

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TÓXICO DO FORMALDEÍDO SOBRE
GIRINOS DE RÃ-TOURO (*Lithobates catesbeianus*)**

Juliana Macêdo Santana

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cláudia Maris Ferreira Mostério

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca - APTA - SAA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Pesca.

São Paulo

Outubro – 2014

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TÓXICO DO FORMALDEÍDO SOBRE
GIRINOS DE RÃ-TOURO (*Lithobates catesbeianus*)**

Juliana Macêdo Santana

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cláudia Maris Ferreira Mostério

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca - APTA - SAA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Pesca.

São Paulo

Outubro – 2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Elaborada pelo Núcleo de Informação e Documentação. Instituto de Pesca, São Paulo

S232a Santana, Juliana Macêdo
E Avaliação do potencial tóxico do formaldeído sobre girinos de rã-touro
(*Lithobates catesbeianus*) / Juliana Macedo Santana – São Paulo, 2014
vii, 57f. ; il. ; gráf. ; tab.

Dissertação (mestrado) apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca – APTA - Secretaria de Agricultura e
Abastecimento.
Orientadora: Cláudia Maris Ferreira Mostério

1. Genotoxicidade. 2. Citotoxicidade. 3. Hematologia. 4. Anfíbios. 5. Quitridiomicose.
I. Mostério, Cláudia Maris Ferreira. II. Título.

CDD 597.8



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

“AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TÓXICO DO FORMALDEÍDO SOBRE
GIRINOS DE RÃ-TOURO (*Lithobates catesbeianus*)”

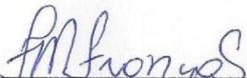
AUTOR: Juliana Macedo Santana

ORIENTADOR: Cláudia Maris Ferreira Mostério

Aprovado como parte das exigências para obtenção do título de
MESTRE EM AQUICULTURA E PESCA, Área de Concentração em
Aquicultura, pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. Cláudia Maris Ferreira Mostério

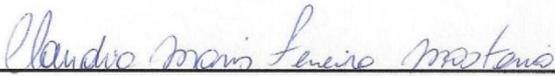


Dra. Fernanda Menezes França Salgueiro



Dr. Marcio Hipólito

Data da realização: 17 de outubro de 2014



Presidente da Comissão Examinadora
Profa. Dra. Cláudia Maris Ferreira

"Na vida, não vale tanto o que temos, nem tanto importa o que somos.
Vale o que realizamos com aquilo que possuímos e, acima de tudo,
importa o que fazemos de nós!"
(Chico Xavier)

"Desconfie do destino e acredite em você. Gaste mais horas realizando que
sonhando, fazendo que planejando, vivendo que esperando... Porque, embora
quem quase morre esteja vivo, quem quase vive, já morreu"
(Sarah Westphal)

Agradecimentos

Ao Instituto de Pesca pelo suporte logístico e acadêmico;

A CAPES por conceder a bolsa de Mestrado;

A minha orientadora, Dr^a Cláudia Maris Ferreira Mostério, que além de se tornar uma grande amiga e conselheira, me orientou de forma ímpar, aumentando meu entusiasmo e paixão em realizar esse trabalho;

Ao meu querido pai Evandro Macêdo Santana por me indicar sempre o melhor caminho a seguir, me oferecendo todo amparo nas horas difíceis. Saiba que me orgulho muito de você e te tenho como exemplo para a vida;

A minha mãe e melhor amiga Sélia Corrêa Gomes, por estar sempre presente, me apoiando e incentivando a sempre dar o meu melhor, mas me consolando quando as coisas não acontecem como planejado. Agradeço por ter passado mais essa fase comigo;

Ao meu irmão Renato Macêdo Santana, por ver o quanto fica feliz com minhas conquistas, e sempre me apoiar. Saiba que estarei com você para sempre, para o que der e vier;

Ao meu namorado Felipe Kenji, por todo apoio e incentivo nessa jornada, e acima de tudo, por ter compreendido meus momentos de tensão e ausência, me acalmando e animando;

Aos amigos de Pós-graduação, Ludmila Cristina Baldi Moreno, Munique de Almeida Bispo Moraes e Ricardo Gargiolo que foram extremamente importantes nos momentos de tensão, e também na alegria e descontração;

Ao técnico de laboratório Luiz, agradeço muito tudo que me foi ensinado, mas principalmente por ser um amigo no qual confio;

A todos do grupo que estiveram presentes nos experimentos, Patrícia Coelho Teixeira, João Batista, Márcio Hipolito, Fernanda Menezes França, Celso Rocha Filho e Adriana dos Reis. Não tenho palavras para agradecer o apoio, sem vocês este trabalho não seria realizado, afinal, ninguém faz nada sozinho;

Aos Doutores Fabio Cop Ferreira e Maria Letizia Petesse pelo auxílio nas análises estatísticas;

Ao secretário da pós-graduação, Ocimar, pela prontidão em me auxiliar como representante de turma;

A todos que torceram por mim e enviaram vibrações positivas, obrigada!

Sumário

Agradecimentos	i
Sumário	ii
Índice de tabelas e figuras	iv
Resumo geral	vi
Abstract general	vii
Introdução Geral	2
Referências Bibliográficas	4
Capítulo 1	8
Resumo.....	8
Abstract.....	9
Introdução.....	10
Materiais e Métodos.....	11
Análise estatística.....	13
Resultados e Discussão.....	14
Agradecimentos.....	17
Referências Bibliográficas.....	17
Capítulo 2	23
Resumo.....	23
Abstract.....	24
Introdução.....	25

Materiais e Métodos.....	26
Resultados e Discussão.....	29
Conclusão.....	33
Agradecimentos.....	34
Referências Bibliográficas.....	34
Considerações Finais.....	39
Anexos.....	41

Índice de tabelas e figuras

CAPÍTULO 1

Figura 1: Mortalidade acumulada (%) de girinos de *Lithobates catesbeianus* submetidos aos diferentes concentrações de formaldeído ao longo do teste de toxicidade aguda (CL_{50-96h}).....14

Figura 2: Gráfico de dispersão entre a dosagem de formaldeído e a frequência de micronúcleos (2.000 eritrócitos/lâmina) encontrados durante o teste de toxicidade aguda com girinos de *Lithobates catesbeianus*.....16

CAPÍTULO 2

Figura 1: Gráfico “box-plot” da frequência de micronúcleos, em girinos de *Lithobates catesbeianus*, medidos nos diferentes momentos (0h, 96h, 192 e 288h) ao longo do período de experimentação.....30

Figura 2: Gráfico da frequência de eritrócitos que apresentaram anomalias nucleares nos diferentes tratamentos (momento zero - 0h, controle negativo, 0,10mg/L, 0,88mg/L e 5,08mg/L) ao longo do período de experimentação.....32

Figura 3: Gráfico “box-plot” dos percentuais de hematócrito medidos no momento zero (0h) e nos diferentes tratamentos de formaldeído (controle negativo, 0,10mg/L, 0,88mg/L e 5,08mg/L).....33

Tabela 1: Percentuais da contagem diferencial de leucócitos, de girinos de *Lithobates catesbeianus*, no início do experimento (Momento Zero – 0h) e no final do experimento (288h – controle negativo, 0,10mg/L, 0,88mg/L e 5,08mg/L).....33

ANEXOS

Figura 1: Esquematização experimental do teste de exposição aguda, contendo as concentrações de 6mg/L, 9mg/L, 12mg/L, 15mg/L, 18mg/L de formaldeído (Vetec®), além do controle negativo, sem adição do produto.....42

Figura 2: Esquematização experimental do teste de exposição crônica, contendo as concentrações nominais de 0,10mg/L, 1,05mg/L e 5,26mg/L de formaldeído (Vetec®), além do controle negativo (sem adição do produto) e controle positivo (10000mg/L de dicromato de potássio).....43

Figura 3: Tanques de aclimação dos girinos.....	43
Figura 4: Tanques de água de abastecimento de clorada por pernoite.....	44
Figura 5: Delineamento experimental do teste de exposição aguda.....	44
Figura 6: Vista aproximada do aquário de 18mg/L pertencente ao teste de exposição aguda (ênfase aos animais mortos e apenas 1 sobrevivente).....	44
Figura 7: Delineamento experimental do teste de exposição crônica.....	45
Figura 8: Delineamento experimental do teste de exposição crônica.....	45
Figura 9: Coleta sanguínea do sangue extravasado do vaso caudal utilizando a pipeta.....	45
Figura 10: Coleta sanguínea no capilar do hematócrito.....	46
Figura 11: Micronúcleo em eritrócito de girino de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>) analisado em objetiva de imersão.....	46
Figura 12: Eritrócitos de girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>) com carioteca preservada.....	46
Figura 13: Eritrócito de rã-touro apresentando micronúcleo, cariorrexe e picnose.....	46
Tabela 1: Peso dos girinos de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>) no início do experimento.....	47
Tabela 2: Valores da análise de concentração efetiva de formaldeído na água nas quatro diferentes trocas de solução (0h, 96h, 144h e 240h).....	48
Tabela 3: Contagem de micronúcleo e análise da carioteca dos diferentes tratamentos (momento zero, controle negativo, 0,10mg/L, 0,88mg/L, 5,08mg/L e controle positivo) nos momentos 0h, 96h, 192h e 288h.....	48
Tabela 4: Contagem diferencial de leucócitos nos diferentes tratamentos (momento zero, controle negativo, 0,10mg/L, 0,88mg/L, 5,08mg/L e controle positivo) nos momentos 0h, 96h, 192h e 288h.....	52

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TÓXICO DO FORMALDEÍDO SOBRE GIRINOS DE RÃ-TOURO (*Lithobates catesbeianus*)

SANTANA, J.M.¹; FERREIRA, C.M.²

¹MSc. Instituto de Pesca, APTA/SAA, Avenida Francisco Matarazzo 455, Água Branca, São Paulo, Brasil. *e-mail: julianamacedo.bio@gmail.com. Tel. +55(11) 98165-1161

²Pesquisadora Científica - Instituto de Pesca, APTA/SAA, Avenida Francisco Matarazzo 455, Água Branca, São Paulo, Brasil. e-mail:claudia@pesca.sp.gov.br

Resumo geral

Atualmente diversas populações de anfíbios se encontram em declínio mundial, e dentre os diferentes fatores responsáveis pelo fenômeno, estão as doenças emergentes. A perda da biodiversidade tem aumentado a necessidade de estudos que controlem estes patógenos, por isso protocolos de desinfecção vem sendo testados no tratamento de diversas doenças, com maior enfoque atual à quitridiomiose, doença causada pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd). Entretanto, o potencial tóxico dos produtos testados sobre os anfíbios dificulta a padronização de um método de tratamento e desinfecção adequado. Um dos agentes químicos testados no controle do Bd é o formaldeído, um bactericida, fungicida e antiparasitário utilizado na aquicultura, embora seu potencial carcinogênico seja conhecido. A rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), criada comercialmente, é indicada como vetora da quitridiomiose por ser rústica comparativamente com outras espécies. Desta forma, a criação de animais livres da doença aumenta a sustentabilidade da criação, garantindo maior segurança aos animais nativos presentes no entorno do ranário. Com base neste cenário, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial tóxico do formaldeído sobre girinos de rã-touro, contribuindo com a literatura ainda escassa acerca do assunto, e servir de base para experimentos que avaliem a utilização do formaldeído como agente desinfetante em ranários. A CL_{50-96h} calculada para os girinos foi de 10,53mg/L, sendo que concentrações entre 6 e 18mg/L apresentaram potencial genotóxico, avaliado através do teste de micronúcleo (MN). Animais não expostos a contaminantes demonstraram frequência esperada de 1,35MN/indivíduo, tendo aumento desta frequência em 1,14% na adição de cada 1mg/L de formaldeído. O teste crônico, utilizando concentrações subletais definidas a partir da CL_{50-96h}, não apresentou potencial genotóxico (teste de micronúcleo) ou alterações hematológicas (contagem diferencial de leucócitos e microhematócrito) nos biomarcadores utilizados, entretanto, foi observado o fenômeno de citotoxicidade, com aumento de anomalias nucleares (picnose e cariorrexe) dos eritrócitos nas maiores concentrações ao final do experimento (288h). Com base nestes resultados, o formaldeído se mostrou um produto genotóxico para os girinos em altas concentrações, mas este fato não foi comprovado ao se usar este químico em concentrações baixas. Vale ressaltar que não é seguro afirmar que o formaldeído possa ser utilizado como desinfetante para a espécie, devido à necessidade da realização de testes complementares que avaliem outros possíveis efeitos nocivos da exposição às baixas concentrações.

Palavras-chave: genotoxicidade, citotoxicidade, hematologia, anfíbios, quitridiomiose.

