FRÉ**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO DA EXPOSIÇÃO AGUDA DE  
TRÊS TIPOS DE AGROTÓXICOS EM GIRINOS DE *PHYSALAEMUS GRACILIS*  
(ANURA: LEPTODACTYLIDAE)**

**ERECHIM**

**2021**

**SILVIA PRICILA DA FRÉ**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO DA EXPOSIÇÃO AGUDA DE TRÊS  
TIPOS DE AGROTÓXICOS EM GIRINOS DE *PHYSALAEMUS GRACILIS* (ANURA:  
LEPTODACTYLIDAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação  
apresentado na Universidade Federal da Fronteira Sul -  
UFFS - Campus Erechim, como requisito para a obtenção  
do título de Bacharel em Engenharia Ambiental e  
Sanitária.

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

ERECHIM

2021

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

Fré, Silvia Pricila da  
Avaliação do potencial genotóxico da exposição aguda  
de três tipos de agrotóxicos em girinos de *Physalaemus  
gracilis* (Anura: leptodactylidae) / Silvia Pricila da  
Fré. -- 2021.  
42 f.:il.

Orientadora: Doutora Marília Teresinha Hartmann

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -  
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de  
Bacharelado em Engenharia Ambiental e Sanitária,  
Erechim, RS, 2021.

1. Agrotóxicos. *Physalaemus gracilis*.  
Genotoxicidade. I. Hartmann, Marília Teresinha, orient.  
II. Universidade Federal da Fronteira Sul. III. Título.

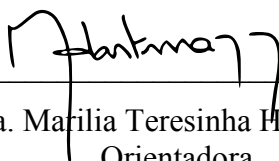
**SILVIA PRICILA DA FRÉ**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO DA EXPOSIÇÃO AGUDA DE TRÊS TIPOS DE AGROTÓXICOS EM GIRINOS DE *PHYSALAEMUS GRACILIS* (ANURA: LEPTODACTYLIDAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado na Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia Ambiental e Sanitária.

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em:

BANCA EXAMINADORA:



---

Prof.ª Dra. Marília Teresinha Hartmann-UFFS  
Orientadora

---

Prof. Dr. Paulo Afonso Hartmann-UFFS  
Professor

---

Me. Camila Fátima Rutkoski-UFFS  
Eng. Ambiental Me. Ciência Tecnologia Ambiental

## **AGRADECIMENTOS**

A elaboração deste trabalho foi possível graças a contribuição de várias pessoas especiais, as quais gostaria de agradecer.

A toda minha família pelo apoio prestado nos momentos difíceis enfrentados ao longo desta caminhada.

A minha orientadora Professora Dr<sup>a</sup> Marília Teresinha Hartmann pelos ensinamentos compartilhados e por todo o auxílio prestado durante o estudo, contribuindo para meu crescimento pessoal e profissional.

A toda equipe do laboratório de Ecologia e Conservação que contribuíram para o andamento do projeto: Alexandre Folador, Caroline Garcia Samojedem, Felipe Pavan e Inete Baú.

A todos os colegas e amigos que fiz durante o curso de Engenharia Ambiental e Sanitária.

Aos professores do curso pelos ensinamentos repassados e dedicação, que contribuíram muito para a formação acadêmica.

A Deus pela força e coragem para enfrentar os desafios que surgiram ao longo do tempo.

## RESUMO

Agrotóxicos são produtos químicos muito utilizados para controle de pragas na produção agrícola. Seu uso pode contaminar ambientes aquáticos, atingindo organismos não-alvo, que quando contaminados podem sofrer mortalidade, mudanças fisiológicas e alterações comportamentais. Neste estudo a toxicidade aguda e os efeitos genotóxicos foram avaliados para três classes de agrotóxicos: herbicida picloram; inseticida imidacloprido; fungicida clorotalonil, em girinos de *Physalaemus gracilis*. O ensaio agudo teve duração de 96 horas e foram utilizados girinos no estágio embrionário 25. O picloram apresentou CL<sub>50</sub> de 15,81 mg.L<sup>-1</sup>, o imidacloprido CL<sub>50</sub> de 69,20 mg.L<sup>-1</sup> e o clorotalonil CL<sub>50</sub> de 0,036 mg.L<sup>-1</sup>. O picloram e o imidacloprido apresentaram baixa toxicidade aguda para *P. gracilis*, já clorotalonil apresentou alta toxicidade aguda e risco ecológico agudo para a espécie. As três formulações testadas induziram um aumento na frequência de micronúcleos em células do sangue dos girinos analisados. Além de micronúcleos outras anormalidades nucleares também foram observadas nas células como: apoptose, binucleada, bolha, cariólise, entalhada e lobada, mostrando que esses compostos tem potencial genotóxico para essa espécie. Este estudo revela os anfíbios como sendo bons bioindicadores da qualidade ambiental apresentando efeitos tóxicos e genotóxicos quando expostos aos agrotóxicos analisados.

**Palavras-chave:** Agrotóxicos. *Physalaemus gracilis*. Toxicidade. Genotóxico.

## ABSTRACT

Pesticides are chemical products widely used to control pests in agricultural production. Their use can contaminate aquatic environments, reaching non-target organisms, which when contaminated can suffer mortality, physiological changes and behavioral alterations. In this study, the acute toxicity and genotoxic effects were evaluated for three classes of pesticides: picloram herbicide; imidacloprid insecticide; chlorothalonil fungicide, in *Physalaemus gracilis* tadpoles. The acute test lasted 96 hours and tadpoles at embryonic stage 25 were used. Picloram had a LC50 of 15.81 mg.L<sup>-1</sup>, imidacloprid a LC50 of 69.20 mg.L<sup>-1</sup> and chlorothalonil a LC50 of 0.036 mg.L<sup>-1</sup>. Picloram and imidacloprid showed low acute toxicity to *P. gracilis*, while chlorothalonil showed high acute toxicity and acute ecological risk to the species. The three formulations tested induced an increase in the frequency of micronuclei in blood cells of the analyzed tadpoles. Besides micronuclei other nuclear abnormalities were also observed in the cells such as: apoptosis, binucleated, blister, karyolysis, notched and lobed, showing that these compounds have genotoxic potential for this species. This study revealed amphibians to be good bioindicators of environmental quality, showing toxic and genotoxic effects when exposed to the analyzed pesticides.

**Keywords:** Agrochemicals. *Physalaemus gracilis*. Toxicity. Genotoxicity.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Girino de <i>Physalaemus gracilis</i> no estágio 25 de Gosner (1960), utilizados no ensaio de toxicidade aguda.....	15
Figura 2 - (A) Coleta das desovas, no lago da Universidade Federal da Fronteira Sul- campus Erechim (B) Desovas na natureza contendo girinos de <i>Physalaemus gracilis</i> .....	16
Figura 3 - Desova de <i>Physalaemus gracilis</i> disposta em aquário de 15 litros no Laboratório de Ecologia e conservação da Universidade Federal da Fronteira Sul, campus Erechim.....	17
Figura 4 - Ensaio de toxicidade aguda com girinos de <i>Physalaemus gracilis</i> no Laboratório de Ecologia e Conservação da UFFS, campus Erechim. (A) picloram; (B) imidacloprido; (C) clorotalonil.....	19
Figura 5 - Mortalidade cumulativa (%) de girinos de <i>Physalaemus gracilis</i> expostos a diferentes concentrações do: (A) picloram). (B) imidacloprido. (C) clorotalonil no ensaio agudo. ....	22
Figura 6 - Micronúcleos detectados em girinos de <i>Physalaemus gracilis</i> expostos a diferentes concentrações de: (A) picloram; (B) imidacloprido; (C) clorotalonil. ....	24
Figura 7 - Micronúcleo e Anormalidades Nucleares de eritrócitos de girinos <i>Physalaemus gracilis</i> expostos ao ensaio agudo. (A) Células com núcleos normais; (B) Célula com Micronúcleo; (C) Células com Apoptose; (D) Célula Binucleada; (E) Célula com Bolha ou Broto Nuclear; (F) Célula com Cariólise; (G) Célula Entalhada; (H) Célula Lobada; .....	25
Figura 8 - Anormalidades Nucleares detectadas em em girinos de <i>Physalaemus gracilis</i> expostos a diferentes concentrações de: (A) picloram; (B) imidacloprido; (C) clorotalonil....	26



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição dos três agrotóxicos utilizados no ensaio agudo. ....	15
Tabela 2 - Mortalidade de girinos <i>Physalaemus gracilis</i> expostos à formulação comercial do, herbicida picloram inseticida imidacloprido e fungicida clorotalonil no ensaio agudo. ....	21
Tabela 3 - Média $\pm$ desvio padrão (mínimo e máximo) de micronúcleos e anormalidades nucleares de eritrócitos (ANE's) em girinos <i>Physalaemus gracilis</i> , encontradas no controle e nas concentrações, após exposição a formulação comercial do herbicida picloram, inseti inseticida imidacloprido e fungicida clorotanol, no ensaio agudo. *Significativo em relação ao controle pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). ....	27
Tabela 4 - Avaliação de risco ecológico agudo para girinos de <i>Physalaemus gracilis</i> expostos aos três agrotóxicos no ensaio agudo. ....	28

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>13</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
<b>3 METODOLOGIA.....</b>	<b>14</b>
3.1 AGROTÓXICOS .....	14
3.2 ORGANISMO –TESTE.....	15
3.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....	17
<b>3.3.1 Ensaio Agudo .....</b>	<b>17</b>
<b>3.3.2 Micronúcleos e Anormalidades Nucleares de Eritrócitos .....</b>	<b>19</b>
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA E RISCO ECOLÓGICO .....	20
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>21</b>
4.1 TOXICIDADE AGUDA .....	21
4.2 MICRONÚCLEOS E ANORMALIDADES NUCLEARES DE ERITRÓCITOS ...	23
4.3 ANÁLISE RISCO ECOLÓGICO .....	28
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>29</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>31</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>32</b>
<b>APÊNDICE A .....</b>	<b>40</b>

## 1 INTRODUÇÃO

No Brasil o consumo de agrotóxicos cresce significativamente devido à grande produção agrícola característica do país (LOPES; ALBUQUERQUE, 2018). Com isso, o uso desses produtos químicos se torna muito presente no cultivo de culturas, para o controle de pragas e doenças nocivas que possam prejudicar a produtividade das plantações (TAVELLA *et al.*, 2011; MOHD FUAD *et al.*, 2012).

Os agrotóxicos possuem uma ampla variedade de funções, sendo utilizados para inibir o crescimento de fungos, insetos, parasitas e plantas daninhas que possam afetar o rendimento de culturas (LUSHCHAK *et al.*, 2018). Em decorrência da alta complexidade, esses compostos podem ser muito persistentes no meio em que estão inseridos (STEFFEN; STEFFEN; ANTONIOLLI, 2011). Quando a molécula de agrotóxico fica retida no solo, a mesma pode ser absorvida pelo sistema radicular das plantas ou lixiviada para camadas mais profundas do solo, podendo atingir águas superficiais por escoamento, prejudicando o desenvolvimento da comunidade aquática existente (REBELO; CALDAS, 2014; BRITTO *et al.*, 2015), afetando direta e indiretamente organismos não-alvo já que esses possuem características fisiológicas e bioquímicas semelhantes aos organismos-alvo (KÖHLER; TRIEBSKORN, 2013).

Há diversas classes de agrotóxicos e as mais utilizadas na agricultura são os herbicidas, inseticidas e os fungicidas (IBAMA, 2019). Os herbicidas são conhecidos como produtos químicos que possuem uma formulação eficaz, econômica e poderosa em termos de custo para controle de ervas daninhas (CELIS *et al.*, 2002). Inseticidas são substâncias químicas utilizadas para o controle de insetos em diferentes fases dos seus ciclos (MOREIRA, 2012) e fungicidas são agentes químicos muito utilizados na prevenção ou eliminação de fungos presentes em plantações ou sementes, classificados de acordo com o modo de aplicação (GUPTA, 2018).

O herbicida picloram, inseticida imidacloprido e o fungicida clorotalonil são produtos químicos muito utilizados no Brasil (BOTELHO *et al.*, 2012; LOPES, 2017; BIZERRA, 2018). No último relatório do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais (IBAMA) o clorotalonil foi o 6º mais vendido no país, imidacloprido o 11º e o picloram ficou 20º lugar, entre 89 princípios ativos (IBAMA, 2019).