EVALUATION OF THE POTENTIAL TOXIC EFFECTS OF FORMALDEHYDE ON TADPOLES OF BULLFROGS (*Lithobates catesbeianus*)

SANTANA, J.M.¹; FERREIRA, C.M.²

¹MSc. Instituto de Pesca, APTA/SAA, Av. Francisco Matarazzo 455, Água Branca, São Paulo, Brazil. e-mail: julianamacedo.bio@gmail.com. Tel. +55(11) 98165-1161

²Scientific Research - Instituto de Pesca, APTA/SAA, Av. Francisco Matarazzo 455, Água Branca, São Paulo, Brazil. e-mail:claudia@pesca.sp.gov.br

Abstract general

Currently many amphibian populations are in worldwide decline, and among the different responsible factors for the phenomenon, are emerging diseases. The loss of biodiversity has increased the studies to control these pathogens, and disinfection protocols are being tested in the treatment of several diseases, with most current approach to chytridiomycosis, a disease caused by the fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd), however some tested products in amphibians has presented toxic potential, difficulting to standardize a appropriate method of treatment and disinfection. One of the tested chemicals tested to control the Bd is the formaldehyde, a bactericidal, fungicidal and antiparasitic used in aquaculture, although have a potential carcinogenic. The bullfrog (*Lithobates catesbeianus*), created commercially, is indicated as the vector of chytridiomycosis because is most rustic comparatively with other species. Therefore, bullfrog farms without diseases ensure greater security for the native animals present in the area surrounding the farm. Based on this scenario, this work aimed to evaluate the toxic effects of formaldehyde on tadpoles of bullfrogs, contributing to the still scarce literature on the subject, and provide a basis for experiments that evaluate the use of formaldehyde as a disinfectant agent in frog farms . The LC_{50-96h} calculated for the tadpoles was 10,53mg/L, and concentrations between 6 and 18 mg/L showed genotoxic potential, measured by the micronucleus test (MN). Animals not exposed to contaminants showed an expected frequency of 1,35MN/individual, and a increase in this rate with an addition of 1.14% for each 1mg/L of formaldehyde addition. The chronic test using sublethal concentrations based in LC₅₀, don't showed genotoxic potential (micronucleus test) or hematological changes (differential leukocyte count and microhematocrit) in used biomarkers, however, the phenomenon of cytotoxicity was observed with increase of erythrocytes with nuclear anomalies (pyknosis and karyorrhexis) in greater concentrations at the end of the experiment (288 hours). Based on these results, formaldehyde showed a genotoxic effect in tadpoles in high concentrations but this fact was not proved when using this chemical at low concentrations. It is noteworthy that it is not safe to assert that formaldehyde can be used as a disinfectant for this specie due to the need to conduct additional tests that evaluate other deleterious effects possible at low concentrations exposure.

Keywords: genotoxicity, cytotoxicity, hematology, amphibians, chytridiomycosis.

INTRODUÇÃO GERAL

Introdução Geral

Populações de anfíbios estão em declínio e alguns grupos estão desaparecendo por completo de seus habitats naturais em várias partes do mundo (Wells, 2007; IUCN, 2014). Os fatores mais importantes para este processo são a perda da biodiversidade com a destruição de habitats, ou sua alteração, e a introdução de espécies invasoras e exóticas. Entretanto, esse declínio também atinge áreas protegidas e intactas, provavelmente por alterações climáticas, aumento da radiação UV-B, contaminação química, deformações e malformações e, por doenças infecciosas emergentes (Schloegel *et al.*, 2010; 2012; Verdade *et al.*, 2010).

As doenças emergentes, ranavírus e quitridiomycose são classificados como patógenos de maior importância no comércio internacional de anfíbios segundo a Office International des Epizooties e pelo Groupon Amphibian Diseases (Hyatt *et al.*, 2007). Para garantir a sanidade ambiental tanto dentro dos ranários, quanto no entorno, é imprescindível que existam métodos de desinfecção eficientes que não sejam nocivos aos animais tanto do cultivo, quanto nativos que por ventura invadam as instalações, garantindo assim a não transmissão do fungo caso ocorra eventual contato entre os animais.

Dentre os produtos utilizados no tratamento de doenças fúngicas, bacterianas e parasitárias na piscicultura encontra-se o formaldeído, indicado pela US Food and Drug Administration – FDA (2002), embora seja um agente químico considerado carcinogênico pela IARC (2014). Testes *in vitro* e também *in vivo* confirmam o potencial fungicida (Johnson *et al.*, 2003; Cruz *et al.*, 2005; Abtahi *et al.*, 2006; Nhu *et al.*, 2011; Nouth e Selim, 2013), entretanto, não existem protocolos definidos para desinfecção da rã-touro criada comercialmente.

O conhecimento adequado sobre os efeitos de xenobióticos é etapa inicial do processo de identificação do potencial de risco ambiental e consequente regularização do seu uso. Esta análise é imprescindível, entre outros, no procedimento de regularização do registro de produto veterinário, na profilaxia e tratamento de animais infectados (USEPA, 2002). Segundo Johnson *et al.*(2003) o desinfetante ideal deve atuar de forma rápida, ser seguro para humanos expostos, gerar um impacto mínimo sobre os equipamentos utilizados, possuir baixo potencial de contaminação do meio

ambiente, ser facilmente disponibilizado para uso, além do fato de que qualquer concentração do resíduo gerado não deve causar efeitos nocivos sobre a comunidade de anfíbios. Ao mesmo tempo, é sabido que o uso de todo e qualquer produto, mesmo que profilático, deve ser monitorado. Neste sentido, Campana *et al.*(2003) afirmam que um dos principais problemas no monitoramento de poluentes genotóxicos é a escolha do organismo teste, devido às diferenças existentes entre as espécies quanto à sensibilidade, causada por diferentes taxas de metabolismo, condições fisiológicas e órgão alvo. Os anfíbios anuros são utilizados como bioindicadores, pois além de sua sensibilidade, permanecerem intimamente ligados ao meio aquático e terrestre, sendo a rã-touro, um dos anfíbios mais utilizados em testes ecotoxicológicos (Fló-Neyret *et al.*, 2001; Rocha 2011; Ossana e Salibian, 2013).

Testes têm sido utilizados na determinação da toxicidade destes produtos profiláticos, sendo o teste de micronúcleo (MN), devido a sua simplicidade, uma das técnicas mais aplicáveis para identificar alterações genômicas nos animais expostos a agentes químicos. O procedimento é tecnicamente simples e mais rápido quando comparado com a análise microscópica de aberrações cromossômicas na metáfase, considerando também que muitos organismos aquáticos possuem cromossomos pequenos, dificultando a análise. Este ensaio tem como alvo células em intérfase, de qualquer população de células em proliferação, independentemente do cariótipo; esta é uma das razões pela qual este biomarcador é largamente utilizado em programas de biomonitoramento ambiental (Bolognesi e Hayashi, 2011). Métodos hematológicos indicam a toxicidade de agentes químicos, e dentre eles, existe o método do microhematócrito, que indica o percentual de eritrócitos no sangue, sendo o resultado dependente do volume destas células (Ranzani-Paiva *et al.*, 2013), verificando a presença ou não da anemia após a exposição ao xenobiótico, e a contagem diferencial de leucócitos, que indica a quantidade dos diferentes tipos de leucócitos no sangue periférico (Dias *et al.*, 2010). Os resultados da exposição dos girinos ao formaldeído poderão servir como base para o delineamento de protocolos de desinfecção para a espécie, contribuindo com a literatura ainda escassa acerca da exposição de anfíbios a este agente químico.

O presente trabalho encontra-se dividido em dois capítulos, na forma de artigos científicos. O primeiro capítulo, intitulado “Concentração Letal Mediana do formaldeído e seu potencial genotóxico sobre girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*)” teve como objetivo determinar a Concentração Letal Mediana (CL_{50-96h}) e elucidar o potencial genotóxico do formaldeído (Vetec®) para os girinos com base no teste de micronúcleo. O segundo artigo, intitulado “Toxicidade do formaldeído sobre girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*)”, objetivou avaliar através da exposição crônica, os efeitos de genotoxicidade e citotoxicidade deste químico, utilizando o teste de micronúcleo, microhematócrito e contagem diferencial de leucócitos como biomarcadores.

Referências Bibliográficas

- ABTAHI, B.; SHAFIEZADE, P.; NAZARI, R.M.; RASSOULI, A. 2006 Comparison of antifungal therapeutic indices of formalin, malachite green, and potassium permanganate in treating Persian Sturgeon eggs. *Journal of Applied Ichthyology*, 22: 291-293.
- BOLOGNESI, C.; HAYASHI, M. 2011 Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis* 26(1):205-213.
- CAMPANA, M.A.; PANZERI, A.M.; MORENO, V.J.; DULOUT, F.N. 2003 Micronuclei induction in *Rana catesbeiana* tadpoles by the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. *Genetics and Molecular Biology*, 26(1): 99-103.
- CRUZ, C.; FUJIMOTO, R.Y.; LUZ, R.K.; PORTELLA, M.C; MARTINS, M.L. 2005 Toxicidade aguda e histopatologia do fígado de larvas de trairão (*Hoplias lacerde*) expostas a solução aquosa de formaldeído a 10%. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, 15: 21-28.
- DIAS, D.C.; DE STÉFANI, M.V.; FERREIRA, C.M.; FRANÇA, F.M.; RANZANI-PAIVA, M. J.T.; SANTOS, A.A. 2010 Haematological and imunologic parameters of bullfrogs, *Lithobates catesbeianus*, fed probiotics. *Aquaculture Research*, 41: 1064-1071.
- FDA - Food and Drug Administration. *Supplemental new animal drug application*. 2002. Disponível em <<http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/Products/ApprovedAnimalDrugProducts/FOIADrugSymmaries/ucm069881.pdf>> Acesso em: 21 jan 2014.
- FLO-NEYRET, C.; LORENZI-FILHO, G.; MACCHIONE, M.; GARCIA, M.I.B.;

- SALDIVA, P.H.N. 2001 Effects of formaldehyde on the frog's mucociliary epithelium as a surrogate to evaluate air pollution effects on the respiratory epithelium. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 34:639-643.
- HYATT, A.D.; BOYLE, D.G.; OLSEN, V.; BOYLE, D.B.; BERGER, L.; OBENDORF, D.; DALTON, A.; KRIGER, K.; HERO, M.; HINES, H.; PHILLOT, R.; CAMPBELL, R.; MARANTELLI, G.; GLEASON, F.; COLLING. 2007 Diagnostic assay and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 73: 175-192.
- IARC - International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. v. 88, 483 p. Disponível em <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol88/index.php>>. Acesso em: 06 fev. 2014.
- IUCN - União Internacional para Conservação da Natureza. *IUCN Red List*. Disponível em <<http://www.iucnredlist.org/search>> Acesso em: 21 out. 2014.
- JOHNSON, M.L.; BERGER, L.; PHILIPS, L.; SPEARE, R. 2003 Fungicidal effects of chemical disinfectants, UV light, desiccation and heat on the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 57: 255-260.
- NHU, V.C.; NGUYEN, H.Q.; LE, T.L.; TRAN, M.T.; SORGELOOS, P.; DIERCKENS, K.; REINERTSEN, H.; KJORSVIK, E.; SVENNEVIG, N. 2011 *Cobia Rachycentron canadum* aquaculture in Vietnam: recent developments and prospects. *Aquaculture*, 315(1-2): 20-25.
- NOUTH, W.G.; SELIM, A.G. 2013 Toxopathological studies on the effects of formalin and cooper sulphate in tilapia as a commonly used disinfectant in aquaculture. *Journal Applied Environmental Biological Sciences*, 3(6): 7-20.
- OSSANA, N.A.; SALIBIAN, A. 2013 Micronucleus test for monitoring the genotoxic potential of the surface water of Luján River (Argentina) using erythrocytes of *Lithobates catesbeianus* tadpoles. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*, 8(1): 67-74.
- RANZANI-PAIVA, M.J.; PÁDUA, S.B.; TAVARES-DIAS, M.; EGAMI, M.I. 2013 *Métodos para análise hematológica em peixes*. Maringá: Eduem, 140p.
- ROCHA, C.A.M. 2011 The micronucleus test in erythrocytes of amphibian larvae as tool for xenobiotic exposure risk assessment: a brief review and an example using *Lithobates catesbeianus* exposed to cooper sulfate. *East Journal of Scientific Research*, 8(1): 23-29.

- SCHLOEGEL, L.M.; FERREIRA, C.M.; JAMES, T.; HIPOLITO, M.; LONGCORE, J.; HYATT, A.; YABSLEY; MARTINS, A.M.C.R.; MAZZONI, R.; DAVIES, A.J. & DASZAK, P. 2010 The North American Bullfrog (*Rana catesbeiana*) as a reservoir for the spread of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Brazil. *Animal Conservation*, 13: 53-61.
- SCHLOEGEL, L.M.; TOLEDO, L.F.; LONGCORE, J.E.; GREENSPAN, S.E.; VIEIRA, C.A.; LEE, M.; ZHAO, S.; WANGEN, C.; FERREIRA, C.M. ; HIPOLITO, M.; DAVIES, A.J.; CUOMO, C.A.; DASZAK, P.; JAMES, T.Y. 2012 Novel, panzootic and hybrid genotypes of amphibian chytridiomycosis associated with the bullfrog trade. *Molecular Ecology*, 21: 5162-5177.
- USEPA, United States Environmental Protection Agency. 2002 *Methods for mensuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms* .5.ed., 275p.
- VERDADE, V.K.; DIXO, M.; CURCIO, F.F. 2010 Os riscos de extinção de sapos, rãs e pererecas em decorrência das alterações ambientais. *Estudos Avançados*, 24(68): 161-172.
- WELLS, K. 2007 *The ecology and behaviour of amphibians*. Chicago: The University of Chicago Press. 1400p.

CAPÍTULO 1

Concentração Letal Mediana do formaldeído e seu potencial genotóxico sobre girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*)

SANTANA, J.M.¹ FERREIRA, C.M.²

¹MSc. Instituto de Pesca, APTA/SAA, Avenida Francisco Matarazzo 455, Água Branca, São Paulo, Brasil. *e-mail: julianamacedo.bio@gmail.com. Tel. +55(11) 98165-1161

²Pesquisadora científica - Instituto de Pesca, APTA/SAA, Avenida Francisco Matarazzo 455, Água Branca, São Paulo, Brasil. e-mail:claudia@pesca.sp.gov.br

Resumo

Populações de anfíbios estão em declínio, e dentre os fatores responsáveis pelo fenômeno está a doença quitridiomicose causada pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*. A rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) vem sendo indicada como um dos principais vetores desta doença e protocolos visando a desinfecção fúngica tem sido testados, entretanto o potencial tóxico de alguns produtos dificulta a padronização de um método eficaz. O formaldeído é um fungicida utilizado na aquicultura, embora seu potencial carcinogênico seja conhecido. Com base neste cenário, objetivamos determinar a Concentração Letal Mediana (CL_{50-96h}) do formaldeído em girinos de rã-touro, e avaliar os possíveis efeitos genotóxicos, contribuindo assim com a literatura ainda escassa acerca do assunto. Para tanto, os animais foram expostos às concentrações de 6, 9, 12, 15 e 18mg/L. Após 96h, amostras de sangue dos girinos sobreviventes foram retiradas para determinação do potencial genotóxico através do Teste de Micronúcleo. O valor calculado para a CL_{50-96h} foi de 10,53mg/L, e a frequência de micronúcleos (MN) em função da dosagem de formol, foi ajustada por um modelo linear generalizado, que indicou aumento da frequência de MN à medida que as concentrações aumentaram, sendo que a frequência estimada no controle negativo foi de 1,35MN/indivíduo. Com base nos resultados, é possível afirmar que o formaldeído tem potencial genotóxico sobre girinos de rã-touro nas concentrações testadas, e, portanto, sua utilização em protocolos de desinfecção deve ser avaliada com cautela.

Palavras-chave: quitridiomicose, ranicultura, anfíbios, micronúcleo.

Lethal concentration of formaldehyde and genotoxic potential for bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*)

SANTANA, J.M.¹; FERREIRA, C.M.²

¹MSc. Instituto de Pesca, APTA/SAA, Av. Francisco Matarazzo 455, Água Branca, São Paulo, Brazil. e-mail: julianamacedo.bio@gmail.com. Tel. +55(11) 98165-1161

²Scientific Research - Instituto de Pesca, APTA/SAA, Av. Francisco Matarazzo 455, Água Branca, São Paulo, Brazil. e-mail:claudia@pesca.sp.gov.br

Abstract

Amphibian populations are declining, and among the several factors responsible for the phenomenon is the chytridiomycosis disease caused by the fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. The bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) has been recommended as one of the main vectors of this disease and fungal disinfection protocols which have been tested, however the toxic potential of some products makes it difficult to standardize an effective method. Formaldehyde is a fungicide used in aquaculture, although the carcinogenic potential is known. Based on this scenario, we aimed to determine the Lethal Concentration (LC_{50-96h}) of formaldehyde in bullfrog tadpoles, and evaluate the possible genotoxic effects, thus contributing to the still scarce literature about the subject. For this purpose, the animals were exposed to concentrations of 6, 9, 12, 15 and 18mg/L. After 96 h, blood samples from surviving tadpoles were collected to determine the genotoxic potential using the micronucleus test. The calculated value for LC_{50-96h} was 10,53mg/L, and the frequency of micronuclei (MN) according to the formaldehyde concentration, was adjusted by a generalized linear model, which indicated an increase in frequency as the MN concentrations increased, and the estimated frequency in the negative control was 1,35MN/individual. Based on the results it is possible conclude that formaldehyde have a genotoxic potential on bullfrog tadpoles in tested concentrations, and so their use in disinfecting protocols should be carefully evaluated.

Keywords: chytridiomycosis, bullfrog farm, amphibians, micronucleus.

Introdução

Populações de anfíbios se encontram em declínio e alguns grupos estão desaparecendo por completo de seus habitats naturais em várias partes do mundo, sendo considerados como uma das classe de vertebrados mais ameaçada nos dias atuais (Bressan *et al.*, 2009; IUCN, 2014).

Os fatores mais importantes que contribuem para esse processo são a perda da biodiversidade com a destruição de habitats, ou sua alteração, a introdução de espécies invasoras e exóticas, alterações climáticas, aumento da radiação UV-B, contaminação química, deformações e malformações e, doenças infecciosas emergentes como a causada pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (quitridiomicose) e pelo vírus Ranavirus (ranavirose) (Berger *et al.*, 1999; Longcore *et al.*, 1999; Schloegel, *et al.*, 2010; Verdade *et al.*, 2010; Schloegel, *et al.*, 2012).

Algumas espécies de anuros também são utilizadas na alimentação humana, sendo a criação destes animais denominada “ranicultura” (FAO, 2014). A rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) é uma espécie criada comercialmente que vem sendo indicada como um dos principais vetores da quitridiomicose (Schloegel *et al.*, 2010; Greenspan *et al.*, 2012). Entretanto, estudo recente (Gervasi *et al.*, 2013) aponta a susceptibilidade deste animal conforme a virulência dos diferentes tipos de cepas. De qualquer forma, o fluxo bidirecional, consistindo na entrada de animais silvestres e escape de animais exóticos infectados, em ambiente de cultivo é preocupante (Neves, 2012).

A quitridiomicose foi classificada pela Office International des Epizooties (OIE) e pelo Groupon Amphibian Diseases como um dos patógenos de maior importância no comércio internacional de anfíbios, perdendo apenas para as ranaviruses (Hyatt *et al.*, 2007). O fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) sobrevive em meio aquático, possuindo dois ciclos de vida, o zoósporo (livre-nadante) que possui flagelos, e zoosporângio (fixo ao substrato) (Longcore *et al.*, 1999). O Bd é encontrado em estruturas queratinizadas de animais infectados, se alojando na pele em indivíduos adultos e na boca em girinos (Berger *et al.*, 1998), causando despigmentação. Entretanto, outros métodos de diagnóstico da doença devem ser realizados, visto que a falta de pigmentação é ocasionada também pela exposição a contaminantes químicos ou baixas

temperaturas (Rowe *et al.*, 1998; Parker *et al.*, 2002; Rachowicz, 2002; Hyatt *et al.*, 2007).

Protocolos visando a desinfecção fúngica têm sido testados “*in vivo*”, assim como “*in vitro*” no combate de culturas do Bd (Webb *et al.*, 2007; Martel *et al.*, 2010; Muijsers *et al.*, 2012), entretanto, o potencial tóxico de alguns fungicidas sobre diferentes espécies de anfíbios dificulta a padronização de um método fungicida eficaz. O desinfetante ideal deve atuar de forma rápida, ser seguro para humanos expostos, gerar um impacto mínimo sobre os equipamentos utilizados, possuir baixo potencial de contaminação do meio ambiente, ser facilmente disponibilizado para uso, além do fato de que qualquer concentração do resíduo gerado não cause efeito nocivo sobre a comunidade de anfíbios (Johnson *et al.*, 2003).

O formaldeído é um dos fungicidas utilizados na aquicultura, que por possuir diversas variedades de utilização devido à sua elevada reatividade, ausência de coloração, estabilidade, pureza na forma comercial e baixo custo, serve como agente de cura, desinfetante, fungicida e conservante (Johnson *et al.*, 2003; Cruz *et al.*, 2005; Abtahi *et al.*, 2006; FDA, 2002), ao mesmo tempo é considerado um produto carcinogênico (IARC, 2014).

Objetivamos com este estudo determinar a concentração letal mediana do formaldeído (Vetec®) para girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) e avaliar o potencial efeito genotóxico utilizando o Teste de Micronúcleo como biomarcador.

Materiais e métodos

O trabalho foi executado no Laboratório de Toxicologia Aquática do Instituto de Pesca, APTA/SAA, São Paulo, Brasil. Por se tratar de uma espécie exótica, a mesma não é encontrada em abundância no ambiente natural brasileiro, sendo assim, os animais (girinos de *Lithobates catesbeianus*) foram obtidos em ranário comercial do estado de São Paulo. A rã-touro foi escolhida como biomarcador, pois é um anfíbio já adaptado ao cativeiro e amplamente utilizado em estudos ecotoxicológicos, somando ao fato de existirem restrições legais na legislação brasileira que dificultam a utilização de animais silvestres em pesquisas científicas (Brasil, 2012).

As normas técnicas para condução dos ensaios seguiram as recomendações de acordo com protocolos pré-estabelecidos (APHA, 1998; ABNT, 2011; ASTM, 2007). A aclimação dos animais durou sete dias, e os mesmos foram mantidos em sala climatizada ($22^{\circ}\text{C} \pm 1,0$), com fotoperíodo controlado de 12:12, alimentados diariamente com 1% da biomassa do aquário, utilizando ração farelada (40% de proteína bruta, 12% fibra e 8% extrato etéreo) ofertada uma vez ao dia. Testes preliminares mantidos em sistema semi-estático (24h) foram realizados, e seus resultados serviram como base para determinação das dosagens do teste definitivo, sendo as concentrações nominais determinadas em 6mg/L, 9mg/L, 12mg/L, 15mg/L e 18mg/L de formaldeído (Vetec® - Brasil), além do grupo controle, sem adição de formaldeído.

No início do experimento definitivo, os girinos foram pesados em balança digital, apresentando peso médio de $5,99 \pm 1,49\text{g}$ e estágio de desenvolvimento entre 31 a 36 (Gosner, 1960). Este estágio foi selecionado por facilitar a extração de sangue caudal dos animais, provendo quantidade suficiente de amostra para condução do Teste de Micronúcleo realizado para a avaliação genotóxica.

Ao longo do teste os animais foram mantidos em aquários preenchidos por 8L de solução, aeração constante, com quatro réplicas por tratamento e densidade de 1girino/L, seguindo recomendação de protocolo padrão (APHA, 1998), totalizando oito girinos por réplica. O teste de toxicidade aguda teve duração de 96h utilizando água de abastecimento declorada por pernoite, e a renovação das soluções feita a cada 24h (sistema semi-estático) devido à alta volatilidade do produto. Por este mesmo motivo a solução estoque foi preparada no dia exato de cada intoxicação.

Não houve fornecimento de alimento durante a exposição ao agente químico, diminuindo assim o aporte orgânico dentro dos aquários, minimizando possíveis interferências e alterações na concentração de formaldeído (Hohreiter e Rigg, 2001).

A análise das variáveis de qualidade da água (temperatura, oxigênio dissolvido, condutividade elétrica e pH) foram realizadas no momento zero (antes da experimentação), às 48 e 96 horas, utilizando a sonda

multiparâmetros HORIBA®, e os animais mortos foram contados e retirados diariamente.

O efeito genotóxico foi avaliado nos animais sobreviventes às 96 horas de experimentação (três animais por réplica - 12 girinos por tratamento) através da retirada do sangue por punção do vaso caudal, utilizando lidocaína em creme como anestésico local. As lâminas foram feitas em duplicata e analisadas em teste cego. Cada lâmina foi fixada em metanol PA durante 10 minutos, seca ao ar e imersa em ácido clorídrico 5N por outros 10 minutos, posteriormente corada pelo método de Fielgen/Fast Green, adaptado para girinos de *L. catesbeianus* (Ferreira *et al.*, 2003). Para contabilização da frequência de micronúcleos (MN) existentes, foram avaliados 2.000 eritrócitos por lâminas (n=53) utilizando microscópio de luz, com objetiva de imersão (1000x).

Análise Estatística

Os dados de qualidade da água foram submetidos à análise de tendência central e dispersão, avaliando o coeficiente de variação de cada parâmetro (Zar, 1999). A Concentração Letal Mediana (CL_{50-96h}) do formaldeído foi estimada através do Software Gwbasis 3,0, de acordo com o método estatístico “Trimmed Spearman Karber” (Hamilton *et al.*, 1977). A contagem de MN, em função da dosagem de formol, foi ajustada por um modelo linear generalizado (GLM) assumindo a distribuição binomial negativa como função de distribuição da variável resposta. A distribuição binomial negativa foi definida pelos parâmetros μ representando a média, e k um parâmetro de dispersão. A variância foi dada por $\mu + \mu^2/k$ e a parte sistemática do GLM binomial negativo por $E(Y) = \mu = e^{\beta_0 + \beta_1 X}$, onde β_0 e β_1 são parâmetros de intercepto e inclinação do modelo. O percentual de explicação do modelo foi calculado como $\frac{\text{null deviance} - \text{residual deviance}}{\text{null deviance}} \times 100$ (Zuur *et al.*, 2009).