Picloram consiste em um herbicida do tipo auxina, sistêmico que atua modificando o metabolismo celular das plantas (CHRISTOFFOLETI *et al.*, 2015), possui elevada persistência no solo, além de alto grau de lixiviação estendendo-se por amplas áreas (D'ANTONINO *et al.*,

2009; LAJMANOVICH *et al.*, 2013), sendo classificado como classe toxicológica I – extremamente tóxico (ANVISA, 2021).

Pode ser aplicado para pastagens, silvicultura e cultivo de grãos (USEPA, 1995). Devido sua alta solubilidade em água, o picloram é transportado para o ambiente aquático, podendo facilmente atingir aquíferos subterrâneos expondo os organismos não-alvo dessa região ao contaminante (ORDAZ-GUILLÉN *et al.*, 2014; TANG *et al.*, 2018).

O imidacloprido é um inseticida neonicotinóide, que age por ação sistêmica, atua diretamente bloqueando os estímulos do sistema nervoso dos insetos (HAYASAKA, *et al.*, 2012; STARNER; GOH, 2012), sendo eficiente em diversas culturas como algodão, arroz, feijão, milho, trigo e soja (ANVISA, 2021). É classificado como classe toxicológica III – Moderadamente tóxico (ANVISA, 2021).

Se caracteriza por alta persistência no solo, alto potencial de lixiviação e escoamento em águas superficiais, causando efeitos adversos em organismos não-alvos, aquáticos e invertebrados (KINDEMBA, 2009; SOUZA; SILVA, 2016; THUNNISSEN *et al.*, 2020). Devido a sua grande eficiência esse inseticida é o mais utilizado no mundo (BADGUJAR *et al.*, 2013; RIOS; WILCOXEN; ZIMMERMAN, 2017; GUIMARÃES, 2020).

Clorotalonil é um composto organoclorado, não sistêmico considerado um excelente fungicida para o controle de pragas devido a sua alta eficiência molecular a qual afeta diretamente a respiração celular dos organismos eucarióticos (MÉNDEZ *et al.*, 2016). É amplamente utilizado em culturas de vegetais, frutas, plantas e gramados (VAN SCOY; TJEERDEMA, 2014), pouco solúvel em água, apresenta elevada persistência e toxidez no solo (LV *et al.*, 2017), devido a sua aplicação direta é facilmente introduzido em ambientes aquáticos, ocasionando danos potenciais aos organismos aquáticos não-alvos (MCMAHON *et al.*, 2012; YU *et al.*, 2013). Esse composto é classificado como classe toxicológica III- Moderadamente tóxico (ANVISA, 2021).

Para entender os efeitos causados por agrotóxicos em animais não-alvo, utilizam-se ensaios ecotoxicológicos como ferramenta de controle e monitoramento ambiental (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008). Para essa análise ecotoxicológica pode ser realizado o ensaio de toxicidade aguda (SILVA *et al.*, 2013). O ensaio agudo é realizado em um curto período de tempo, normalmente de 24 a 96 horas e mede os efeitos mais severos aos organismos, quando submetidos a diferentes concentrações de um contaminante (MOUTINHO, 2013; STANLEY; PREETHA, 2016). Em anfíbios observa-se os efeitos que causam a letalidade desses organismos, obtendo-se como resultado final a concentração letal média que

ocasiona a morte de 50 % da espécie teste (CL<sub>50</sub>) (COSTA; BOTTA; ESPINDOLA, 2008; MASSARO, 2011).

A partir de ensaios ecotoxicológicos é possível avaliar os efeitos mutagênicos e genotóxicos dos agentes químicos, através de análises de micronúcleo celular (GONÇALVES *et al.*, 2010). Micronúcleos podem ser descritos como uma pequena parcela de DNA que não foi totalmente incorporada dentro do núcleo principal durante o processo de divisão celular (LAJMANOVICH *et al.*, 2014). Esse teste baseia-se num aumento da frequência de eritrócitos policromáticos com micronúcleos, utilizando-se para isso células da medula óssea ou sangue periférico dos organismos testes (FLORES; YAMAGUCHI, 2008). O teste de micronúcleo é simples, sensível e confiável e fornece um resultado imediato para o exame de danos genéticos causados pela presença de compostos químicos em um determinado ambiente (POLLO *et al.*, 2015).

Juntamente com o micronúcleo, outras anormalidades nucleares (ANEs) também podem ser analisadas em eritrócitos, complementando os resultados sobre genotoxicidade de um xenobiótico (LÓPEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2017). Essas anormalidades nucleares de eritrócitos (ANEs) são relacionadas a erros que ocorrem durante a mitose ou meiose como: processos de morte celular (apoptose), pequenas evaginações da membrana nuclear semelhantes ao micronúcleo (bolha/broto), evaginações maiores que as bolhas (lobado), células com dois núcleos (binucleadas), núcleo que apresenta um corte bem definido em sua forma (entalhado), núcleo sem o material genético (cariólise), células sem a presença de núcleo (anucleada) e núcleo com vacúolo (vacuolizado) (CARRASCO; TILBURY; MYRES, 1990; FENECH, 2007; NIKOLOFF *et al.*, 2014).

Anfíbios são organismos utilizados em ensaios ecotoxicológicos pois são excelentes indicadores de qualidade ambiental, já que são mais sensíveis a mudanças ambientais devido as diferentes fases de seu ciclo de vida, aquática e terrestre (TOLEDO, 2009; ROBINSON, *et al.*, 2017). Além disso, limitações na capacidade de dispersão, a pele permeável capaz de absorver substâncias tóxicas, respiração cutânea, pouca mobilidade e sua tolerância às condições experimentais fazem com que os anfíbios sejam frequentemente utilizados em pesquisas toxicológicas (MIKÓ *et al.*, 2017; GONÇALVES *et al.*, 2019; BENVINDO-SOUZA *et al.*, 2020). A exposição a contaminantes químicos como agrotóxicos torna-se uma ameaça para os anfíbios, provocando um declínio das espécies, descaracterização do ambiente e perda de diversidade biológica (GONÇALVES, 2015; AGOSTINI *et al.*, 2020).

O gênero *Physalaemus* tem sido utilizado em vários estudos sobre os efeitos de agrotóxicos (MORESCO; MARGARIDO; OLIVEIRA, 2014; GONÇALVES *et al.*, 2019;

RUTKOSKI *et al.*, 2020). A espécie *P. gracilis* ou rã-chorona é normalmente encontrada no sul do Brasil, Uruguai e Argentina (FROST, 2021). Reproduz-se nos meses de setembro a março em ambientes lênticos, no qual as fêmeas depositam seus ovos em ninhos de espumas (BORGES-MARTINS *et al.*, 2007). Essa espécie não consta nas listas de espécies ameaçadas de extinção, graças à sua ampla distribuição e sua tolerância a diferentes habitats (IUCN, 2021), e é considerada bioindicadora (MACAGNAN, 2018; VANZETTO *et al.*, 2019; HEREK *et al.*, 2020).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a toxicidade aguda e o potencial genotóxico dos agrotóxicos picloram, imidacloprido e do clorotalonil em girinos de *Physalaemus gracilis*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a concentração letal média (CL<sub>50</sub>) do picloram, imidacloprido e do clorotalonil em girinos de *P. gracilis*;
- Determinar a existência ou não da indução de micronúcleos e ANEs em *P. gracilis* após a exposição aos três tipos de agrotóxicos;
- Verificar se existe diferença no potencial genotóxico nas concentrações agudas testadas;
- Realizar a análise de risco ecológico.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 AGROTÓXICOS

Para os ensaios de toxicidade aguda foram utilizadas as formulações comerciais do herbicida Picloram Padron (concentrado solúvel (SL)), do inseticida Imidacloprid Nortox (suspensão concentrada (SC)) e o fungicida Clorotalonil Previnil (suspensão concentrada (SC)) (Tabela 1).

Como características químicas, o picloram (4-amino-3,5,6- trichloropyridine-2-carboxylic acid) (ANVISA, 2021) apresenta meia vida variando de 167 a 513 dias em pH 7 e 25°C de temperatura (USEPA, 1995), coeficiente de partição carbono orgânico de 16 (CLOSE *et al.*, 1998), solubilidade em água de 430 mg.L<sup>-1</sup> (25°C), coeficiente de partição octanol-água igual a 1,4 e pressão de vapor de 6,16 x 10<sup>-7</sup> mm Hg a 35°C (MANTOVANI, 2007) e constante da Lei de Henry de 1,59 x 10<sup>-9</sup> (LOURENCETTI *et al.*, 2005).

O imidacloprido (1-[(6-cloro-3-piridinil)metil]-N-nitro-2-imidazolidinimina) (ANVISA, 2021) possui meia vida superior a 30 dias em pH 7 e temperatura 25 °C, coeficiente de partição carbono orgânico de 132 a 310, solubilidade em água de 515 - 610 mg.L<sup>-1</sup> (25°C), coeficiente de partição octanol-água igual a 3,7, pressão de vapor de 1.0 x 10<sup>-7</sup> mmHg (25°C) e constante da Lei de Henry de 6,5 x 10<sup>-8</sup> atm m<sup>-3</sup>.mol<sup>-1</sup> (COSTA, 2014; FOSSEN, 2006).

Clorotalonil (tetrachloroisophthalonitrile) (ANVISA, 2021) possui meia vida de aproximadamente 44 horas em pH 7 e 25°C de temperatura (USEPA, 1999; MCMAHON *et al.*, 2012), coeficiente de partição carbono orgânico igual a 5, apresenta solubilidade em água de 0,80 mg.L<sup>-1</sup> (20°C), coeficiente de partição octanol-água igual a 2,88, pressão de vapor de 7,63x10<sup>-4</sup> mPa a 25°C e apresenta constante da Lei de Henry de 1,4 x 10<sup>-7</sup> atm m<sup>-3</sup>.mol<sup>-1</sup> (VAN SCOY; TJEERDEMA, 2014).

A solução-estoque foi preparada no mesmo dia da realização do ensaio agudo. O produto comercial foi diluído em água destilada para obtenção da solução-estoque com concentração de 500 mg.L<sup>-1</sup>. Essa solução foi utilizada na preparação de todas as concentrações utilizadas no ensaio de toxicidade aguda, com o auxílio de micropipeta.

Tabela 1 - Composição do picloram, imidacloprido e clorotalonil utilizados no ensaio agudo.

Agrotóxico	Composição dos Agrotóxicos	
	Equivalente ácido	Outros ingredientes
Picloram	240,00 g.L <sup>-1</sup> (Picloram, Sal trietanolamina:388,30 g.L <sup>-1</sup> )	791,65 g.L <sup>-1</sup>
Imidacloprido	480,0 g.L <sup>-1</sup>	728,4 g.L <sup>-1</sup>
Clorotalonil	720,0 g.L <sup>-1</sup>	605,2 g.L <sup>-1</sup>

Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

### 3.2 ORGANISMO-TESTE

Para os ensaios de toxicidade aguda, utilizou-se como organismos teste girinos de *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae) (Figura 1).

Figura 1 - Girino de *Physalaemus gracilis* no estágio 25 de Gosner (1960), utilizados no ensaio de toxicidade aguda.



Fonte: Elaborada pela autora, 2021.

As desovas de *P. gracilis* (Anura: Leptodactylidae) foram coletadas com menos de 24 horas de oviposição (Figura 2), em um charco dentro da Universidade Federal da Fronteira Sul-UFFS, Campus Erechim- RS (Latitude: 27°43'46,11" Sul; Longitude: 52°16'54,40" Oeste).



Figura 2 - (A) Coleta das desovas, no charco da Universidade Federal da Fronteira Sul-campus Erechim (B) Desovas na natureza contendo girinos de *Physalaemus gracilis*.