Resultados e discussão

Os dados de qualidade da água apresentaram valores médios de pH de $5,60 \pm 0,40$, temperatura de $17,41 \pm 0,46^\circ\text{C}$, oxigênio dissolvido de $6,38 \pm 0,39\text{mg/L}$ e condutividade elétrica de $96,74 \pm 6,53\mu\text{S/cm}$. Com base na análise estatística, não foram encontradas diferenças significativas para as variáveis físicas e químicas da água analisados nas cinco concentrações de formaldeído, assim como entre estas médias e o grupo controle. Estas variáveis mantiveram-se dentro dos valores indicados para a condução de testes de toxicidade para a espécie (Lombardi *et al.*, 2002).

O valor estimado da Concentração Letal Mediana (CL_{50-96h}) do formaldeído para girinos de *L. catesbeianus* foi de $10,53\text{mg/L}$. Não houve mortalidade no controle negativo, e a maior concentração alcançou quase 100% de mortalidade, restando apenas 1 girino sobrevivente às 96h, sendo que 50% das mortes nesta concentração foram registradas às 48h (Figura 1).

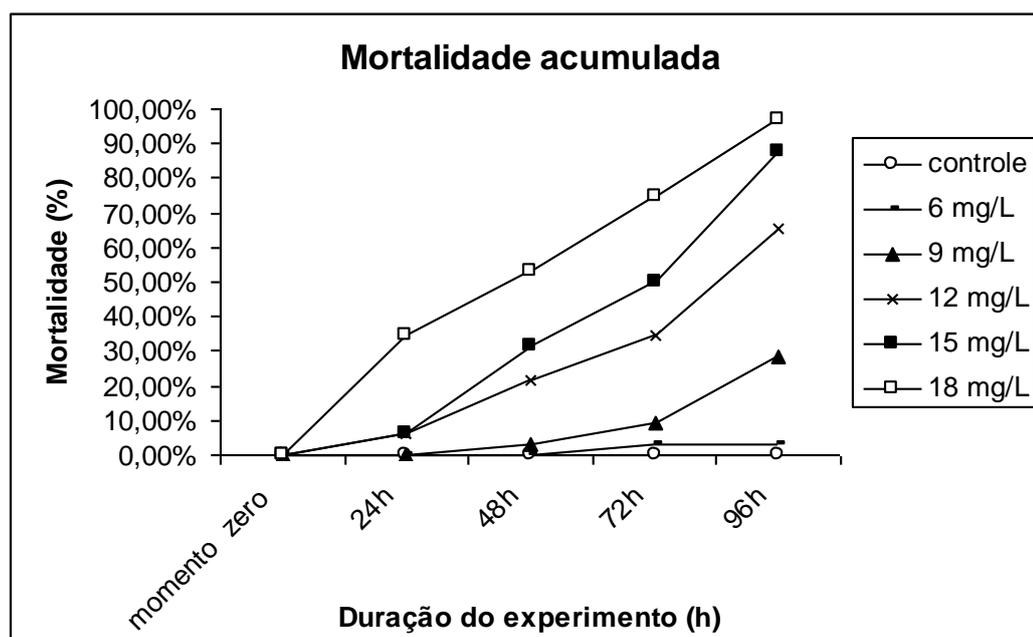


Figura 1: Mortalidade acumulada (%) de girinos de *L. catesbeianus* submetidos aos diferentes concentrações de formaldeído ao longo do teste de toxicidade aguda (CL_{50-96h}).

Em artigo de revisão sobre o formaldeído (Hohreiter e Rigg, 2001) a CL_{50-96h} reportada para rã-touro foi de $9,52\text{mg/L}$ (dados ajustados), similar a encontrada em nossos testes. Os autores ressaltaram também que a

toxicidade deste produto é maior para animais menores e que os girinos de rãs são mais sensíveis que a maioria das espécies de peixes e de invertebrados aquáticos.

Outros estudos determinaram a CL_{50-96h} para o formaldeído em sistema estático para outros organismos aquáticos: Dureza (1994) reporta a concentração de 148mg/L para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), Hohreiter e Rigg (2001) determinaram 48,8mg/L para truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e 21,78mg/L para bagre-americano (*Ictalurus punctatus*), a concentração de 2,02mg/L foi determinada para larvas de trairão (*Hoplias lacerdae*), segundo Cruz *et al.* (2005), indicando que a rã-touro é uma espécie bastante sensível se comparado com a maioria dos peixes (Hohreiter e Rigg, 2001).

O formol é um composto ubíquo classificado como cancerígeno para humanos, tumorogênico e teratogênico por produzir efeitos na reprodução (IARC, 2014; INCA, 2014), entretanto na piscicultura, ele é indicado no tratamento parasitário e controle fúngico (FDA, 2002).

O banho de formol na profilaxia ou tratamento de parasitoses de beijupirás adultos reporta o uso de concentrações entre 10 a 30mg/L de formol ao longo de uma hora sob intensa aeração (Nhu *et al.*, 2011), indicando valores semelhantes ao indicado para a rã *Xenopus tropicalis*, no tratamento do Bd, que é de 25mg/L, entretanto esta concentração gerou mortalidade das rãs nas 48 horas iniciais do tratamento, indicando alta toxicidade (Parker *et al.*, 2002).

A utilização deste agente químico foi testada para o tratamento de infecção micótica causada por *Saprolegnia sp* em ovos de esturjão persa (Abtahi *et al.*, 2006)., obtendo eficácia desinfetante com 1920mg/L de formaldeído, valor muito próximo da CL_{50-96h} estimada de 1900mg/L, concentração letal mediana extremamente superior ao encontrado no teste com os girinos. Este mesmo experimento revelou o potencial altamente tóxico do formaldeído por mostrar alteração de 48% na taxa de eclosão na menor concentração utilizada, de 400mg/L. A proximidade da eficácia fungicida e da concentração letal mediana indicam alto potencial tóxico do formaldeído para a espécie, portanto os autores não indicaram o formaldeído como um bom fungicida para os ovos de esturjão persa.

Para avaliação da genotoxicidade, foi realizado o Teste de Micronúcleo com um total de 53 amostras, sendo que nas maiores concentrações, em virtude da maior mortalidade a quantidade examinada de lâminas foi menor. A dispersão entre a dosagem de formaldeído utilizada e a quantidade de MN observados pode ser visualizada na Figura 2.

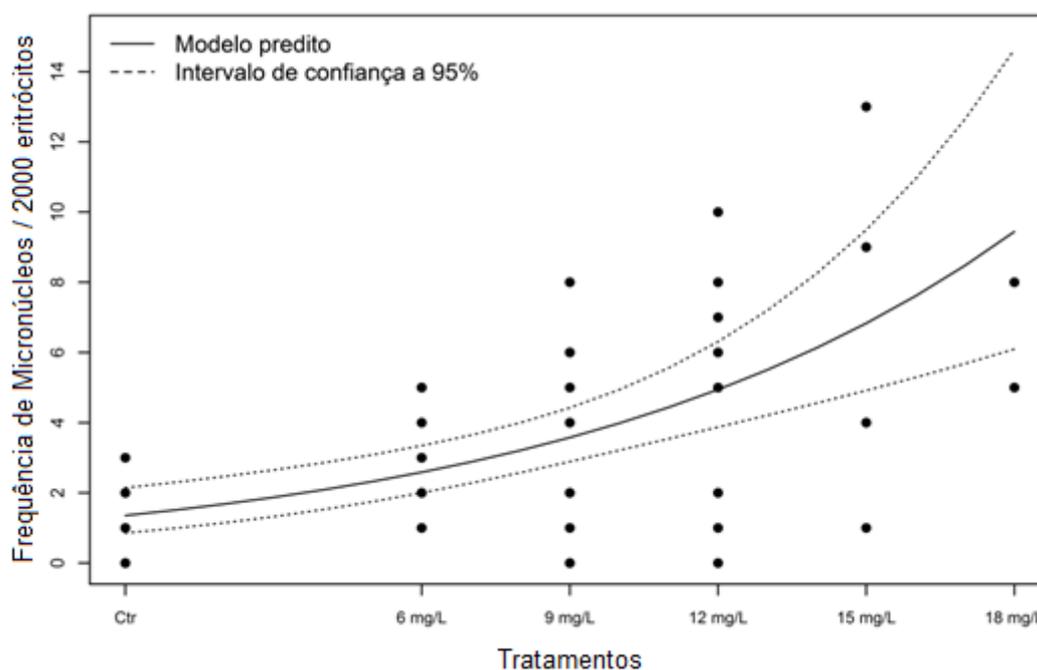


Figura 2: Gráfico de dispersão entre a dosagem de formaldeído e a frequência de micronúcleos (2.000 eritrócitos/lâmina) encontrados durante o teste de toxicidade aguda com girinos de *Lithobates catesbeianus*.

Houve uma relação positiva entre a frequência de MN e a dosagem de formol, sendo que o GLM binomial negativo explicou 26,94% da variabilidade nesta relação. À medida que a dosagem de formol aumenta, a variabilidade na contagem de MN cresce, o que se dá pela ocorrência de células/indivíduo com números cada vez mais elevados de MN, enquanto outros girinos mantêm valores de frequência próximos ou iguais a zero. Este aumento na variância justifica o uso do GLM com a distribuição binomial negativa (coeficiente de dispersão $k = 3,35$). De acordo com o estimador do intercepto ($\hat{\beta}_0 = 0,303, p = 0.196$), na ausência de formol (grupo controle) é esperado uma média de 1,35MN por girino ($e^{0,303} = 1,35$), entretanto, este valor não é estatisticamente diferente de zero. Valores entre 0 e 6MN foram encontrados no controle

negativo, esta frequência de MN é similar ao descrito por outros autores, que citam valores entre 3 e 5MN por indivíduo, quando estes não estão expostos a contaminantes (controle negativo), na contagem de 1000 eritrócitos/lâmina (Krauter, 1993; Ossana e Salibian, 2013).

O coeficiente de inclinação ($\hat{\beta}_1 = 0,108, p < 0.001$) sugere que adições de 1mg/L de formol resultam no incremento médio a uma taxa de 11,14% na contagem de micronúcleos por indivíduo ($e^{0,108} = 1,114$).

Existem poucos trabalhos relacionados aos níveis de tolerância dos anfíbios ao formaldeído, inclusive de animais nativos, que podem ser atingidos pelo resíduo gerado na aquicultura, que em contato com outras substâncias, formam misturas complexas, mais tóxicas que as originais. Entretanto, a rã-touro tem se mostrado um bioindicador eficaz de genotoxicidade, tendo aumento da incidência de MN e anomalias nucleares quando exposta a contaminantes diversos (Campana *et al.*, 2003; Ferreira, 2003; Rocha, 2011). Com este estudo, confirmamos o potencial genotóxico da exposição aguda do formaldeído sobre a rã-touro, podendo assim contribuir com a literatura ainda escassa acerca do assunto.

Agradecimentos

Agradecemos ao Instituto de Pesca pelo suporte logístico e disponibilização dos laboratórios e à CAPES pela bolsa de mestrado concedida. Gostaríamos de agradecer também à equipe técnica envolvida nos nomes de Maria Letizia Petesse e Luiz Evangelista, assim como a todos os envolvidos neste trabalho, que tornaram possível sua concretização.

Referências Bibliográficas

- ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. 2011 *NBR 15088: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes*. 19p.
- ABTAHI, B.; SHAFIEZADE, P.; NAZARI, R.M.; RASSOULI, A. 2006 Comparison of antifungal therapeutic indices of formalin, malachite green, and potassium permanganate in treating Persian Sturgeon eggs. *Journal of Applied Ichthyology*, 22: 291-293.
- APHA; AWWA; WPCF.1998 *Standard methods for the examination of water*

and wastewater. APHA – American public Health association, 20.ed.

ASTM - AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. 2007 *Standard guide for conducting acute toxicity tests on test materials with fishes, macroinvertebrates and amphibians*. ASTM, 22 p.

BERGER, L.; SPEARE, R.; DASZAK, P.; GREEN, D.E.; CUNNINGHAM, A. A.; GOGGIN, C.L.; SLOCOMBE, R.; RAGAN, M.A.; HYATT, A.D.; MCDONALD, K.R.; HINES, H.B.; LIPS, K.R.; MARANTELLI, G.; PARKER, H. 1998 Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rainforests of Australia and Central America. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95: 9031-9036.

BERGER, L.; SPEARE, R.; HYATT, A. 1999 Chytrid fungi and amphibian declines: overview, implications and future directions. Declines and disappearances of Australian frogs. *Environment Australia*, 23-33.

BRASIL. CFBio. Conselho Federal de Biologia. Resolução nº 301, de 8 de dezembro de 2012. Dispõe sobre os procedimentos de captura, contenção, marcação, soltura e coleta de animais vertebrados in situ e ex situ, e dá outras providências. 2014. Disponível em <<http://www.cfbio.gov.br/resolucoes-cfbio/145-resolucao-no-301-de-8-de-dezembro-de-2012?format=pdf>> Acesso em: 23 out. 2014.

CAMPANA, M.A.; PANZERI, A.M.; MORENO, V.J.; DULOUT, F.N. 2003 Micronuclei induction in *Rana catesbeiana* tadpoles by the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. *Genetics and Molecular Biology*, 26(1): 99-103.

CRUZ, C.; FUJIMOTO, R.Y.; LUZ, R.K.; PORTELLA, M.C; MARTINS, M.L. 2005 Toxicidade aguda e histopatologia do fígado de larvas de trairão (*Hoplias lacerde*) expostas a solução aquosa de formaldeído a 10%. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, 15: 21-28.