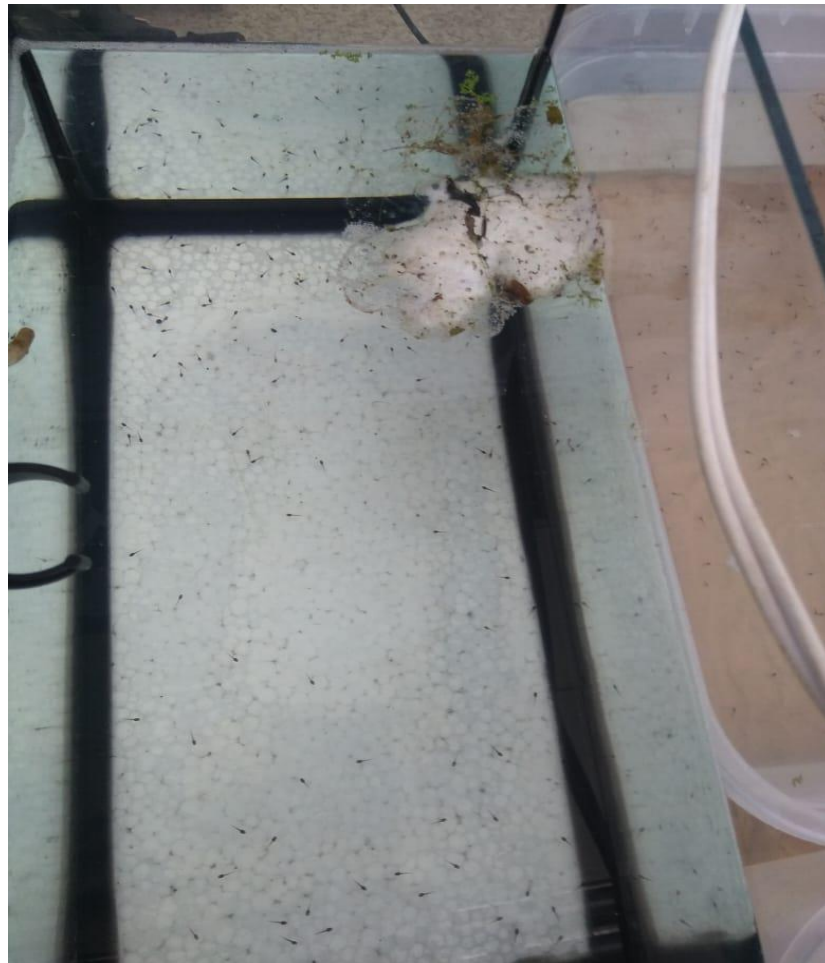
Fonte: (A) Elaborada pela Autora. (B) Felipe Pavan, 2021.

As desovas coletadas foram transportadas em sacos plásticos e imediatamente conduzidas ao laboratório de Ecologia e Conservação da UFFS. Em seguida, foram colocadas individualmente em aquários com capacidade de 15 litros, previamente preparados com água de poço artesiano de clorada (Figura 3). A água dos aquários foi mantida na temperatura de  $23^{\circ}\text{C} \pm (2)$ , pH na faixa de  $7,0 \pm (0,8)$ , oxigênio dissolvido na faixa de  $6,0 \text{ mg.L}^{-1} \pm (1)$ , turbidez  $< 5$ , condutividade =  $649 \pm (25) \mu\text{S.cm}^{-1}$ , dureza =  $3,57 \text{ mg.L}^{-1}$ , sódio =  $13,01 \text{ mg.L}^{-1}$ , ferro =  $0,564 \text{ mg.L}^{-1}$  e níquel  $< 0,002 \text{ mg.L}^{-1}$ . Os parâmetros de qualidade da água foram monitorados diariamente, a sala foi aclimatada a uma temperatura entre  $25^{\circ}\text{C} \pm (2)$ , com umidade relativa entre 60 e 80% e iluminação controlada (12/12 horas claro-escuro).

Os girinos foram alimentados a cada 24 horas com alimento completo para peixes (Alcon Basic) contendo 45% de proteína bruta e com alface cozida. Os organismos não utilizados no ensaio foram devolvidos a natureza, no mesmo local de coleta.

Este estudo teve autorização de coleta pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) sob nº 72719-1 e aprovação do Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA/UFFS) sob protocolo nº 8706100919.

Figura 3 - Desova de *Physalaemus gracilis* disposta em aquário de 15 litros no Laboratório de Ecologia e conservação da Universidade Federal da Fronteira Sul, campus Erechim.



Fonte: Elaborada pela Autora, 2021.

### 3.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

#### 3.3.1 Ensaio Agudo

O ensaio de toxicidade aguda para determinação da Concentração Letal Média ( $CL_{50}$ ) foi realizado com girinos no estágio de desenvolvimento 25, de acordo com Gosner (1960). Neste estágio, os girinos possuem estrutura bucal adequada para alimentação (MCDIARMID; ALTIG, 1999). O teste teve duração padrão de 96 horas de acordo com o Protocolo ASTM E729-96/2014 “*Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians*”. O ensaio foi realizado em unidades experimentais, em triplicata. Cada unidade experimental foi um recipiente de vidro com capacidade de 500 mL, contendo 10 girinos. As unidades experimentais receberam a solução

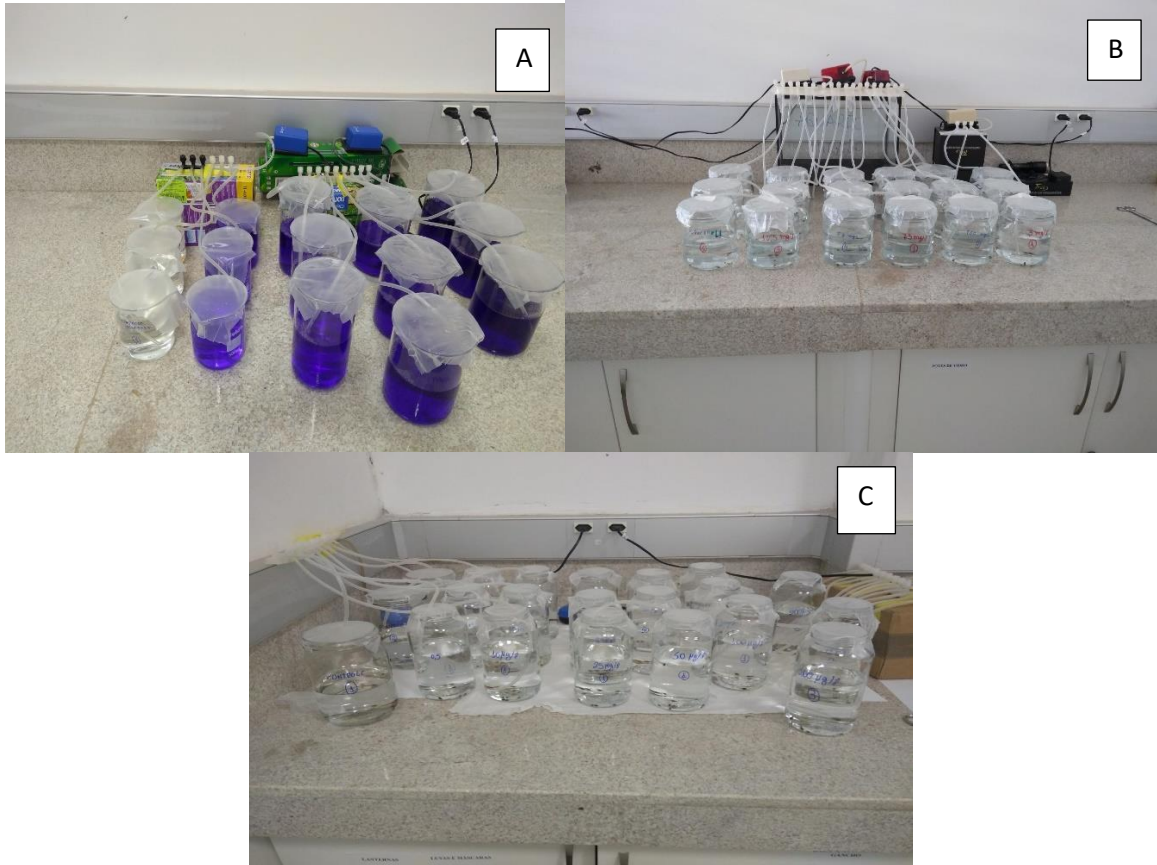
contendo água dechlorada e a concentração de agrotóxico, ou somente água dechlorada no controle, seguindo os mesmos parâmetros da água descritos no item 3.2.

Foram testadas seis concentrações de cada agrotóxico, baseadas em dados encontrados na literatura. As concentrações testadas para o picloram foram baseadas no estudo com *Rhinella arenarum*: 1,8; 3,0; 5,0; 10; 25 e 50 mg.L<sup>-1</sup> (LAJMANOVICH *et al.*, 2013). Para o imidacloprido as concentrações testadas foram baseadas em ensaios preliminares com duas espécies de anfíbios, *Rana N. Hallowel* e *Hypsiboas pulchellus*, sendo elas: 5,0; 12,5; 50; 75; 100 e 200 mg.L<sup>-1</sup> (FENG *et al.*, 2004; ARCAUTE *et al.*, 2014). Para o clorotalonil testou-se as concentrações baseadas em estudo com larvas de anfíbios de *Xenopus laevis*, *Agalychnis callidryas*, *Isthmohyla pseudopuma* e *Smilisca baudinii*: 0,0005; 0,01; 0,025; 0,050; 0,10 e 0,20 mg.L<sup>-1</sup> (YU *et al.*, 2013; MÉNDEZ *et al.*, 2016).

Para a classificação da toxicidade aguda, utilizou-se a classificação da *Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals* (GHS, 2021), no qual os compostos químicos podem ser classificados em três grupos depois de 96 horas de exposição: alta toxicidade (CL<sub>50</sub><1 mg.L<sup>-1</sup>), toxicidade moderada (CL<sub>50</sub> entre 1 e 10 mg.L<sup>-1</sup>) e baixa toxicidade (CL<sub>50</sub>>10 mg.L<sup>-1</sup>).

As unidades experimentais foram cobertas com plástico parafilm a fim de evitar a evaporação da solução e mantidas sob aeração constante (Figura 4). A mortalidade dos indivíduos foi analisada a cada 24 horas, os mortos foram retirados e contabilizados. A temperatura e oxigênio dissolvido da água foram mantidos em 23°C± (2) e 6± (1) mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente, durante todo o período do ensaio. Os organismos não foram alimentados durante o teste.

Figura 4 - Ensaio de toxicidade aguda com girinos de *Physalaemus gracilis* no Laboratório de Ecologia e Conservação da UFFS, *campus* Erechim. (A) picloram; (B) imidacloprido; (C) clorotalonil.



Fonte: Elaborada pela autora, 2021.

### 3.3.2 Micronúcleo e Anormalidades Nucleares de Eritrócitos

No final do ensaio agudo foram retirados aleatoriamente 10 girinos de cada concentração e do controle, ou apenas os que sobreviveram das concentrações, para a análise do sangue através do teste do micronúcleo. Foram analisadas somente concentrações com girinos vivos ao final do ensaio. Os girinos foram eutanasiados por anestesia dérmica com lidocaína 5% ( $50 \text{ mg.g}^{-1}$ ) de acordo com normas do (CONCEA, 2021). Foi retirada uma gota de sangue de cada girino, com seringas descartáveis e solução de heparina (5.000 UI). Foi realizado o esfregaço em lâminas de microscopia esterilizadas. As lâminas foram colocadas para secar em temperatura ambiente e depois coradas com corante hematológico Kit panótico rápido (LABORCLIN). Esse Kit consiste em três frascos de 500 ml contendo uma solução de triarilmetano (0,1%), solução de xantenos (0,1%) e uma solução de tiaxina (0,1%). O tempo de imersão das lâminas foram 30, 30, 60 segundos respectivamente. As lâminas foram levemente lavadas com água destilada e postas para secar em temperatura ambiente e ao abrigo de luz.

Foi analisada a presença de micronúcleos e anormalidades nucleares nos eritrócitos através da contagem de 1.000 eritrócitos de cada girino, com auxílio de microscópio em objetiva 100X de acordo com (LAJMANOVICH *et al.*, 2013; JING *et al.*, 2017). As anormalidades nucleares avaliadas foram: (1) Células Anucleadas; (2) Células com Apoptose; (3) Células Binucleadas; (4) Célula com Broto/Bolha; (5) Células com Cariólise; (6) Células Entalhadas; (7) Células Lobadas e (8) Células Vacuolizadas (CARRASCO; TILBURY; MYRES, 1990; FENECH, 2007, 2011; ARCAUTE *et al.*, 2014).