DUREZA, L.A. 1994 Toxicity of formalin and potassium permanganate to *Oreochromis niloticus* fry and fingerlings and subsequent gill pathology. *Research Digest*, 1(2): 357-358.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Cultured Aquatic Species Information Programme (2014). Disponível em <http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Rana_catesbeiana/en> Acesso em: 2 setembro 2014.

FDA - Food and Drug Administration. *Supplemental new animal drug application* 2002. Disponível em <<http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/Products/ApprovedAnimalDrugProducts/FOIADrugSymmaries/ucm069881.pdf>> Acesso em: 21 jan 2014.

FERREIRA, C.M. 2003 Teste de toxicidade aquática para monitoramento

ambiental. *Biológico*, 65(1-2): 17-18.

FERREIRA, C.M.; GUIMARÃES, H.M.B.; RANZANI-PAIVA, M.J.; SOARES, S.R.; RIVERO, D.H.R.F.; SALDIVA, P.H.N. 2003 Hematological markers of copper toxicity in *Rana catesbeiana* tadpoles (Bullfrog). *Revista Brasileira de Toxicologia*, 16(2): 83-88.

GERVASI, S.S.; URBINA, J.; HUA, J.; CHESTNUT, T.; RELYEA, R.A.; BLAUSTEIN, A.R. 2013 Experimental Evidence for American Bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) Susceptibility to Chytrid Fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*). *Ecohealth*, 10: 166-171.

GOSNER, K.L. 1960 A simplified table for standing anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, 16: 183-90.

GREENSPAN, S.E.; CALHOUN, A.J.K.; LONGCORE, J.E.; LEVY, M.G. 2012 Transmission of *Batrachochytrium dendrobatidis* to wood frogs (*Lithobates sylvaticus*) via a bullfrog (*L. Catesbeianus*) vector. *Journal of Wildlife Diseases*, 48(3): 575-582.

HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, R.V. 1977 Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science and Technology*, 11(7): 714-719.

HOHREITER, D.W.; RIGG, D.K. 2001 Derivation of ambient water quality criteria for formaldehyde. *Chemosphere*, 45: 471-486.

HYATT, A.D.; BOYLE, D.G.; OLSEN, V.; BOYLE, D.B.; BERGER, L.; OBENDORF, D.; DALTON, A.; KRIGER, K.; HERO, M.; HINES, H.; PHILLOT, R.; CAMPBELL, R.; MARANTELLI, G.; GLEASON, F.; COLLING. 2007 Diagnostic assay and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 73: 175-192.

IARC - International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. v. 88, 483 p. Disponível em <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol88/index.php>>. Acesso em: 06 fev. 2014.

INCA - Instituto Nacional de Câncer. *Formol ou formaldeído*. Disponível em <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=795> Acesso em: 12 jul. 2014.

JOHNSON, M.L.; BERGER, L.; PHILIPS, L.; SPEARE, R. 2003 Fungicidal effects of chemical disinfectants, UV light, desiccation and heat on the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 57: 255-260.

KRAUTER, P.W. 1993 Micronucleus incidence and hematological effects in

bullfrog tadpoles (*Rana catesbeiana*) exposed to 2-acetylaminofluorene and 2-aminofluorene. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 24: 487-493.

LOMBARDI, J. V.; FERREIRA, C. M., MACHADO-NETO, J. G.; MARQUES, H. L. A. 2002 Acute Toxicity of the Fungicide Copper Oxochloride to Tadpoles of the Bullfrog *Rana catesbeiana*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 69(3): 415-420.

LONGCORE, J.E.; PESSIER, A.P.; NICHOLS, D.K. 1999 *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia*, 91: 219-227.

MARTEL, A.; ROOIJ, P.V.; VERCAUTEREN, G.; BAERT, K.; WAEYENBERGHE, L.V.; DEBACKER, P.; GARNER, T.W.J.; WOELTJESS, T.; DUCATELLE, R.; HAESBROUCK, F.; PASMANS, F. 2010 Developing a safe antifungal treatment protocol to eliminate *Batrachochytrium dendrobatidis* from amphibians. *Medical Mycology Month*, 1-7.

MUIJSERS, M.; MARTEL, A.; ROOIJ, P.V.; BAERT, K.; VERCAUTEREN, G.; DUCATELLE, R.; BACKER, P.; VERCAMMEN, F.; HAESBROUCK, F.; PASMANS, F. 2012 Antibacterial therapeutics for the treatment of chytrid infection in amphibians: Collumbus's egg?. *Veterinary Research*, 8:175.

NEVES, P. H. V. 2012 *Presença de ranavírus em rãs-touro, Lithobates catesbeianus, provenientes de ranários da região sudeste do Brasil*. Dissertação de Mestrado. São Paulo, SP. 58p. Instituto de Pesca.

NHU, V.C.; NGUYEN, H.Q.; LE, T.L.; TRAN, M.T.; SORGELOOS, P.; DIERCKENS, K.; REINERTSEN, H.; KJORSVIK, E.; SVENNEVIG, N. 2011 Cobia *Rachycentron canadum* aquaculture in Vietnam: recent developments and prospects. *Aquaculture*, 315(1-2): 20-25.

OSSANA, N.A.; SALIBIAN, A. 2013 Micronucleus test for monitoring the genotoxic potential of the surface water of Luján River (Argentina) using erythrocytes of *Lithobates catesbeianus* tadpoles. *Ecotoxicology Environmental Contamination*, 8(1): 67-74.

PARKER, J.M.; MIKAEILIAN, I.; HAHN, N.; DIGGS, H.E. 2002 Clinical diagnosis and treatment of epidermal chytridiomycosis in African clawed frog (*Xenopus tropicalis*). *Comparative Medicine*, 52(3): 265-268.

RACHOWICZ, L.J. 2002 Mouthpart pigmentation in *Rana muscosa* tadpoles: seasonal changes without chytridiomycosis. *Herpetological Review*, 33: 263-265.

ROCHA, C.A.M. 2011 The micronucleus test in erythrocytes of amphibian larvae as tool for xenobiotic exposure risk assessment: a brief review and an example using *Lithobates catesbeianus* exposed to cooper sulfate.

- ROWE, C.L.; KINNEY, O.M.; CONGDON, J.D. 1998 Oral deformities in tadpoles of the bullfrog (*Rana catesbeiana*) caused by conditions in a polluted habitat. *Copeia*, 1: 244-246.
- SCHLOEGEL, L.M.; FERREIRA, C.M.; JAMES, T.; HIPOLITO, M.; LONGCORE, J.; HYATT, A.; YABSLEY; MARTINS, A.M.C.R.; MAZZONI, R.; DAVIES, A.J. & DASZAK, P. 2010 The North American Bullfrog (*Rana catesbeiana*) as a reservoir for the spread of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Brazil. *Animal Conservation*, 13: 53-61.
- SCHLOEGEL, L.M.; TOLEDO, L.F.; LONGCORE, J.E.; GREENSPAN, S.E.; VIEIRA, C.A.; LEE, M.; ZHAO, S.; WANGEN, C.; FERREIRA, C.M. ; HIPOLITO, M.; DAVIES, A.J.; CUOMO, C.A.; DASZAK, P.; JAMES, T.Y. 2012 Novel, panzootic and hybrid genotypes of amphibian chytridiomycosis associated with the bullfrog trade. *Molecular Ecology*, 21: 5162-5177.
- VERDADE, V.K.; DIXO, M.; CURCIO, F.F. 2010 Os riscos de extinção de sapos, rãs e pererecas em decorrência das alterações ambientais. *Estudos Avançados*, 24(68): 161-172.
- WEBB, R.; MENDEZ, D.; BERGER, L.; SPEARE, R. 2007 Additional disinfectants effective against the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 74: 13-17.
- ZAR, J.H. *Biostatistical Analysis*. 1999 New Jersey: Prentice Hall. 946p.
- ZUUR, A.F.; IENO, E.N.; WALKER, N.J.; SVELIEV, A.A.; SMITH, G.M. 2009 *Mixed effects models and extensions in Ecology with R*. New York: Springer.

CAPÍTULO 2

TOXICIDADE DO FORMALDEÍDO SOBRE GIRINOS DE RÃ-TOURO (*Lithobates catesbeianus*)

SANTANA, J.M.¹; FERREIRA, C.M.²

¹MSc. Instituto de Pesca, APTA/SAA, Avenida Francisco Matarazzo 455, Água Branca, São Paulo, Brasil. *e-mail: julianamacedo.bio@gmail.com. Tel. +55(11) 98165-1161

²Pesquisadora científica - Instituto de Pesca, APTA/SAA, Avenida Francisco Matarazzo 455, Água Branca, São Paulo, Brasil. e-mail:claudia@pesca.sp.gov.br

Resumo

Estudos ecotoxicológicos utilizando anfíbios têm se ampliado devido ao declínio mundial de diversas espécies com consequente perda da biodiversidade, e dentre os processos responsáveis pelo declínio está a infecção de anuros por doenças emergentes. Protocolos de desinfecção têm sido testados no tratamento de diversas doenças, tendo centrado esforços no tratamento da quitridiomiose, doença causada pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*, onde a rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), criada comercialmente, é indicada como vetor da doença por apresentar resistência a diversas cepas. A fim de avaliar os possíveis efeitos nocivos à rã-touro frente a esta desinfecção, girinos desta espécie foram expostos a diferentes concentrações subletais, sendo elas 0,10mg/L, 0,88mg/L e 5,08mg/L, além do controle negativo sem adição do produto, e o positivo, neste caso o dicromato de potássio (10.000mg/L). Amostras sanguíneas foram submetidas à análise genotóxica e citotóxica através do teste de micronúcleo, análise de microhematócrito e contagem diferencial de leucócitos. Foi observada citotoxicidade, consistindo no aumento do número de eritrócitos com carioteca alterada ao final do experimento, mas os demais testes não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos com formaldeído e o grupo controle, indicando que o formaldeído nestas concentrações não gerou outros efeitos nocivos que pudessem ser evidenciados através dos biomarcadores utilizados. Estes resultados contribuem com a literatura ainda escassa acerca do assunto, e servem como base para experimentos que avaliem possíveis efeitos do formaldeído em girinos de rã-touro expostos a baixas concentrações.

Palavras-chave: desinfecção, genotoxicidade, citotoxicidade, ranário, quitridiomiose.

TOXICITY OF FORMALDEHYDE IN BULLFROG TADPOLES (*Lithobates catesbeianus*)

SANTANA, J.M.¹; FERREIRA, C.M.²

¹MSc. Instituto de Pesca, APTA/SAA, Av. Francisco Matarazzo 455, Água Branca, São Paulo, Brazil. e-mail: julianamacedo.bio@gmail.com. Tel. +55(11) 98165-1161

² Scientific Research - Instituto de Pesca, APTA/SAA, Av. Francisco Matarazzo 455, Água Branca, São Paulo, Brazil. e-mail:claudia@pesca.sp.gov.br

Abstract

Ecotoxicological studies using amphibians have been expanded due to the worldwide decline of several species with consequent loss of biodiversity and among the processes responsible for the decline is the infection of frogs by emerging diseases. Disinfection protocols have been tested in the treatment of various diseases, with focused efforts on treatment of chytridiomycosis, a disease caused by the fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*, where the bullfrog (*Lithobates catesbeianus*), created commercially, is indicated as a vector of the disease because is resistant to several strains. In order to assess the deleterious effects at bullfrog front of this disinfection, tadpoles of this specie were exposed to different sublethal concentrations, which were 0.10mg/L, 0.88mg/L and 5,08mg/L, beyond the control negative and positive, in this case the potassium dichromate (10.000mg/L). Blood samples were used to the micronucleus test, microhematocrit and differential leukocyte count. Cytotoxicity was observed, consisting of increased to nuclear anomalies in red blood cells with altered at the end of the experiment, but the other tests showed no significant differences between treatments with formaldehyde and the control group, indicating that formaldehyde at these concentrations did not cause other harmful effects that could be evidenced by this biomarkers. These results contribute to the still scarce literature on the subject, and serve as basis for experiments that assess possible effects of formaldehyde in bullfrog tadpoles exposed to low concentrations.

Keywords: disinfection, genotoxicity, cytotoxicity, bullfrog farm, chytridiomycosis.

1. Introdução

Estudos ecotoxicológicos utilizando anfíbios têm se ampliado, em grande parte, devido ao declínio mundial de diversas espécies com consequente perda da biodiversidade (Webb *et al.*, 2007; Schloegel *et al.*, 2010; Verdade *et al.*, 2010; Schloegel *et al.*, 2012). Dentre os processos responsáveis pelo declínio está a infecção de anuros por doenças emergentes, dentre elas o ranavírus e a quitridiomicose, classificados como os patógenos de maior importância no comércio internacional de anfíbios segundo a *Office International des Epizooties* (OIE) e pelo *Group on Amphibian Diseases* (Hyatt *et al.*, 2007).

Protocolos utilizando diferentes agentes químicos foram testados como medida preventiva ou terapêutica para controle do ranavírus (Bryan *et al.*, 2009), porém a grande maioria dos protocolos atuais têm centrado esforços no tratamento contra a quitridiomicose.