### 3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA E RISCO ECOLÓGICO

Os resultados do ensaio agudo para determinação da concentração letal média ( $CL_{50}$ ) foram analisados através do método TSK- Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON; RUSSO; THRUSTON, 1977) pelo software GBasic com 95% de significância.

Para determinar as diferenças entre as concentrações dos grupos foi realizada análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), utilizando o software GraphPad Prism6. Os gráficos foram confeccionados nos softwares Excel e no Graph Pad.

A avaliação de risco ecológico foi determinada através do quociente de risco agudo (USEPA, 1998). O risco ecológico agudo foi calculado pela divisão da concentração estimada do contaminante (CEC) no ambiente pela concentração letal média ( $CL_{50}$ ) calculada para cada um dos agrotóxicos testados ( $CEC/CL_{50}$ ). A CEC foi obtida a partir da literatura, como sendo a máxima concentração estimada do agrotóxico no ambiente. Para o picloram, a CEC estimada foi de  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ , baseada no limite estabelecido pela EPA (HAMILTON *et al.*, 2003). Para o imidacloprido e clorotalonil a CEC estabelecida foi de  $0,3$  e  $0,18 \text{ mg.L}^{-1}$ , respectivamente, baseadas na Portaria nº 320/2014 do Rio Grande do Sul.

Após o cálculo do quociente de risco agudo, esse foi comparado com o nível de preocupação da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, 1998) através do nível de preocupação. No risco agudo o valor de referência do nível de preocupação é  $0,5$ , logo se o valor do quociente de risco agudo for maior que  $0,5$  é considerado risco agudo para a espécie estudada.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 TOXICIDADE AGUDA

A  $CL_{50}$  de picloram para girinos de *P. gracilis* foi de 15,81  $mg.L^{-1}$ , mas não foi possível calcular os intervalos de confiança, pois a mortalidade ocorreu somente nas últimas concentrações nas primeiras 24 horas de exposição (e ter sido de 100%). A  $CL_{50}$  de imidacloprido foi de 69,20  $mg.L^{-1}$  (+95%= 59,46; -95%= 80,54), e em 24 horas de exposição ocorreu mortalidade nas concentrações de 75, 100 e 200  $mg.L^{-1}$ , sendo que nessa última concentração ocorreu a maior taxa de mortalidade dos girinos. Para o clorotalonil a  $CL_{50}$  foi de 0,036  $mg.L^{-1}$  (+95%= 0,032; -95%= 0,041), a mortalidade passou a ocorrer a partir de 72 horas de exposição nas concentrações de 0,025, 0,05, 0,1 e 0,2  $mg.L^{-1}$ , sendo nas duas últimas concentrações a maior incidência de mortes. Os dados estão apresentados na Tabela 2 e Figura 5.

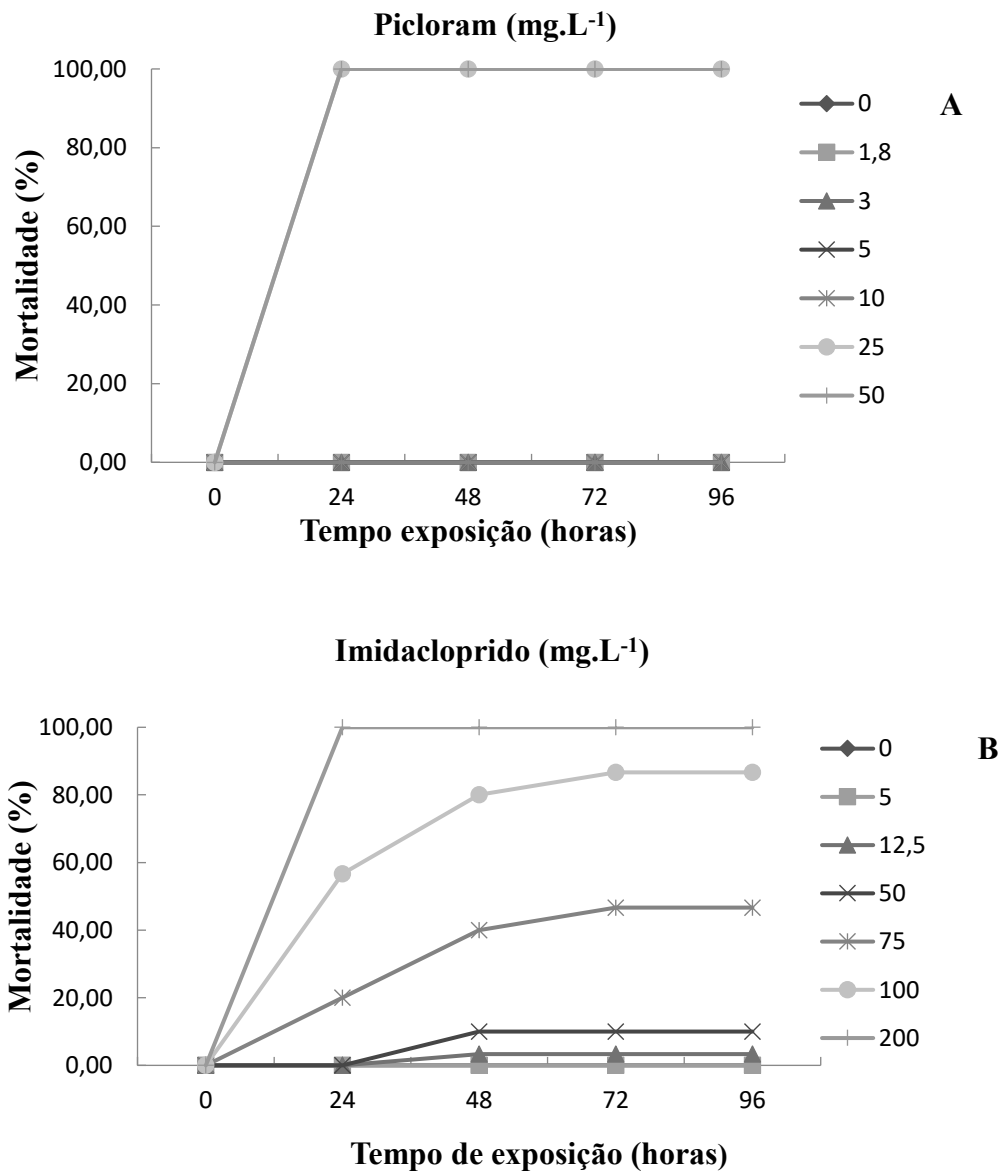
Tabela 2 - Mortalidade de girinos *Physalaemus gracilis* expostos à formulação comercial do herbicida picloram inseticida imidacloprido e fungicida clorotalonil no ensaio agudo.

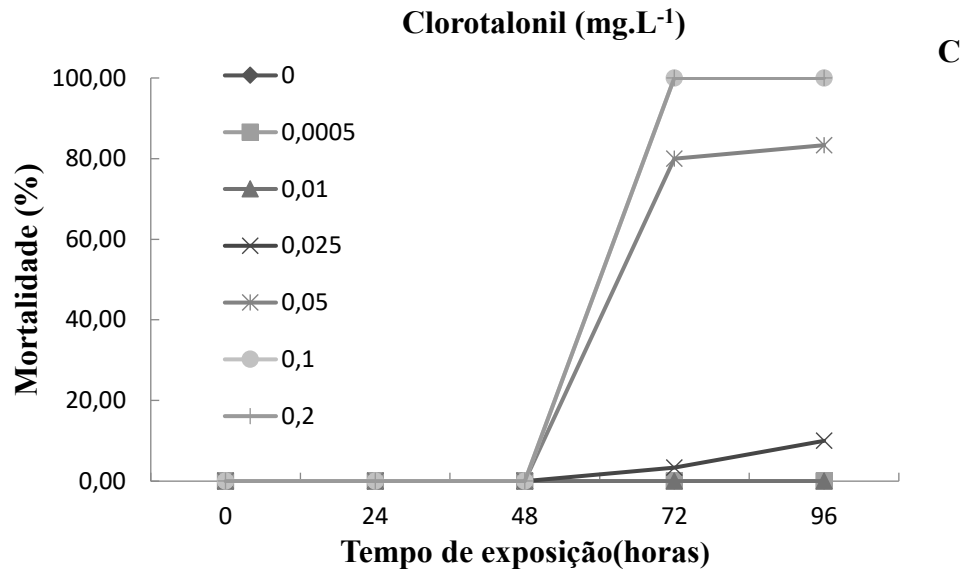
Agrotóxico	Concentração ( $mg.L^{-1}$ )	Mortalidade				Mortalidade total	Mortalidade (%)
		24h	48h	72h	96h		
Picloram	0	0	0	0	0	0	0,0
	1,8	0	0	0	0	0	0,0
	3,0	0	0	0	0	0	0,0
	5,0	0	0	0	0	0	0,0
	10	0	0	0	0	0	0,0
	25	30	0	0	0	30	100
	50	30	0	0	0	30	100
Imidacloprido	0	0	0	0	0	0	0,0
	5	0	0	0	0	0	0,0
	12,5	0	1	0	0	1	3,3
	50	0	3	0	0	3	10,0
	75	6	6	2	0	14	46,7
	100	17	7	2	0	26	86,7
	200	30	0	0	0	30	100
Clorotalonil	0	0	0	0	0	0	0,0
	0,0005	0	0	0	0	0	0,0
	0,01	0	0	0	0	0	0,0
	0,025	0	0	1	2	3	10,0

0,05	0	0	24	1	25	83,3
0,1	0	0	30	0	30	100
0,2	0	0	30	0	30	100

Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Figura 5 - Mortalidade cumulativa (%) de girinos de *Physalaemus gracilis* expostos a diferentes concentrações do: (A) picloram). (B) imidacloprido. (C) clorotalonil no ensaio agudo.





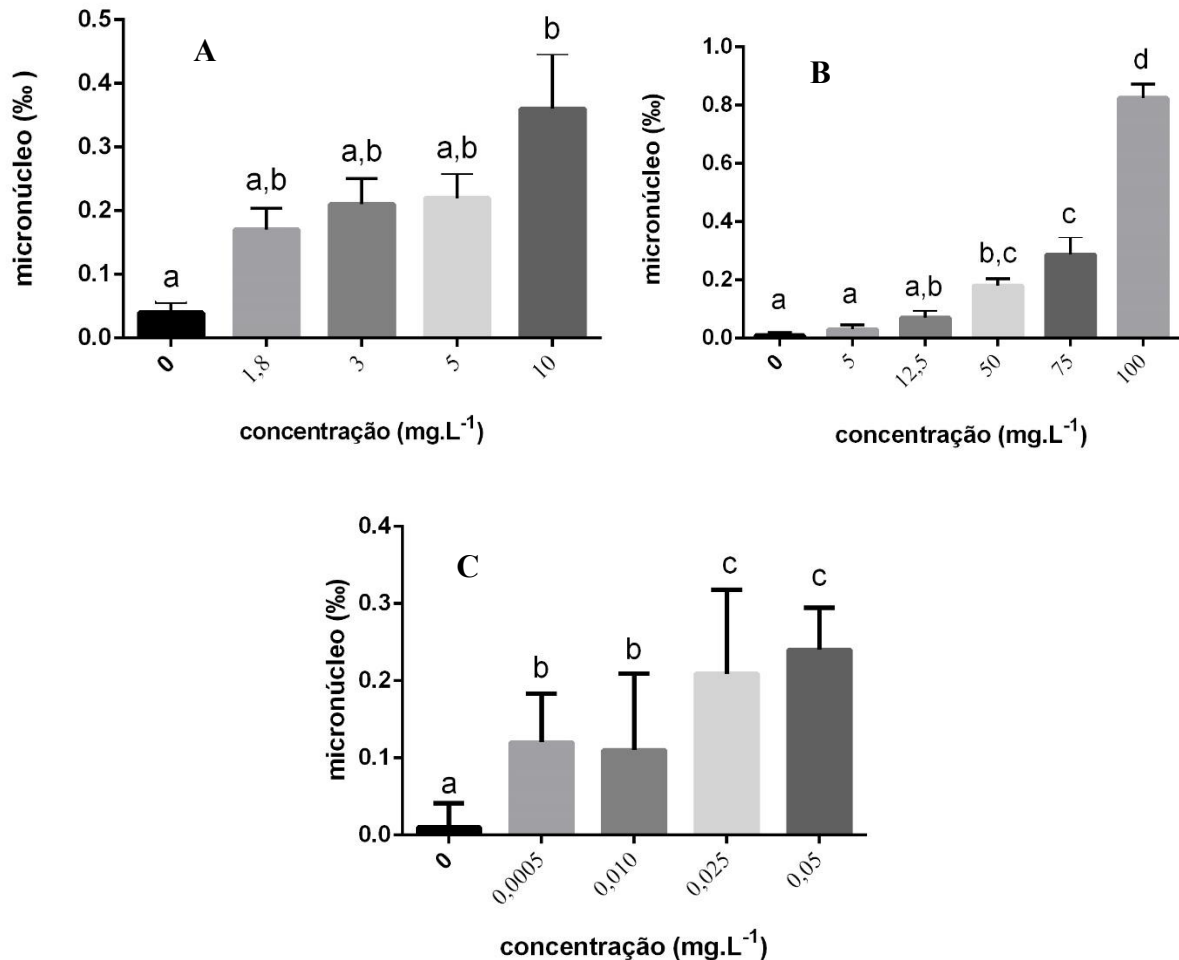
Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