Esta doença é causada por zoósporos do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd), fungo que se aloja dentro das células de regiões queratinizadas, e se encontram cercados por estruturas celulares modificadas, explicação da grande sensibilidade do fungo aos fungicidas em testes *in vitro* e a dificuldade de cura em testes *in vivo* (Longcore *et al.*, 1999; Berger *et al.*, 2005). Controlar esta doença e estabilizar as populações de anfíbios ameaçadas de extinção, em cativeiro e na natureza, se tornou uma prioridade na conservação de anfíbios (Muijsers *et al.*, 2012). A grande problemática acerca da quitridiomicose envolve entre outros fatores, a ranicultura, onde as doenças as quais os anuros estão susceptíveis representam uma séria ameaça aos ecossistemas aquáticos, seja através de uma visão produtiva ou ecológica (Neves, 2012). A espécie *Lithobates catesbeianus*, popularmente conhecida como rã-touro, espécie alvo da criação em ranários no Brasil (FAO, 2014), é considerada um dos principais agentes vetores da quitridiomicose, por ser resistente a diversas cepas (Greenspan *et al.*, 2012), entretanto, estudo recente demonstra a sensibilidade da espécie conforme o estágio de desenvolvimento e a virulência da cepa de Bd (Gervasi *et al.*, 2013).

Para garantir a sanidade ambiental tanto dentro dos ranários, quanto no entorno, é imprescindível que existam métodos de desinfecção eficientes que não sejam nocivos aos animais tanto do cultivo, quanto nativos que por ventura invadam as instalações, garantindo assim a não transmissão de doenças caso

ocorra eventual contato entre os animais. O tratamento fúngico, bacteriano e parasitário é indicados na piscicultura, e dentre os produtos utilizados encontra-se o formaldeído, indicado pela US Food and Drug Administration – FDA (2002). Testes *in vitro* e também em ovos, larvas e peixes de cultivo confirmam o potencial fungicida (Johnson *et al.*, 2003; Cruz *et al.*, 2005; Abtahi *et al.*, 2006; Nhu *et al.*, 2011; Nouth e Selim, 2013), entretanto não existem protocolos definidos para desinfecção em criações da rã-touro. Os anfíbios anuros são utilizados como bioindicadores, pois além de sua sensibilidade, permanecem intimamente ligados ao meio aquático e terrestre, sendo a própria rã-touro, um dos anfíbios mais utilizados em testes ecotoxicológicos (Fló-Neyret *et al.*, 2001; Rocha 2011; Ossana e Salibian, 2013).

Os avanços no tratamento clínico de algumas doenças de anfíbios têm apresentado sucesso terapêutico (Chinnaduraie e Kane, 2014), entretanto a toxicidade dos agentes químicos dificulta a padronização de métodos eficazes e seguros. Neste sentido, este estudo teve como objetivo determinar concentrações seguras da exposição de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) ao formaldeído, avaliando efeitos de genotoxicidade, citotoxicidade e alguns parâmetros hematológicos. Espera-se que os resultados de toxicidade do formaldeído obtidos neste estudo possa servir como base para o delineamento de protocolos de desinfecção para a espécie.

2. Materiais e Métodos

O trabalho foi executado no Laboratório de Toxicologia Aquática do Instituto de Pesca, APTA/SAA, São Paulo, Brasil. Os girinos de *Lithobates catesbeianus* utilizados na experimentação foram adquiridos em ranário comercial do estado de São Paulo. O teste seguiu as recomendações da American Public Health Association-APHA (1998), ABNT (2011) e American Society for Testing and Materials-ASTM (2007),.

Testes anteriores determinaram a Concentração Letal Mediana (96h) do formaldeído (Vetec® - Brasil) para girinos da rã-touro na mesma fase de desenvolvimento como 10,53mg/L. A partir deste resultado, foram determinadas três concentrações nominais de formaldeído a serem utilizadas (CL₅₀/2, CL₅₀/10, CL₅₀/100): 5,26mg/L, 1,05mg/L e 0,10mg/L, além do controle

negativo, sem adição do produto, e de um positivo. A utilização do dicromato de potássio a 10.000mg/L, se deu por se tratar de um composto conhecidamente genotóxico para a espécie alvo (Monteiro *et al.*, 2010). No Brasil, o Ministério do Trabalho (Brasil, 1978) determinou o patamar de exposição ocupacional para humanos de 1,6 a 2,3ppm até 48/semana, valores aproximados ao testado no experimento, não havendo extrapolação do limite de exposição humana.

Os girinos com peso médio de $9,43 \pm 1,38$ g e estágio de desenvolvimento 31 a 36 (Gosner, 1960), foram previamente aclimatados durante sete dias em sala climatizada ($22^{\circ}\text{C} \pm 1,0$), mantidos em fotoperíodo controlado de 12:12, alimentados diariamente com 0,5% da biomassa/dia (ração farelada com 40 de proteína bruta, 12% de fibras e 8% de extrato etéreo), ofertada em duas porções diárias. Utilizou-se água de abastecimento público declorada por pernoite durante a aclimação e ao longo do experimento. O teste de toxicidade crônica teve duração de 12 dias, conduzido em sistema semi-estático com renovação das soluções a cada 48 horas, sendo que a preparação da solução estoque de formaldeído foi realizada no dia exato das trocas, devido à alta volatilidade do composto. A avaliação dos parâmetros de qualidade da água (pH, temperatura, oxigênio dissolvido e condutividade elétrica) ocorreu antes e após a renovação das soluções, sendo que trinta minutos antes das renovações os animais foram alimentados com 0,5% biomassa a cada dois dias, utilizando a mesma ração da aclimação, e os registros de mortalidade feitos diariamente

Durante o experimento, os girinos foram mantidos em aquários contendo 12L e aeração constante, sendo quatro réplicas por tratamento e densidade de 1girino/L, com exceção do controle positivo, que devido à sua toxicidade, consistia em apenas 1 aquário.

Para determinar a concentração efetiva do formaldeído na água, amostras de 500mL foram retiradas de um aquário por tratamento antes e após a renovação total das soluções. A análise correspondente aos valores nominais de 1,05mg/L e 5,26mg/L, foi realizada por detecção em espectrofotômetro e obteve concentrações efetivas de 0,88mg/L e 5,08mg/L, respectivamente. A concentração de 0,10mg/L não foi mensurada por ser inferior ao limite de detecção do teste utilizado nas análises.

No momento zero, portanto, anterior ao início do experimento, coletou-se amostras sanguíneas de 12 girinos, a fim de avaliar os valores iniciais dos biomarcadores utilizados no teste. Ao longo do teste crônico foram coletadas amostras de três animais por aquário às 96, 192 e 288 horas após o início do experimento para realização do teste de micronúcleo. A retirada do sangue ocorreu por punção do vaso caudal utilizando lidocaína como anestésico local.

As lâminas, pré-lavadas, foram feitas em duplicata, fixadas em metanol PA durante 10 minutos, secas ao ar, imersas em ácido clorídrico 5N por outros 10 minutos, e coradas pelo método de Fielgen/Fast Green, adaptado para girinos de *L. catesbeianus* (Ferreira *et al.*, 2003). Para contabilização da quantidade de MN existentes, foram avaliados 2.000 eritrócitos por lâminas (n=165), e a leitura realizada em microscópio de luz, com objetiva de imersão (1000 x) em teste cego. Além da frequência de MN foram verificadas também anomalias na carioteca, tais como picnose e cariorrexe. Esta análise qualitativa determinou 2 categorias de contagem (preservada e alterada), sendo considerados valores abaixo de 20% de eritrócitos com anomalias nucleares como presença de carioteca preservada e superiores a 50%, alterada. A fim de complementar as informações hematológicas, o sangue coletado no momento zero (inicial) e ao final do experimento (288 horas), também foi utilizado para determinação do hematócrito (Ht), que se deu pelo método do microhematócrito, além da preparação de lâminas destinadas à contagem diferencial de leucócitos coradas pelo método Rosenfeld (Ranzani-Paiva *et al.*, 2013).

A análise estatística dos dados de qualidade da água foram submetidos à análise de tendência central e dispersão, avaliando o coeficiente de variação. A contagem de micronúcleos (Y) em função da dosagem de formol (X , mg/L) e tempo de exposição foi ajustada por um modelo linear generalizado (GLM) assumindo a distribuição de Poisson como função de distribuição da variável resposta. Para a parte sistemática do GLM de Poisson foi dado por $E(Y) = \mu = e^{\beta_0 + \beta_1 D + \beta_2 T}$, onde, β_0 , β_1 e β_2 são parâmetros de intercepto e inclinação do modelo, D é a dosagem de formol e T o tempo de exposição. “ D ” foi considerado uma variável categórica com 3 níveis: controle negativo, 0,10 mg/L, 0,88 mg/L e 5,08 mg/L, o tempo de exposição variou entre 98 e 288 horas. O percentual de explicação do modelo foi calculado como

$\frac{\text{null deviance} - \text{residual deviance}}{\text{null deviance}} \times 100$, a probabilidade de significância do efeito dosagem de formaldeído e do tempo de exposição foram obtidas pela comparação da razão de verossimilhança (*likelihood ratio test* - LRT) do modelo completo com os modelos parciais, tendo somente um dos fatores incluso (Zuur *et al.*, 2009). Os dados hematológicos (microhematócrito e de contagem diferencial de leucócitos) foram submetidos ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade das variâncias (Levene) Em caso de dados paramétricos, aplicou-se o teste “t” e ANOVA, e para análise de dados não-paramétricos, aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis, e Bonferroni *a posteriori*, considerando diferenças significativas quando $p < 0,05$ (Zar, 1999).

3. Resultados e Discussão

As variáveis de qualidade da água apresentaram valores médios de pH de $6,06 \pm 0,92$, temperatura de $22,31 \pm 1,52^\circ\text{C}$, oxigênio dissolvido de $7,55 \pm 1,65 \text{mg/L}$ e condutividade elétrica de $69,15 \pm 14,03 \mu\text{S/cm}$. Os parâmetros se mantiveram dentro dos valores consideráveis aceitáveis para a manutenção deste tipo de organismo em ensaios toxicológicos (Lombardi *et al.*, 2002), permanecendo estáveis durante a realização do teste, sendo que ao longo do experimento não houve mortalidade entre os tratamentos.

Houve uma relação positiva entre a contagem média de micronúcleos e o tempo de exposição (LRT = 49,38, $p < 0,001$) visualizado na Figura 1, porém não houve relação com a dosagem de formaldeído (LRT = 5,54, $p = 0,136$). O percentual de explicação do modelo foi de 16%, sendo que o modelo somente com o tempo de exposição incluso explicou 14,4%. Os percentuais médios de MN foram de 1,42 no momento zero, 1,40 no controle negativo, 1,51 em 0,10mg/L, 1,62 em 0,88mg/L, 2,12 em 5,08mg/L e 4,67 no controle positivo, o que possibilita afirmar uma maior incidência de micronúcleos em animais expostos ao dicromato de potássio, entretanto devido ao fato de o controle positivo ser composto por apenas 1 aquário, a quantidade de animais analisados foi menor, um total de 12 girinos enquanto os outros tratamentos analisaram um total de 36.

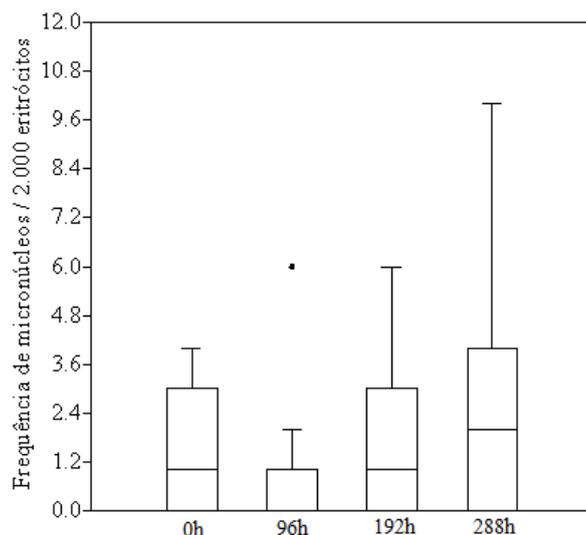


Figura 1: Gráfico “box-plot” da frequência de micronúcleos, em girinos de *Lithobates catesbeianus*, medidos nos diferentes momentos (0h, 96h, 192 e 288h) ao longo do período de experimentação.

Os resultados do presente estudo não evidenciaram alterações na frequência de MN nas concentrações de 0,10, 0,88 e 5,08mg/L, entretanto outros estudos demonstram alterações histológicas, onde concentrações de 1,25, 2,5 e 5mg/L de formaldeído gera alteração nas funções mucociliares no palato da rã-touro em ensaio agudo *in vitro* (Fló-Neyret *et al.*, 2001). Bueno-Guimarães *et al.* (2001), avaliaram concentrações de 0,5 e 2mg/L deste químico em girinos da mesma espécie, encontrando hiperplasia da epiderme às 48h de exposição e do epitélio branquial às 24 e 96h, porém sem registro de mortalidade.