#### 4.2 MICRONÚCLEO E ANORMALIDADES NUCLEARES DE ERITRÓCITOS

Foram avaliados 50.000 eritrócitos de *P. gracilis* expostos a picloram, 54.144 eritrócitos expostos a imidacloprido e 45.119 eritrócitos expostos a clorotalonil. Com relação a ocorrência de micronúcleo nos eritrócitos, houve diferença significativa nos girinos expostos a 10 mg.L<sup>-1</sup> de picloram ( $F_{4,45}=5,41$ ,  $p=0,001$ , Tukey =  $p<0,05$ ; ), em 50, 75 e 100 mg.L<sup>-1</sup> de imidacloprido ( $F_{5,48} = 43,47$ ,  $p < 0,0001$ , Tukey =  $p< 0,05$ ) e em 0,0005, 0,010, 0,025 e 0,05 mg.L<sup>-1</sup> de clorotalonil ( $F_{4,38} = 13,00$ ,  $p< 0,0001$ ; Tukey =  $p<0,05$ ) (Figura 6).



Figura 6 - Micronúcleos detectados em girinos de *Physalaemus gracilis* expostos a diferentes concentrações de: (A) picloram; (B) imidacloprido; (C) clorotalonil.



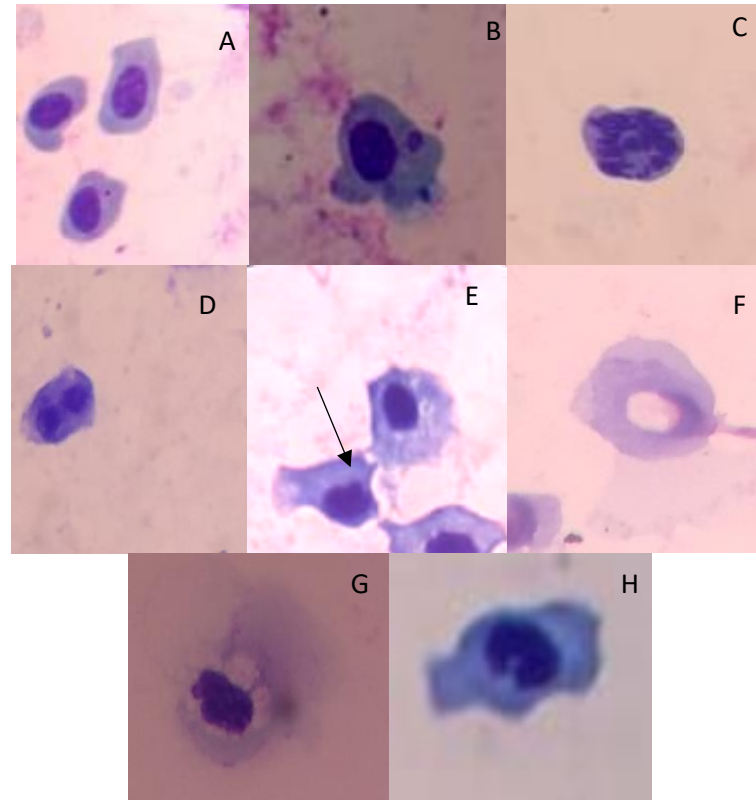
Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Das oito anormalidades avaliadas além do micronúcleo, foram encontradas cinco nos girinos expostos ao picloram, seis nos expostos ao imidacloprido e cinco nos expostos ao clorotalonil (Figura 7 e Tabela 3).

A análise conjunta de todas as anormalidades nucleares registradas nos girinos, incluindo o micronúcleo, mostrou que as quatro concentrações avaliadas de Picloram (1,8; 3; 5 e 10 mg.L<sup>-1</sup>;  $F_{4,45} = 8,35$ ,  $p < 0,0001$ , Tukey =  $p < 0,05$ ) e de clorotalonil (0,0005; 0,010; 0,025 e 0,05 mg.L<sup>-1</sup>;  $F_{4,40} = 37,42$ ,  $p < 0,0001$ , Tukey =  $p < 0,05$ ) causaram anormalidades significativas. No imidacloprido, foram avaliadas cinco concentrações, e a presença de

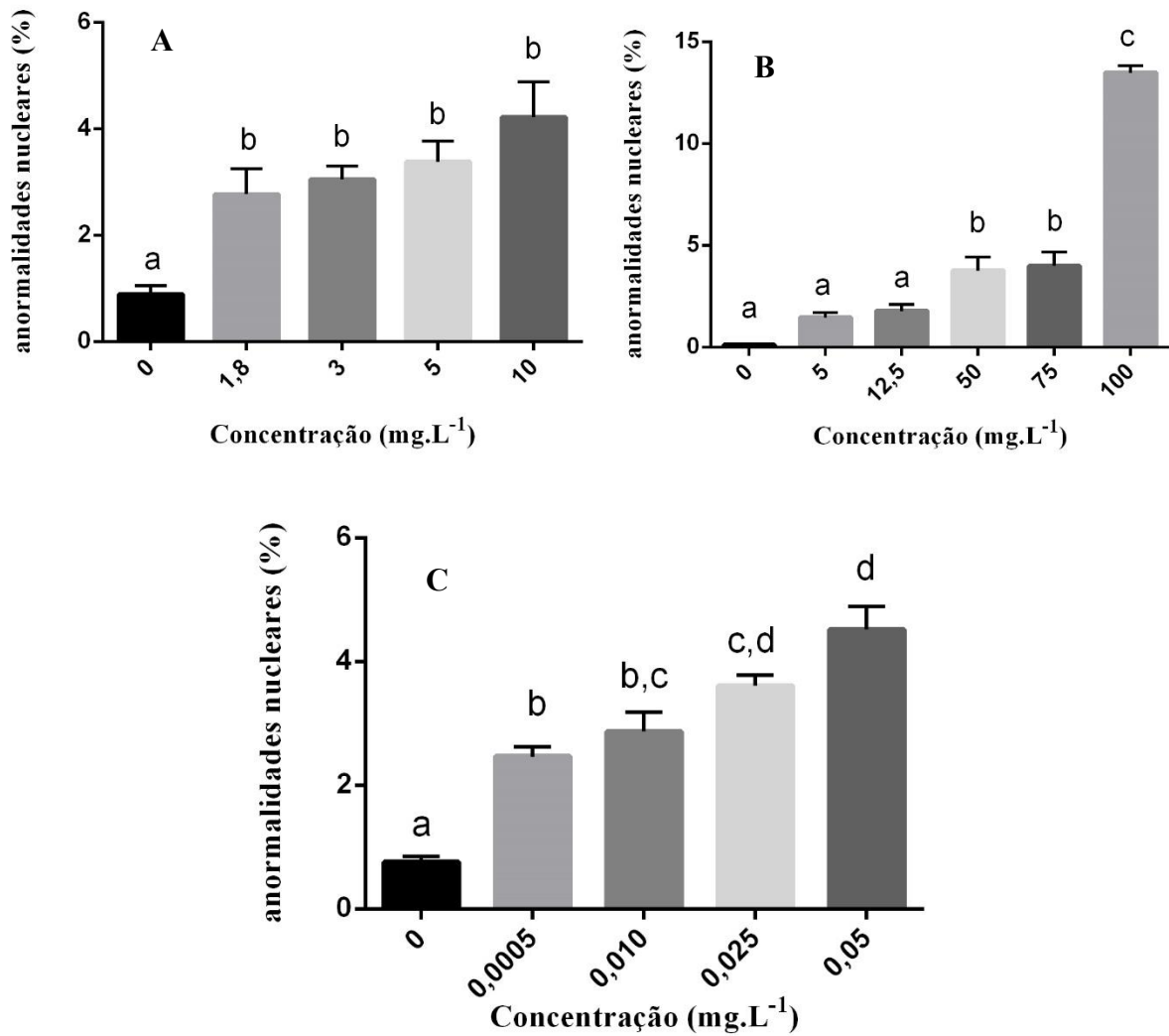
anormalidades nucleares foi significativa nas três maiores concentrações (50, 75 e 100 mg.L<sup>-1</sup>;  $F_{5,48} = 55,73$ ,  $p < 0,0001$ , Tukey =  $p < 0,05$ ) (Figura 8).

Figura 7 - Micronúcleo e Anormalidades Nucleares de eritrócitos de girinos *Physalaemus gracilis* expostos ao ensaio agudo. (A) Células com núcleos normais; (B) Célula com Micronúcleo; (C) Células com Apoptose; (D) Célula Binucleada; (E) Célula com Bolha ou Broto Nuclear; (F) Célula com Cariólise; (G) Célula Lobada; (H) Célula Entalhada;



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Figura 8 - Anormalidades Nucleares detectadas em em girinos de *Physalaemus gracilis* expostos a diferentes concentrações de: (A) picloram; (B) imidacloprido; (C) clorotalonil.



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Cada anormalidade foi avaliada individualmente quanto a sua significância em relação as concentrações testadas para cada agrotóxico. Os resultados da ANOVA e teste de Tukey podem ser observados no APÊNDICE A.

Tabela 3 - Média  $\pm$  desvio padrão (mínimo e máximo) de micronúcleos e anormalidades nucleares de eritrócitos (ANE's) em girinos *Physalaemus gracilis*, encontradas no controle e nas concentrações, após exposição a formulação comercial do herbicida picloram, inseticida imidacloprido e fungicida clorotalonil, no ensaio agudo. \*Significativo em relação ao controle pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Agrotóxico	Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	Número de Células Analisadas	ANEs						
			Micronúcleo	Apoptose	Binucleada	Bolha	Cariólise	Entalhada	Lobada
Picloram	0	10.000	0,4 $\pm$ 0,52 (0-1)	0	0	0,6 $\pm$ 0,85 (0-2)	0	4,6 $\pm$ 2,2 (2-8)	3,3 $\pm$ 2,63 (0-9)
	1,8	10.000	1,7 $\pm$ 1,06 (0-3)	0	0,8 $\pm$ 1,13 (0-3)	3,1 $\pm$ 1,10* (2-5)	0	9,7 $\pm$ 4 (4-16)	1,1 $\pm$ 7,31* (3-22)
	3	10.000	2,1 $\pm$ 1,29 (0-4)	0,3 $\pm$ 0,67 (0-2)	1,5 $\pm$ 1,08 (0-3)	2,6 $\pm$ 1,58* (0-5)	0	12,1 $\pm$ 2,92* (7-16)	11,9 $\pm$ 3,07* (7-16)
	5	10.000	2,2 $\pm$ 1,23 (1-4)	0,3 $\pm$ 0,67 (0-2)	1,9 $\pm$ 1,60* (0-5)	2,7 $\pm$ 2,11* (0-6)	0	13,1 $\pm$ 5,61* (3-21)	12,8 $\pm$ 5,69* (5-20)
	10	10.000	3,6 $\pm$ 2,76* (1-9)	0	1,5 $\pm$ 2,17 (0-6)	3 $\pm$ 0,47* (2-4)	0	18,1 $\pm$ 7,22* (10-29)	15,4 $\pm$ 8,70* (5-28)
Imidacloprido	0	10.000	0,1 $\pm$ 0,32 (0-1)	0	0	0,1 $\pm$ 0,32 (0-1)	0	0,5 $\pm$ 0,71 (0-2)	0,5 $\pm$ 0,85 (0-2)
	5	10.000	0,3 $\pm$ 0,48 (0-1)	0	0	3,5 $\pm$ 3,37 (0-10)	0	5,2 $\pm$ 3,19 (1-11)	5,5 $\pm$ 3,81 (0-11)
	12,5	10.052	0,7 $\pm$ 0,82 (0-2)	0	0,4 $\pm$ 0,52 (0-1)	2,1 $\pm$ 2,02 (0-6)	0	5,3 $\pm$ 4,52 (1-14)	8,6 $\pm$ 4,95* (2-17)
	50	10.019	1,8 $\pm$ 0,79* (1-3)	0,3 $\pm$ 0,67 (0-2)	0,7 $\pm$ 0,82 (0-2)	7,1 $\pm$ 6,37* (0-16)	0	12,3 $\pm$ 7,16* (3-24)	13,1 $\pm$ 6,71* (5-24)
	75	10.073	2,9 $\pm$ 2,02* (0-6)	0	0,9 $\pm$ 0,74 (0-2)	4,5 $\pm$ 2,95 (0-9)	0	14,5 $\pm$ 8,26* (3-29)	13,7 $\pm$ 8,47* (3-31)
	100	4.000	3,3 $\pm$ 4,30* (0-9)	0,6 $\pm$ 1,35* (0-2)	1,8 $\pm$ 2,78* (0-8)	10,4 $\pm$ 13,57* (0-30)	0,3 $\pm$ 0,67* (0-2)	17,7 $\pm$ 22,88* (0-46)	18,1 $\pm$ 23,5* (0-50)
Clorotalonil	0	10.013	0,1 $\pm$ 0,32 (0-1)	0	0	2,6 $\pm$ 1,26 (1-5)	0	2,2 $\pm$ 0,79 (1-3)	2,5 $\pm$ 1,72 (0-6)
	0,0005	10.071	1,2 $\pm$ 0,63* (1-3)	0	0,3 $\pm$ 0,67 (0-2)	5,2 $\pm$ 4,13 (1-15)	0,4 $\pm$ 0,97* (0-3)	9,3 $\pm$ 1,34* (8-12)	8,3 $\pm$ 3,94* (0-13)
	0,01	10.005	1,1 $\pm$ 0,99 (0-3)	0	1 $\pm$ 1,50 (0-4)	4,4 $\pm$ 2,32 (1-8)	0	10,3 $\pm$ 3,68* (5-17)	10,7 $\pm$ 4,69* (4-19)
	0,025	10.030	2,1 $\pm$ 1,10* (1-4)	0	0,9 $\pm$ 1,52 (0-5)	2,5 $\pm$ 1,27 (2-6)	0	14,5 $\pm$ 1,27* (12-16)	13,8 $\pm$ 3,29* (8-19)
	0,05	5.000	2,4 $\pm$ 0,55* (2-3)	0	1 $\pm$ 0 (1-1)	4,8 $\pm$ 2,59 (2-8)	0	19 $\pm$ 2,34* (16-21)	14 $\pm$ 2,91* (10-17)

Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

### 4.3 ANÁLISE DE RISCO ECOLÓGICO

Não houve risco agudo para o picloram e para imidacloprido visto que o valor do coeficiente de risco agudo foi inferior ao de preocupação estabelecido (Tabela 6). Já para o clorotalonil, o risco agudo calculado foi superior ao valor de referência (0,5) indicando que o agrotóxico confere potencial risco agudo para a espécie testada.

Tabela 4 - Avaliação de risco ecológico agudo para girinos de *Physalaemus gracilis* expostos aos três agrotóxicos no ensaio agudo.

<b>Agrotóxico</b>	<b>CEC (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>CL50 (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Coefficiente risco agudo</b>
Picloram	0,5	15,81	0,03
Imidacloprido	0,3	69,20	0,004
Clorotalonil	0,18	0,03662	5

Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

## 5 DISCUSSÃO

A formulação comercial testada do herbicida picloram e inseticida imidacloprido apresentaram baixa toxicidade aguda para girinos de *Physalaemus gracilis*, já o fungicida clorotalonil apresentou alta toxicidade aguda, segundo a classificação da *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemical* (GHS, 2021). De acordo com a concentração letal, a ordem destes agrotóxicos do mais ao menos tóxico para *P. gracilis* foi clorotalonil – picloram-imidacloprido.

Em anfíbios foram registrados diversos valores de toxicidade aguda para esses agrotóxicos, demonstrando diferenças de sensibilidade entre espécies para esses princípios ativos, mas seguem a mesma ordem de toxicidade encontrada para *P. gracilis*. Em estudos realizados, clorotalonil foi o mais tóxico desses agrotóxicos, pois apresentou alta toxicidade para *Agalychnis callidryas*, com  $CL_{50-96}$  de  $0,026 \text{ mg.L}^{-1}$ , para *Isthmohyla pseudopuma* com  $0,025 \text{ mg.L}^{-1}$  e para *Smilisca baudinii* com  $0,032 \text{ mg.L}^{-1}$  (MÉNDEZ *et al.*, 2016). Picloram foi o segundo mais tóxico, pois demonstrou baixa toxicidade para *Boana pulchella*, com uma  $CL_{50-48h}$  de  $16,5 \text{ mg.L}^{-1}$  (RIERO, 2019) e alta toxicidade para *Rhinella arenarum*, com valor de  $CL_{50-48h}$  de  $0,025 \text{ mg.L}^{-1}$  (LAJMANOVICH *et al.*, 2013). Imidacloprido apresentou baixa toxicidade aguda para *Boana pulchella*, com  $CL_{50-96}$  de  $84,91 \text{ mg.L}^{-1}$  (ARCAUTE *et al.*, 2014) e para *Fejervarya limnocharis* e *Rana N.Hallowel* com  $CL_{50-96}$  de  $82 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $129 \text{ mg.L}^{-1}$ , respectivamente (FENG *et al.*, 2004).

Além da mortalidade, a exposição dos organismos aquáticos a substâncias químicas pode causar danos genéticos e cromossômicos, através do aumento da frequência de micronúcleos em células do sangue de organismos bioindicadores (RODRIGUES, 2006). Os três agrotóxicos testados induziram micronúcleos em *P. gracilis*. A menor concentração de clorotalonil analisada ( $0,0005 \text{ mg.L}^{-1}$ ) foi significativa para micronúcleos, sendo que a maior taxa de micronúcleos foi encontrada em  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  de imidacloprido, uma concentração onde sobreviveram apenas quatro girinos ao final do ensaio, o que corrobora com a toxicidade deste inseticida em altas concentrações.

Além do micronúcleo, todas as concentrações avaliadas para os três agrotóxicos, apresentaram outras anormalidades nucleares. Quando analisadas em conjunto, todas as concentrações de picloram e clorotalonil avaliadas induziram anormalidades nucleares, ou seja, picloram foi genotóxico para *P. gracilis* a partir de  $1,8 \text{ mg.L}^{-1}$  e clorotalonil a partir de  $0,0005 \text{ mg.L}^{-1}$ . Imidacloprido foi genotóxico a partir de  $50 \text{ mg.L}^{-1}$ , em três das cinco concentrações avaliadas. Um aumento da frequência de anormalidades nucleares pode se indicativo das

consequências de micronúcleos nas células avaliadas (AMARAL *et al.*, 2018). A inclusão de diferentes anormalidades na avaliação da genotoxicidade mostra uma sensibilidade maior nas espécies, quando comparada somente ao micronúcleo (HEREK *et al.*, 2021).

A genotoxicidade é uma ferramenta muito útil para avaliação do comportamento de compostos tóxicos, como os agrotóxicos quando inseridos no ambiente aquático (POLLO *et al.*, 2015). A presença de micronúcleos indica que esse composto modificou e induziu erros de formação das células nesses organismos (FENECH, 2000; GONÇALVES, 2015). Os resultados de genotoxicidade encontrados para esses três agrotóxicos, contribuem muito para essa avaliação comportamental, pois quando um composto químico modifica a funcionalidade de um organismo não-alvo, esse vem a sofrer com efeitos adversos em sua estrutura, como relatado nesse estudo para girinos de *P.gracilis*.

Das três classes de agrotóxicos usadas no ensaio, o clorotalonil foi o que demonstrou maior risco de toxicidade aguda para a espécie de anfíbio estudada. Na análise de risco ecológico o coeficiente de risco agudo calculado para o clorotalonil, foi superior ao valor de referência (USEPA, 1998), indicando que esse agrotóxico confere risco agudo para a espécie. O clorotalonil é um fungicida organoclorado que pode ser facilmente encontrado em águas superficiais e sedimentos (THOMAS; BROOKS, 2010).

As observações realizadas neste estudo permitem avaliar que altas concentrações dos três agrotóxicos testados são genotóxicas para essa espécie de anfíbio que é muito comum no Estado do Rio Grande do Sul. No Brasil, não há limites estabelecidos pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA 357/2005) para esses três agrotóxicos em águas superficiais. Para o picloram há um limite estabelecido pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> para água potável, já o imidacloprido e o clorotalonil são mencionados na Portaria N° 320/2014 em Águas para consumo Humano no Rio Grande do Sul com limite de 0,3 mg.L<sup>-1</sup> para o imidacloprido e de 0,18 mg.L<sup>-1</sup> para o clorotalonil. O clorotalonil ainda aparece na legislação CONAMA 396/2008 que dispõe sobre enquadramento para águas subterrâneas, com valor máximo permitido de 0,0001 mg.L<sup>-1</sup> e na nova Portaria N° 888/2021 que dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade com um valor de 0,045 mg.L<sup>-1</sup>. As concentrações agudas de picloram e imidacloprido encontradas neste estudo são maiores do que as permitidas pela legislação, o que é esperado, pois são altas concentrações. Mas para clorotalonil a toxicidade aguda encontrada está abaixo do que é permitido para água potável no Rio Grande do Sul e para a nova Portaria de água para consumo humano, demonstrando que esse composto causa risco para a espécie em concentrações mais baixas que as estabelecidas.

As observações realizadas neste estudo, avaliaram os efeitos letais e mutagênicos em uma espécie de anfíbio demonstrando ter potencial bioindicador. Esses dados contribuem para o avanço de pesquisas com outros organismos aquáticos bioindicadores susceptíveis à contaminação por esses agrotóxicos (AMÉRICO-PINHEIRO, 2015; LOPES, 2017; SILVA, 2020), fornecendo debates sobre a toxicologia de agrotóxicos em ambientes aquáticos.

## 6 CONCLUSÃO

Nesse trabalho verificamos que a formulação comercial do picloram e do imidacloprido demonstraram baixa toxicidade aguda para os girinos de *P. gracilis*, já o clorotalonil foi altamente tóxico e oferece risco ecológico agudo para a espécie. Os três agrotóxicos demonstram potencial genotóxico, apresentando micronúcleos e outras anormalidades nucleares de eritrócitos. Isso demonstra a importância de estudos envolvendo a toxicologia de agrotóxicos e como seus efeitos adversos podem afetar organismos não-alvo que se tornam vulneráveis no ambiente aquático, como essa espécie de anfíbio que é muito comum no sul do Brasil.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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, n. 108355, p.1-8, 2020.
- AMARAL, D. F.; MONTALVÃO, M. F.; MENDES, B. O.; ARAUJO, A. P. C.; RODRIGUES, A. S. L.; MALAFAIA, G. Sub-lethal effects induced by a mixture of different pharmaceutical drugs in predicted environmentally relevant concentrations on *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) (Anura, ranidae) tadpoles. **Environmental Science And Pollution Research**, [S.L.], v. 26, n. 1, p. 600-616, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-018-3656-9>.
- AMÉRICO-PINHEIRO, J. H. P. **TOXICIDADE DE IMIDACLOPRID E CARBOFURAN PARA ORGANISMOS AQUÁTICOS DE DIFERENTES NÍVEIS TRÓFICOS**. 2015. 122 F. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal-SP, 2015.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **C18 – Clorotalonil**. 2018. Disponível em: < <http://www.aenda.org.br/wp-content/uploads/2020/04/cir0468-anexores-1039-clorotalonil.pdf>> Acesso em: 11 de abril de 2021.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **I13 – Imidacloprido**. Disponível em: < <https://jornalismosocioambiental.files.wordpress.com/2018/04/imidacloprido-monografia-na-anvisa.pdf>> Acesso em: 11 de abril de 2021.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **P07 – Picloram**, 2021. Disponível em: < <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/p/4466json-file-1>> Acesso em: 11 de abril de 2021.
- ARCAUTE, R.; PÉREZ-IGLESIAS, J. M.; NIKOLOFF, N.; NATALE, G. S.; SOLONESKI, S.; LARRAMENDY, M. L. Genotoxicity evaluation of the insecticide imidacloprid on circulating blood cells of Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae) by comet and micronucleus bioassays. **Ecological Indicators**, v. 45, p. 632–639, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolind.2014.05.034>.
- ASTM E729 – 96(2014). **Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians**. Disponível em: < <https://www.astm.org/Standards/E729.htm>>. Acesso em: 14 maio 2021.
- BADGUJAR, P. C.; JAIN, S.K.; SINGH, A.; PUNIA, J.S.; GUPTA, R.P.; CHANDRATRE, G. A. Immunotoxic effects of imidacloprid following 28 days of oral exposure in BALB/c mice. **Environmental Toxicology And Pharmacology**, v. 35, n. 3, p.408-418, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.01.012>.
- BENVINDO-SOUZA, M.; OLIVEIRA, E. A. S.; ASSIS, R. A.; SANTOS, C. G. A.; BORGES, R. E.; SILVA, D. M.; SANTOS, L. R. S. Micronucleus test in tadpole erythrocytes: Trends in studies and new paths. **Chemosphere**, v. 240, n. 124910, p.1-7, 2020.