O poder fungicida do formaldeído foi comprovado em teste *in vitro* a 10mg/L, utilizando cultura do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Johnson *et al.*, 2003). O uso de 25mg/L de formaldeído durante quatro dias é indicado no tratamento da quitridiomiose em *Xenopus tropicalis*, mesmo havendo mortalidade nas primeiras 48h (Parker *et al.*, 2002). Entretanto, esse valor é superior a CL_{50-96h} calculada para a rã-touro, de 10,53mg/L, havendo a necessidade de adaptar o protocolo. As propriedades fisiológicas da pele de anfíbios proporcionam oportunidades e desafios para a administração de medicamentos que são exclusivas a este táxon, qualquer medicamento tópico aplicado a um anfíbio, embora permita fácil administração, deve considerar a

existência de um grau de absorção sistêmica, visto que há aumento do risco de toxicidade sistêmica com o uso de algumas medicações tópicas (Chinnaduraie e Kane, 2014). No tratamento parasitário de anfíbios, que incluem a infestação por *Trichodina spp*, são indicados banhos de 1,5mg/L de formaldeído durante 10 minutos a cada 48h até total desinfestação (Pessier, 2002), levando em consideração os resultados dos testes realizados com a rã-touro, a concentração de 1,5mg/L não gerou efeitos genotóxicos bem como no microhematócrito e contagem diferencial de leucócitos, entretanto, como já descrito, gera alterações histológicas nas brânquias e pele que não levaram à letalidade.

Diversas concentrações de formaldeído têm sido testadas acerca da eficácia quimioterápica e os possíveis efeitos nocivos no tratamento também em outros animais aquáticos, sendo que alevinos de jundiá infectados com *Ichthyophthirius multifiliis* tratados com o método recomendado para a maioria dos peixes tropicais, que consiste em banho profilático de 790mg/L de formaldeído ao longo de 1 hora durante 4 dias, apresentaram hiperplasia das brânquias e alta mortalidade, indicando alta toxicidade do formaldeído para esta espécie (Carneiro *et al.*, 2006). Estudo realizado com corredora bicuda (*Corydora melanistius*) exposta às concentrações de 0,3 a 200mg/L (96h) não apresentaram alterações histológicas nas concentrações abaixo de 50mg/L, indicando baixa toxicidade para a espécie (Santos *et al.*, 2011), entretanto, valores abaixo de 50mg/L testados em de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) apresentaram genotoxicidade, com aumento na frequência de MN proporcional ao aumento das concentrações (Mert *et al.*, 2014).

A citotoxicidade pode estar relacionada ao surgimento do câncer através da estimulação da divisão celular sendo, portanto, um evento relevante para a carcinogênese. Substâncias genotóxicas geram, além do MN, outras anomalias nucleares. A picnose e cariorrexe são anomalias nuclear relacionadas à apoptose celular, que em excesso indicam resposta a um dano genotóxico (Tolbert *et al.*, 1992; Krauter, 1993; Ferreira *et al.*, 2003). Neste estudo, agrupando os resultados em apenas cariotecas “preservadas” e “alteradas”, houve aumento das células com anomalias nucleares ao longo do experimento (Figura 2), passando de 25% (momento zero) para 50% nas maiores concentrações de formaldeído (0,88 e 5,08mg/L), indicando que o formaldeído

gera uma relação positiva entre o acréscimo das anomalias nucleares e aumento das concentrações utilizadas.

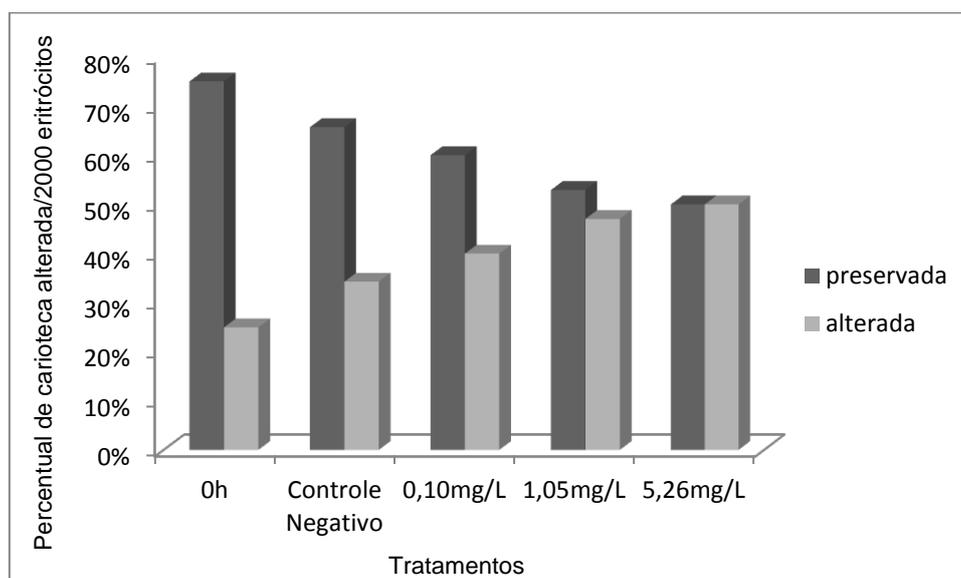


Figura 2: Gráfico da frequência de eritrócitos de girinos de *Lithobates catesbeianus*, que apresentaram anomalias nucleares nos diferentes tratamentos (momento zero - 0h, controle negativo, 0,10mg/L, 0,88mg/L e 5,08mg/L) ao longo do período de experimentação.

Os percentuais médios de Hematócrito (Ht) obtidos no momento zero, controle negativo, 0,10mg/L, 0,88mg/L, 5,08mg/L e no controle positivo foram respectivamente 34%, 35,58%, 31,75%, 31,92%, 33,75% e 31%. Os valores de Ht medidos no momento zero e controle negativo foram submetidos ao teste *t* e não apresentaram diferença significativa ($p=0,33$), o que nos possibilita afirmar que os animais se mantiveram em condições estáveis durante o experimento. Os valores medidos entre os tratamentos de formaldeído e o controle negativo não demonstraram diferenças significativas ($p=0,29$) (Figura 3). Com base nos testes foi possível concluir que não houve alteração dos percentuais de Ht na exposição dos girinos ao formaldeído.

Girinos de rã-touro expostos ao sulfato de zinco ao longo de 14 dias também não apresentaram alteração nos percentuais de hematócrito, embora alterações hematológicas tenham sido encontradas (Marcantonio *et al.*, 2011), entretanto a tilápia do Nilo, quando exposta ao formaldeído a 25mg/L durante 10 dias apresentou diferença no percentual de hematócrito, além de apresentar

alterações histológicas nas brânquias, baço, rim, hepatopâncreas e músculo (Nouth e Selim, 2013).

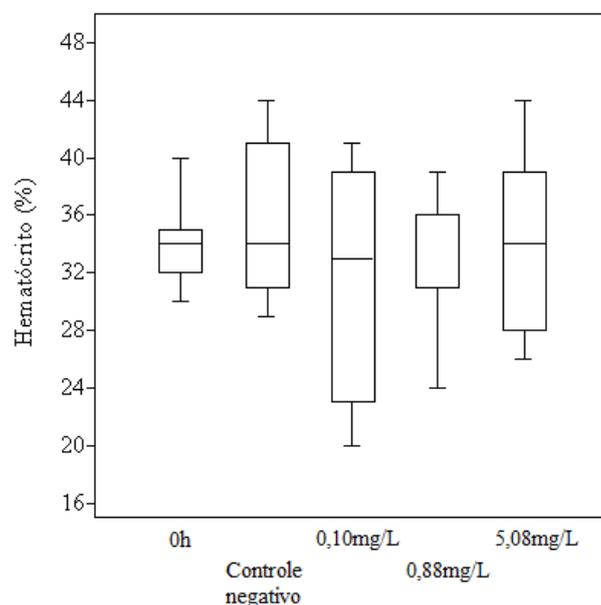


Figura 3: Gráfico “box-plot” dos percentuais de hematócrito de girinos de *Lithobates catesbeianus*, medidos no momento zero (0h) e nos diferentes tratamentos de formaldeído (controle negativo, 0,10mg/L, 0,88mg/L e 5,08mg/L).

Os dados da contagem diferencial de leucócitos (Tabela 1) apresentaram alteração no percentual de linfócitos e neutrófilos entre o momento zero e controle negativo. Isto se deve à possível alteração da cinética hematológica ao longo do teste e adaptação dos animais. Não houve diferença entre os percentuais medidos nos diferentes tratamentos (controle negativo, 0,10mg/L, 0,88mg/L e 5,08mg/L) ao final do teste ($p > 0,05$), portanto não houve alteração nos percentuais de leucócitos do sangue periférico dos girinos após exposição ao formaldeído.

Tabela 1: Percentuais da contagem diferencial de leucócitos, de girinos de *Lithobates catesbeianus*, no início do experimento (Momento Zero – 0h) e no final do experimento (288h – controle negativo, 0,10mg/L, 0,88mg/L e 5,08mg/L).

	Linfócitos (%)	Neutrófilos (%)	Basófilos (%)	Eosinófilos (%)	Monócitos (%)
Momento Zero	89,50	5,28	2,42	1,77	1,03
Controle Negativo	95,01	2,11	1,44	0,90	0,54
0,10mg/L	95,85	2,10	0,96	0,67	0,42
0,88mg/L	93,31	2,56	2,60	1,26	0,27

5,08mg/L	93,06	2,46	2,06	1,66	0,76
Controle Positivo	94,07	2,37	1,87	1,20	0,48

Existe maior dificuldade em desenvolver uma estratégia de tratamento que seja eficaz para diversas espécies, e embora o campo veterinário que trata da terapêutica de anfíbios ainda esteja em um estágio inicial, ele vem crescendo ao longo dos últimos anos (Chinnaduraie e Kane, 2014). O formaldeído, quando utilizado em baixas concentrações indicou a citotoxicidade do agente químico devido ao aumento da quantidade de eritrócitos com anomalias nucleares, entretanto não produziu efeitos visíveis através dos biomarcadores utilizados, visto que não foram encontradas alterações na frequência de MN, percentual de hematócrito e contagem diferencial de leucócitos nos girinos de *L. catesbeianus*, concomitante ao aumento das concentrações utilizadas.

A classificação do formaldeído como um composto de baixa toxicidade não garante que este possa ser utilizado sem comprometer o bem-estar animal (Santos *et al.*, 2012), portanto, a fim de minimizar o risco de afirmar que o formaldeído não seria um composto genotóxico nestas concentrações subletais para *L. catesbeianus*, é necessário propor a realização de estudos complementares que avaliem outros possíveis efeitos nocivos gerados por diferentes biomarcadores em girinos expostos.

Agradecimentos

Agradecemos ao Instituto de Pesca pelo suporte logístico e disponibilização dos laboratórios e à CAPES pela bolsa de mestrado concedida. Gostaríamos de agradecer também à equipe técnica envolvida nos nomes de Maria Letizia Petesse e Luiz Evangelista, assim como a todos os envolvidos neste trabalho, que tornaram possível sua concretização.

5. Referências Bibliográficas

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. 2011 NBR 15088: *Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes*. São Paulo, 19p.

ABTAHI B, SHAFIEZADE P, NAZARI, RM, RASSOULI A. 2006 Comparison of

antifungal therapeutic indices of formalin, malachite green, and potassium permanganate in treating Persian Sturgeon eggs. *Journal of Applied Ichthyology*, 22:291-293.

ASTM - American Society For Testing And Materials. 2007 *Standard guide for conducting acute toxicity tests on test materials with fishes, macroinvertebrates and amphibians*. ASTM, 22 p.

APHA; AWWA; WPCF.1998 *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 20. ed. APHA – American public Health association, Washington DC.

BERGER, L.; HYATT, A.D.; SPEARE, R.; LONGCORE, J.E. 2005 Life cycle stages of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 68:51-63.

BRASIL, Ministério do Trabalho. Portaria 3.214 de 8 de junho de 1978. *Norma regulamentadora nº15. Dispõe sobre atividades e operações insalubres*. Diário oficial da União, Brasília, 6 jul. 1978. Disponível em <[http://portal.mte.gov.br/data/files/FF8080812DF396CA012E0017BB3208E8/NR-15%20\(atualizada_2011\).pdf](http://portal.mte.gov.br/data/files/FF8080812DF396CA012E0017BB3208E8/NR-15%20(atualizada_2011).pdf)> Acesso em: 15 jul. 2014.

BRESSAN, P.M.; KIERULFF M.C.M.; SUGIEDA, A.M. 2009 *Fauna ameaçada de extinção no estado de São Paulo: vertebrados*. São Paulo: Fundação Parque Zoológico de São Paulo, Secretaria do Meio Ambiente, 645p.

BRYAN, L.K.; BALDWIN, C.A.; GRAY, M.J.; MILLER, D.L. 2009 Efficacy of select disinfectants at inactivating *Ranavirus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 84: 89-94.

BUENO-GUIMARÃES, H.M.; FERREIRA, C.M.; GARCIA, M.L.B.; SALDIVA, P.H.N. 2001 Tadpole epithelium test: potential use of *Rana catesbeiana* histopathologic epithelial changes to evaluate aquatic pollution. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 67:202-209.

CARNEIRO, P.C.F.; CIRIO, S.M.; SCHORER, M. 2006 Pathological study of jundia fingerlings experimentally infected by ich and submitted to conventional treatments. *Archives of Veterinary Science*, 11(1): 33-38.