BIZERRA, P. F. V. **Mecanismos de toxicidade do inseticida Imidacloprido no fígado de rato**. 2018.86 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Animal) - Universidade Estadual Paulista – Julio de Mesquita Filho. Dracena-SP, 2018.

BORGES-MARTINS, M.; COLOMBO, P.; ZANK, C.; BECKER, F. G.; MELO, M. T. Q. Anfíbios. In: BECKER, F.G.; R.A. RAMOS & L.A. MOURA (Org.) **Biodiversidade: Regiões da Lagoa do Casamento e dos Butiazais de Tapes, Planície Costeira do Rio Grande do Sul**. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, 2007, p. 387.

BOTELHO, R. G.; SANTOS, J. B.; FERNANDES, K. M.; NEVES, C. A. Effects of atrazine and picloram on grass carp: acute toxicity and histological assessment. **Toxicological & Environmental Chemistry**, [S.L.], v. 94, n. 1, p. 121-127, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/02772248.2011.633915>.

BRASIL. **Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005**. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Brasília, 2005.

BRASIL. **Resolução CONAMA nº 396, de 3 de abril de 2008**. Dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento das águas subterrâneas e dá outras providências. Brasília, 2008.

BRITTO, F. B.; NETTO, A. O. A.; SILVA, T. M. M.; CARVALHO, C. M. Avaliação do risco de contaminação hídrica por agrotóxicos no Perímetro Irrigado Betume no Baixo Rio São Francisco. **Revista Brasileira de Agricultura Irrigada**, v. 9, n. 3, p. 158-170, 2015. DOI: 10.7127/rbai.v9n300301.

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

CELIS, R.; HERMOSÍN, C.; CORNEJO, L.; CARRIZOSA, J.; CORNEJO, J. Clay-Herbicide Complexes to Retard Picloram Leaching in Soil. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 82, n. 8-9, p. 503-517, 2002. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/03067310290018785>.

CHRISTOFFOLETI, P. J.; FIGUEIREDO, M. R. A.; PERES, L. E. P.; NISSEN, S.; GAINES, T. Auxinic herbicides, mechanisms of action, and weed resistance: A look into recent plant science advances. **Scientia Agricola**, v.72, n.4, p.356-362, 2015. DOI: 10.1590/0103-9016-2014-0360.

CLOSE, M. E.; PANG, L.; WATT, J. P. C.; VINCENT, K. W. Leaching of picloram, atrazine and simazine through two New Zealand soils, **Geoderma**, v. 84, n. 1-3, p. 45-63, 1998. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0016-7061\(97\)00120-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0016-7061(97)00120-1).

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

COSTA, N. R. **Determinação de fipronil e imidacloprido em mel utilizando cromatografia gasosa e líquida**. 2014. 101 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química da Universidade de Brasília, Brasília- DF, 2014.

COSTA, C. R.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422008000700038>.

D'ANTONINO, L.; SILVA, A. A.; FERREIRA, L. R.; CECON, P. R. QUIRINO, A. L. S.; FREITAS, L. H. L. Effects of Cultures on the Persistence of Auxinic Herbicides in Soil. **Planta Daninha**, v.27, n.2, p. 371-378, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-83582009000200021>.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**, v. 2, n. 5, p. 1084-1104, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2007.77>.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research/Fundamenta and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1-2, p. 81-95, 2000.

FENECH, M.; KIRSCH-VOLDERS, M.; NATARAJAN, A. T.; SURRALLE, J.; CROTT, J. W.; PARRY, J.; NORPPA, H.; EASTMOND, D. A.; TUCKER, J. D.; THOMAS, P. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 125-132, 2011.

FENG, S.; KONG, Z.; WANG, X.; ZHAO, L.; PENG, P. Acute toxicity and genotoxicity of two novel pesticides on amphibian, *Rana N. Hallowell*. **Chemosphere**, v. 56, n. 5, p. 457-463, 2004. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.02.010>.

FLORES, M.; YAMAGUCHI, M. U. Teste do Micronúcleo: Uma Triagem para Avaliação Genotóxica. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 1, n. 3, p. 337-340, 2008.

FOSSEN, M. Environmental Fate of Imidacloprid, **Environmental Monitoring Department, California Department of Pesticide Regulation**, n. 95812, n. 4015, p.1-26, 2006.

FROST, D. R. Amphibian species of the world: an online reference. Version 6.0. **American Museum of Natural History**, New York. 2021. Disponível em: <<https://amphibiansoftheworld.amnh.org/Amphibia/Anura/Leptodactylidae/Leiuperinae/Physalaemus/Physalaemus-gracilis>>. Acesso em: 24 abr. 2021.

GHS. Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals. **Environmental Risk Assessment**. 2021. Disponível em: <[https://www.chemsafetypro.com/Topics/CRA/ecotox\\_aquatic\\_toxicity.html](https://www.chemsafetypro.com/Topics/CRA/ecotox_aquatic_toxicity.html)>. Acesso: 14 mai. 2021.

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

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, n. 3, p. 409-420, 2019.

GONÇALVES, M. W.; OLIVEIRA, H. H. P.; SOUSA, C. C. N.; NOMURA, F.; CARVALHO, W. F. N.; MACIEL, N. M.; CRUZ, A. D.; SILVA, D. M.; BASTOS, R. P. Análises Mutagênicas de Anuros em áreas de Mineração de níquel. **Estudos**, v. 37, n. 9-10, p. 737-747, 2010. DOI: 10.18224/est.v39i2.2592.

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

GUIMARÃES, A. R. J. S. **Citotoxicidade Induzida pelo inseticida imidacloprido em células HEPG2**. 2020.54 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Animal) - Universidade Estadual Paulista – Júlio de Mesquita Filho. Dracena-SP, 2020.

GUPTA, P. K. Toxicity of Fungicides. In: GUPTA, R. **Veterinary Toxicology: basic and clinical principles**. 2. ed. Estados Unidos: Basic And Clinical Principles, 2018. Cap. 45. p. 569-580.

HAMILTON, D. J.; AMBRUS, Á.; DIETERLE, R. M.; FELSOT, A. S.; HARRIS, C. A.; HOLLAND, P. T.; KATAYAMA, A.; KURIHARA, N.; LINDERS, J.; UNSWORTH, J. Regulatory limits for pesticide residues in water (IUPAC Technical Report), **Pure and Applied Chemistry**, v. 75, n. 8, p. 1123-1155. 2003. DOI: <http://dx.doi.org/10.1351/pac200375081123>.

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

HAYASAKA, D.; KORENAGA, T.; SUZUKI, K.; SAITO, F.; SANCHEZ-BRAYO, F.; GOKA, K. Cumulative ecological impacts of two successive annual treatments of imidacloprid and fipronil on aquatic communities of paddy mesocosms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 80, p. 355-362, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.04.004>.

HEREK, J. S.; VARGAS, L.; TRINDADE, S. A. R.; RUTKOSKI, C. F.; MACAGNAM, N.; HARTMANN, P. A.; HATMANN, 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**, [S.L.], v. 27, n. 18, 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**, [S.L.], v. 81, p. 103516, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2020.103516>.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Boletim de comercialização de agrotóxicos e afins, histórico de vendas de 2000 a 2019.** 2019. Disponível em: < <http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#boletinsanuais> >. Acesso em: 02 mai. 2021.

IUCN. **International Union for Conservation of Nature Red List of Threatened Species**, 2021. Disponível em: <<https://www.iucnredlist.org/species/57258/11610839>>. Acesso em: 24 de abr. 2021.

JING, X.; YAO, G.; LIU, D.; LIU, C.; WANG, F.; WANG, P.; ZHOU, Z. Exposure of frogs and tadpoles to chiral herbicide fenoxaprop-ethyl. **Chemosphere**, v. 186, p. 832-838, 2017.

KINDEMBA, V. The impact of neonicotinoid insecticides on bumblebees, Honey bees and other non-target invertebrates. **Edinburgh Entomological Club**, p. 1-52, 2009.

KÖHLER, H.; TRIEBSKORN, R. Wildlife ecotoxicology of pesticides: can we track effects to the population level and beyond?. **Science**, [S.L.], v. 341, n. 6147, p. 759-765, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1237591>.

LAJMANOVICH, R. C.; CABAGNA-ZENKLUSEN, M. C.; ATTADEMO, A. M.; JUNGES, C. M.; PELTZER, P. M.; BASSO, A. Individual and Mixture Toxicity of Commercial Formulations Containing Glyphosate, Metsulfuron-Methyl, Bispyribac-Sodium, and Picloram on *Rhinella arenarum* Tadpoles. **Water Air Soil Pollut**, v. 224, n. 3, p.2–13, 2013. DOI: 10.1007/s11270-012-1404-1.

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

LOURENCETTI, C.; SPADOTTO, C. A.; SANTIAGO-SILVA, M.; RIBEIRO, M. Avaliação do potencial de contaminação de águas subterrâneas por pesticidas: Comparação entre métodos de previsão de lixiviação. **Pesticidas: Revista de ecologia e meio ambiente**, v. 15, p.1-14, 2005.

LOPES, C. V. A.; ALBUQUERQUE, G. S. C. de. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde em Debate**, v.42, n.117, p.518-534, 2018.

LOPES, F. C. **Toxicidade do biocida clorotalonil para o peixe estuário *Poecilia vivipara*.** 2017. 66 f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2017.

LÓPEZ-GONZÁLEZ, E. C.; LARRIERA, A.; SIROSKI, P. A.; POLETTA, G. L. Micronuclei and other nuclear abnormalities on *Caiman latirostris* (Broad-snouted caiman) hatchlings after embryonic exposure to diferente pesticide. **Ecotoxicology and**

**Environmental Safety**, v. 136, p. 84-91, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.10.035>.

LUSHCHAK, V. I.; MATVIISHYN, T. M.; HUSAK, V. V.; STOREY, J. M.; STOREY, K. B. Pesticide Toxicity: A mechanistic approach. **EXCLI Journal**, v.17, n.1, p. 1101-1136, 2018. DOI: <https://doi.org/10.17179/excli2018-1710>.

LV, P.; ZHANG, J.; SHI, T.; DAÍ, L.; LI, X.; WU, X.; LI, X.; TANG, J.; WANG, Y.; LI, Q. X.; HUA, R. Procyanidolic oligomers enhance photodegradation of chlorothalonil in water via reductive dechlorination. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 217, p.137-143, 2017.

MACAGNAN, N. **Avaliação dos efeitos letais e subletais dos inseticidas cipermetrina e fipronil em girinos de *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae)**. 2018. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Federal da Fronteira Sul, Erechim, 2018.

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

MANTOVANI, E. C. **Modelagem de lixiviação do herbicida picloram através de lisímetro de drenagem sob vegetação de *Brachiaria decumbens***. 2007. 154 f. Tese (Doutorado em engenharia Agrícola) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Agrícola: Campinas –SP, 2007.

MASSARO, F. C. **Estudos ecotoxicológicos com *Hydra viridissima* (Cnidaria: Hydrozoa)**. 2006. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de São Carlos, São Carlos, 2011.

MCDIARMID, R. W.; ALTIG, R. Diversity. Familial and generic characterizations. In: **Tadpoles: the biology of anuran larvae**. Chicago: The University of Chicago Press, 1999. Cap. 12, p. 295–337.

MCMAHON, T. A.; HALSTEAD, N. T.; JHNSON, S.; RAFFEL, T. R.; ROMANSIC, J. M.; CRUMRINE, P. W.; ROHR, J. R. Fungicide-induced declines of freshwater biodiversity modify ecosystem functions and services. **Ecology Letters**, v. 15, n. 7, p.714-722, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1461-0248.2012.01790.x>.

MÉNDEZ, M.; OBANDO, P.; PINNOCK-BRANFORD, M.; RUEPERT, C.; CASTILLO, L. E.; MENA, F.; ALVARADO, G. Acute, chronic and biochemical effects of chlorothalonil on *Agalychnis callidryas*, *Isthmohyla pseudopuma* and *Smilisca baudinii* tadpoles. **Environmental Science And Pollution Research**, v. 23, n. 21, p.21238-21248, 2016. DOI: 10.1007/s11356-016-7301-1.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Gabinete do Ministro. Portaria Nº 888. De 04 de Maio de 2021. Altera o Anexo XX da Portaria de Consolidação GM/MS nº 5, de 28 de setembro de 2017, para dispor sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário oficial da União**, 2021.

MIKÓ, Z.; UJSZEGI, J.; GÁL, Z.; HETTYEY, A.; Effects of a glyphosate-based herbicide and predation threat on the behaviour of agile frog tadpoles. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 140, p.96-102, 2017.

MOHD FUAD, M. J.; JUNAI, A.; HABIBAH, A.; HAMZAH, J.; TORIMAN, M. E.; LYNDON, N.; SELVADURAI, A. C. Er. S.; AZIMA, A. M. The Impact Of Pesticides On Paddy Farmers And Ecosystem. **Advances in Natural and Applied Sciences**, v.6, n.1, p.65-70, 2012.

MOREIRA, M. F. Resistência e Inseticidas: Estratégias, Desafios e Perspectivas no Controle de Insetos. In: MOREIRA, M. F.; MANSUR, J. F.; FIGUEIRA-MANSUR, J. **Resistência e Inseticidas: Estratégias, Desafios e Perspectivas no Controle de Insetos**. Rio de Janeiro: Inct, 2012. Cap. 15. p. 1-23.

MORESCO, R. M.; MARGARIDO, V. P.; OLIVEIRA, C. A persistent organic pollutant related with high frequency of hermaphroditism in the neotropical anuran *Physalaemus cuvieri* Fitzinger, 1826. **Environmental Research**, v. 132, p. 6-11, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2014.03.028>.

MOUTINHO, M. F. **Ecotoxicidade comparativa de herbicidas da cana-de-açúcar para larvas de anfíbios**. 2013. 118 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia. Instituto de Biociências) - Universidade de São Paulo. São Paulo, 2013.

NIKOLOFF, N.; NATALE, G. S.; MARINO, D.; SOLONESKI, S.; LARRAMENDY, M. L. Flurochloridone-based herbicides induced genotoxicity effects on *Rhinella arenarum* tadpoles (Anura: Bufonidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.100, p. 275–281. 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.10.021>.

ORDAZ-GUILLÉN, Y.; GALÍNDEZ-MAYER, C. J.; RUIZ-ORDAZ, N.; JUÁREZ-RAMIREZ, C.; SANTOYO-TEPOLE, F.; RAMOS-MONROY, O. Evaluating the degradation of the herbicides picloram and 2,4-D in a compartmentalized reactive biobarrier with internal liquid recirculation. **Environmental Science And Pollution Research**, v. 21, n.14, p. 8765-8773, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-014-2809-8>.

POLLO, F. E.; BIONDA, C. L.; SALINAS, Z. A.; SALAS, N. E.; MARTINO, A. L. Common toad *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867) and its importance in assessing environmental health: test of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes, **Environmental Monitoring Assessment**, v. 187, n. 9, p. 327-345, 2015. DOI: 10.1007/S10661-015-4802-1.

REBELO, R. M.; CALDAS, E. D. Avaliação de risco ambiental de ambientes aquáticos afetados pelo uso de agrotóxicos. **Química Nova**, v. 37, n. 7, p. 1199-1208, 2014.

RIERO, M. **Evaluación de la toxicidad provocada por el herbicida Picloram fórmula comercial Tordon ® 24K en larvas de Boana pulchella (Anura: Hylidae)**. 2019. 28f. Tesis de grado (Licenciado en Ciencias Biológicas), Universidad de la República - Facultad de Ciencias, Uruguay. 2019.

RIOS, F. M.; WILCOXEN, T. E.; ZIMMERMAN, L. M. Effects of imidacloprido on *Rana catesbeiana* immune and nervous system, **Chemosphere**, v. 188, p.465-469, 2017. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.08.155.

ROBINSON, S. A.; RICHARDSON, S. D.; DALTON, R. L.; MAISONNEU, F.; TRUDEAU, V. L.; PAULI, B. D.; LEE-JENKINS, S. S.Y. Sublethal Effects on Wood Frogs Chronically Exposed to environmentally relevant concentrations of two neonicotinoid insecticides. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 36, n. 4, p. 1101-11099, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/etc.3739>.

RODRIGUES, F. A C. **Ecogenotoxicologia dos agrotóxicos: Avaliação comparativa entre ecossistemas agrícola e área de proteção ambiental**. 2006. 112f. Tese (Doutorado em Patologia Molecular) - Universidade de Brasília, Faculdade de Medicina, Brasília-DF, 2006.

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

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

SILVA, H. S. V. P.; LOIOLA, C.; PEREIRA, S. R. F.; SANTOS, R. L.; ANDRADE, G. V.; NUNES, G. S. Toxicidade aguda e genotoxicidade do agrotóxico comercial folisuper 600BR a girinos de *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leiuperidae). **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 23, p. 1-10, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.5380/pes.v23i0.34994>.

SILVA, K. P. D. **USO DE BIOMARCADORES PARA AVALIAÇÃO DOS EFEITOS AGUDOS DA EXPOSIÇÃO DE HERBICIDA COMERCIAL EM PEIXE NEOTROPICAL, *Piaractus brachypomus***. 2020. 91 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal e Saude Pública) - Universidade Federal do Tocantins. Araguaína – TO, 2020.

SOUZA, L.; SILVA, A. G. Influência do Uso de Imidacloprido na Qualidade das Águas e Sedimentos da Micro-bacia do Rio do Carmo. **Orbital: The Electronic Journal of Chemistry**, v. 8, n. 4, p. 240-249, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.17807/orbital.v8i4.792>.

STANLEY, J.; PREETHA, G. Pesticide Toxicity to Silkworms: Exposure, Toxicity and Risk Assessment Methodologies. In: **Pesticide Toxicity to Non-Target Organisms**, p.229-275, 2016. DOI: [http://dx.doi.org/10.1007/978-94-017-7752-0\\_4](http://dx.doi.org/10.1007/978-94-017-7752-0_4).

STARNER, K.; GOH, K. S. Detections of the Neonicotinoid Insecticide Imidacloprid in Surface Waters of Three Agricultural Regions of California, USA, 2010–2011, **Bulletin Environmental Contamination and Toxicology**, v. 88, p. 316–321, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00128-011-0515-5>.



STEFFEN, G. P. K.; STEFFEN, R. B.; ANTONIOLLI, Z. I. Contaminação do solo e da água pelo uso de agrotóxicos. **Tecno-lógica**, v. 15, n. 1, p. 15-21, 2011.

TANG, G., WANG, B., DING, G., ZHANG, W., LIANG, Y., FAN, C.; DONG, H.; YANG, J.; KONG, D.; CAO, Y. Developing ionic liquid forms of picloram with reduced negative effects on the aquatic environment. **Science of the Total Environment**, v. 616-617, p. 128-134, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.288>.

TAVELLA, L. B.; SILVA, I. N.; FONTES, L. O.; DIAS, J. R. M.; SILVA, M. I. L. O uso de agrotóxicos na agricultura e suas consequências toxicológicas e ambientais. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 7, n. 2, p. 6-12, 2011.

THOMAS, K. V.; BROOKS, S. The environmental fate and effects of antifouling paint biocides. **Biofouling: The journal of Bioadhesion and Biofilm Research**, v. 26, n. 1, p. 73-88, 2010.

THUNNISSEN, N. W.; LAUTZ, L. S.; VAN SCHAİK, T. W. G.; HENDRIKS, A. J. Ecological risks of imidacloprid to aquatic species in the Netherlands: Measured and estimated concentrations compared to species sensitivity distributions. **Chemosphere**, [S.L.], v. 254, p. 126604, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126604>.

TOLEDO, L. F. Anfíbios como Bioindicadores. In: LEITÃO, N.; EL-DIER, S. **Bioindicadores da Qualidade Ambiental**. Recife: Instituto Brasileiro PróCidadania, 2009, p. 196-208.

USEPA. 1995. United States Environmental Protection Agency. **Prevention, Pesticides and Toxic Substances (7508W)**. Picloram, EPA-738-F-95-018. U.S.EPA.

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

USEPA. 1999. United States Environmental Protection Agency. **Prevention, Pesticides and Toxic Substances (7508C)**. Chlorothalonil, EPA-738-R-99-004. U.S.EPA.

VAN SCOY, A. R.; TJEERDEMA, R. S. Environmental Fate and Toxicology of Chlorothalonil. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 232, p. 89-105, 2014. DOI: [10.1007/978-3-319-06746-9\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-06746-9_4).

VANZETTO, G. V.; SLAVIERO, J. G.; 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**, [S.L.], v. 28, n. 9, p. 1105-1114, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10646-019-02115-0>.

YU, S.; WAGES, M. R.; COBB, G. P.; MAUL, J. D.; Effects of chlorothalonil on development and growth of amphibian embryos and larvae. **Environmental Pollution**, v. 181, p. 329-334, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2013.06.017>.

**APÊNDICE A - Resultados da ANOVA e teste de Tukey para as anormalidades nucleares de eritrócitos encontradas em girinos de *Physalaemus. gracilis*.**

<b>Agrotóxico</b>	<b>Anormalidade nuclear (ANE)</b>	<b>Valor de F</b>	<b>Valor de p (ANOVA)</b>	<b>Valor de p (Tukey)</b>	<b>Significativo para a concentração</b>
Picloram	Binucleada	$F_{4,45} = 2,90$	$p = 0,032$	$p < 0,05$	5
	Entalhada	$F_{4,45} = 10,79$	$p < 0,0001$	$p < 0,01$	3; 5 e 10
	Bolha/Broto	$F_{4,45} = 7,15$	$p = 0,0002$	$p < 0,01$	1,8; 3; 5; 10
	Lobada	$F_{4,45} = 5,81$	$p = 0,0007$	$p < 0,05$	1,8; 3; 5; 10
	Apoptose	$F_{4,45} = 1,48$	$p = 0,2236$	-	-
Imidacloprido	Binucleada	$F_{5,48} = 19,32$	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	100
	Entalhada	$F_{5,48} = 44,82$	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	50; 75 e 100
	Bolha/Broto	$F_{5,48} = 33,76$	$p < 0,0001$	$p < 0,01$	50 e 100
	Lobada	$F_{5,48} = 40,85$	$p < 0,0001$	$p < 0,05$	12,5; 50; 75 e 100
	Cariólise	$F_{5,48} = 7,27$	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	100
	Apoptose	$F_{5,48} = 5,34$	$p = 0,0006$	$p < 0,05$	100
Clorotalonil	Binucleada	$F_{4,40} = 1,73$	$p = 0,1617$	-	-
	Entalhada	$F_{4,40} = 179,7$	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	0,0005; 0,010; 0,025 e 0,05
	Bolha/Broto	$F_{4,40} = 2,30$	$p = 0,075$	-	-
	Lobada	$F_{4,40} = 16,50$	$p < 0,0001$	$p < 0,05$	0,0005; 0,010; 0,025 e 0,05
	Cariólise	$F_{4,40} = 5,18$	$p = 0,0018$	$p < 0,05$	0,0005

Fonte: Elaborado pela autora, 2021.