CHINNADURAIE, S.C.; KANE, L. 2014 Advances in amphibian clinical therapeutics. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 23:50-55.

CRUZ, C.; FUJIMOTO, R.Y.; LUZ, R.K.; PORTELLA, M.C.; MARTINS, M.L. 2005 Toxicidade aguda e histopatologia do fígado de larvas de trairão (*Hoplias lacerde*) expostas a solução aquosa de formaldeído a 10%. *Pesticidas: Revista de ecotoxicologia e meio ambiente*, 15:21-28.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Cultured Aquatic Species Information Programme (2014). Disponível em <http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Rana_catesbeiana/en

> Acesso em: 2 setembro 2014.

FDA - Food and Drug Administration. *Supplemental new animal drug application* (2002). Disponível em <<http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/Products/ApprovedAnimalDrugProducts/FOIADrugSummaries/ucm069881.pdf>> Acesso em: 21 janeiro 2014.

FERREIRA, C.M.; GUIMARÃES, H.M.; RANZANI-PAIVA, M.J.; SOARES, S.R.; RIVERO, D.H.R.F.; SALDIVA, P.H.N. 2003 Hematological markers of copper toxicity in *Rana catesbeiana* tadpoles (Bullfrog). *Revista Brasileira de Toxicologia*, 16(2):83-88.

FLÓ-NEYRET, C.; LORENZI-FILHO, G.; MACCHIONE, M.; GARCIA, M.I.B.; SALDIVA, P.H.N. 2001 Effects of formaldehyde on the frog's mucociliary epithelium as a surrogate to evaluate air pollution effects on the respiratory epithelium. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 34:639-643.

GERVASI, S.S.; URBINA, J.; HUA, J.; CHESTNUT, T.; RELYEA, R.A.; BLAUSTEIN, A.R. 2013 Experimental Evidence for American Bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) Susceptibility to Chytrid Fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*). *Ecohealth*, 10:166-171.

GOSNER, K.L. 1960 A simplified table for standing anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, 16:183-90.

GREENSPAN, S.E.; CALHOUN, A.J.K.; LONGCORE, J.E.; LEVY, M.G. 2012 Transmission of *Batrachochytrium dendrobatidis* to wood frogs (*Lithobates sylvaticus*) via a bullfrog (*L. Catesbeianus*) vector. *Journal of Wildlife Disease*, 48(3):575-582.

HYATT, A.D.; BOYLE, D.G.; OLSEN, V.; BOYLE, D.B.; BERGER, L.; OBENDORF, D.; DALTON, A.; KRIGER, K.; HERO, M.; HINES, H.; PHILLOT, R.; CAMPBELL, R.; MARANTELLI, G.; GLEASON, F.; COLLING. 2007 Diagnostic assay and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 73: 175-192.

IUCN - União Internacional para Conservação da Natureza. *IUCN Red List*. Disponível em <<http://www.iucnredlist.org/search>> Acesso em: 21 out. 2014.

JOHNSON, M.L.; BERGER, L.; PHILIPS, L.; SPEARE, R. 2003 Fungicidal effects of chemical disinfectants, UV light, desiccation and heat on the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 57: 255-260.

KRAUTER, P.W. 1993 Micronucleus incidence and hematological effects in bullfrog tadpoles (*Rana catesbeiana*) exposed to 2-acetylaminofluorene

and 2-aminofluorene. *Archives of Environmental Contamination Toxicology*, 24:487-493.

- LOMBARDI, J.V.; FERREIRA, C.M.; MACHADO-NETO, J.G.; MARQUES, H.L.A. 2002 Acute Toxicity of the Fungicide Copper Oxychloride to Tadpoles of the Bullfrog *Rana catesbeiana*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 69(3):415-420.
- LONGCORE, J.E.; PESSIER, A.P.; NICHOLS, D.K. 1999 *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia*, 91: 219-227.
- MARCANTONIO, A.S.; FERREIRA, C.M.; FRANÇA, F.M.; DIAS, D.C.; TEIXEIRA, P.C.; RANZANI-PAIVA, M.J.T. 2011 Toxicidade do sulfato de zinco para girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*): toxicidade aguda, crônica e parâmetros hematológicos. *Boletim do Instituto de Pesca*, 37(2):143-154.
- MERT, R.; BENLI, A.Ç.K.; ARSLAN, G. 2014 Determination of histological and genotoxic effects of formalin on Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Research*, doi:10.1111/are.12434.
- MONTEIRO, J.A.N.; PINHEIRO, R.H.; CUNHA, L.A.; ROCHA, C.A.M. 2010 Teste de micronúcleo em eritrócitos para avaliação de efeitos mutagênicos do dicromato de potássio em girinos de *Rana catesbeiana*. In: Figueiredo ROM (Org.) Construção Coletiva. *Série Ciências em Ação*. Belém: IFPA 1:51-55.
- MUIJSERS, M.; MARTEL, A.; ROOIJ, P.V.; BAERT, K.; VERCAUTEREN, G.; DUCATELLE, R.; BACKER, P.; VERGAMMEN, F.; HAESBROUCK, F.; PASMANS, F. 2012 Antibacterial therapeutics for the treatment of chytrid infection in amphibians: *Collumbus's egg?*. *Veterinary Research*, 8:175.
- NEVES, P.H.V. 2012 Presença de ranavírus em rãs-touro, *Lithobates catesbeianus*, provenientes de ranários da região sudeste do Brasil. Dissertação. Instituto de Pesca - São Paulo/Brasil.
- NHU, V.C.; NGUYEN, H.Q.; LE, T.L.; TRAN, M.T.; SORGELOOS, P.; DIERCKENS, K.; REINERTSEN, H.; KJORSVIK, E.; SVENNEVIG, N. 2011 Cobia *Rachycentron canadum* aquaculture in Vietnam: recent developments and prospects. *Aquaculture*, 315(1-2):20-25.
- NOUTH, W.G.; SELIM, A.G. 2013 Toxopathological studies on the effects of formalin and cooper sulphate in tilapia as a commonly used disinfectant in aquaculture. *Journal Applied Environmental Biological Sciences*, 3(6):7-20.
- OSSANA, N.A.; SALIBIAN, A. 2013 Micronucleus test for monitoring the genotoxic potential of the surface water of Luján River (Argentina) using erythrocytes of *Lithobates catesbeianus* tadpoles. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*, 8(1):67-74.

- PARKER, J.M.; MIKAELIAN, I.; HAHN, N.; DIGGS, H.E. 2002 Clinical diagnosis and treatment of epidermal chytridiomycosis in African clawed frog (*Xenopus tropicalis*). *Comparative Medicine* 52(3):265-268.
- PESSIER, A.P. 2002 *An Overview of Amphibian Skin Disease*. 11(3):162-174.
- RANZANI-PAIVA, M.J.; PÁDUA, S.B.; TAVARES-DIAS, M.; EGAMI, M.I. 2013 *Métodos para análise hematológica em peixes*. Maringá: Eduem, 140p
- ROCHA, C.A.M. 2011 The micronucleus test in erythrocytes of amphibian larvae as tool for xenobiotic exposure risk assessment: a brief review and an example using *Lithobates catesbeianus* exposed to cooper sulfate. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 8(1):23-29.
- SANTOS, R.F.B.; DIAS, H.M.; FUJIMOTO, R. 2012 Acute toxicity and histopathology in ornamental fish amazon bluespotted corydora (*Corydoras melanistius*) exposed to formalin. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 84(4): 1001-1007.
- SCHLOEGEL, L.M.; FERREIRA, C.M.; JAMES, T.; HIPOLITO, M.; LONGCORE, J.; HYATT, A.; YABSLEY, M.; MARTINS, A.M.C.R.; MAZZONI, R.; DAVIES, A.J.; DASZAK, P. 2010 The North American Bullfrog (*Rana catesbeiana*) as a reservoir for the spread of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Brazil. *Animal Conservation*, 13:53-61.
- SCHLOEGEL, L.M.; TOLEDO, L.F.; LONGCORE, J.E.; GREENSPAN, S.E.; VIEIRA, C.A.; LEE, M.; ZHAO, S.; WANGEN, C.; FERREIRA, C.M.; HIPOLITO, M.; DAVIES, A.J.; CUOMO, C.A.; DASZAK, P.; JAMES, T.Y. 2012 Novel, panzootic and hybrid genotypes of amphibian chytridiomycosis associated with the bullfrog trade. *Molecular Ecology*, 21:5162-5177.
- TOLBERT, P.E.; SHY, C.M.; ALLEN, J.W. 1992 Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutation Research*, 271:69-77.
- VERDADE, V.K.; DIXO, M.; CURCIO, F.F. 2010 Os riscos de extinção de sapos, rãs e pererecas em decorrência das alterações ambientais. *Estudos Avançados*, 24(68):161-172.
- WEBB, R.; MENDEZ, D.; BERGER, L.; SPEARE, R. 2007 Additional disinfectants effective against the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 74:13-17.
- ZAR, J.H. 1999 *Biostatistical Analysis*. New Jersey: Prentice Hall.
- ZUUR, A.F.; IENO, E.N.; WALKER, N.J.; SVELIEV, A.A.; SMITH, G.M. 2009 *Mixed effects models and extensions in Ecology with R*. New York: Springer.

Considerações Finais

O formaldeído é indicado na aquicultura como produto profilático por possuir ação fungicida, bactericida e parasitário, entretanto a literatura acerca dos níveis de tolerância dos anfíbios ao formaldeído ainda é escassa, assim como a utilização deste agente químico como produto profilático.

A concentração letal mediana do formaldeído calculada às 96h sobre girinos de rã-touro é de 10,53mg/L, sendo que valores entre 6mg/L e 18mg/L de formaldeído apresentaram potencial genotóxico ao final do experimento.

A rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) se mostrou um bioindicador eficaz de genotoxicidade, tendo aumento da frequência de MN e anomalias nucleares concomitante ao aumento das concentrações de formaldeído. A exposição crônica a concentrações subletais (0,10, 0,88 e 5,08mg/L) gerou citotoxicidade, com aumento de anomalias nucleares nas maiores concentrações às 288h quando comparado com o controle negativo. Portanto, concentrações de formaldeído da marca Vetec® não apresentaram alterações na frequência de micronúcleo, percentual de hematócrito e na contagem diferencial de leucócitos do sangue periférico de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*).

Tendo como base estes resultados, que não indicaram alto potencial tóxico do formaldeído aos girinos, a classificação deste agente químico como um composto de baixa toxicidade não garante que este possa ser utilizado como produto profilático sem comprometer o bem-estar animal, sendo necessário propor estudos complementares que avaliem outros possíveis efeitos nocivos aos girinos expostos a baixas concentrações de formaldeído.

ANEXOS

ANEXO 1 - Conta utilizada na preparação das soluções

A equação matemática utilizada para preparação das soluções de formaldeído ao longo dos testes está descrita abaixo:

$$C_1.V_1 = C_2.V_2$$

Onde,

C1= Concentração inicial (solução estoque);

V1= Volume a ser pipetado da solução estoque;

C2= Concentração final (aquela que se pretende preparar);

V2= Volume final da solução que se deseja preparar.

ANEXO 2 - Fielgen-Fast Green: Adaptação do corante de Schiff (reação de Fielgen) e Fast Green para girinos de *Lithobates catesbeianus* (Ferreira *et al.*, 2003)

A adaptação consiste em basicamente duas etapas:

- Coloração com Reativo de Schiff: cora somente o DNA nuclear das células com tonalidade rosa intenso.
- Coloração com Fast Green: cora somente o citoplasma das células com tonalidade verde.

Para o sucesso da coloração, as lâminas devem ser fixadas em Metanol PA por dez minutos, secas ao ar e imersas em uma solução de ácido clorídrico 5N por mais dez minutos. Quando secas, as lâminas devem ser colocadas no Reativo de Schiff durante 120 minutos em refrigeração. Após este período, as lâminas devem ser lavadas em água corrente durante 5 minutos e secar a temperatura ambiente.

Em seguida todo o material deve ser transferido para a solução de Fast Green por um período de 30 segundos a 5 minutos, tempo que varia conforme idade e uso do corante.

As lâminas recém coradas devem ser passadas em duas baterias de álcool absoluto para retirar o excesso de corante, e então secas ao ar. Após o

processo de coloração, sugere-se que as lâminas sejam montadas em Permount.

Coloração Rosenfeld (Rosenfeld, 1947; Ferreira *et al.*, 2003)

O corante Rosenfeld é uma mistura dos corantes May-Grunwald e Giemsa, o método consiste na pipetagem de 10 gotas do corante por cima da extensão sanguínea, adiciona-se água destilada sobre as lâminas homogeneizando as mesmas com o auxílio de um bastão de vidro, deixando contra-corar por mais 10 minutos. Após a coloração, as lâminas devem ser lavadas na água da torneira, e então secas ao ar. Caso haja excesso de corante na extensão, existe a necessidade de um banho rápido da lâmina em Metanol PA.

ANEXO 3 - Figuras ilustrativas



Figura 1: Esquematização experimental do teste de exposição aguda, contendo as concentrações de 6mg/L, 9mg/L, 12mg/L, 15mg/L, 18mg/L de formaldeído (Vetec®), além do controle negativo, sem adição do produto.

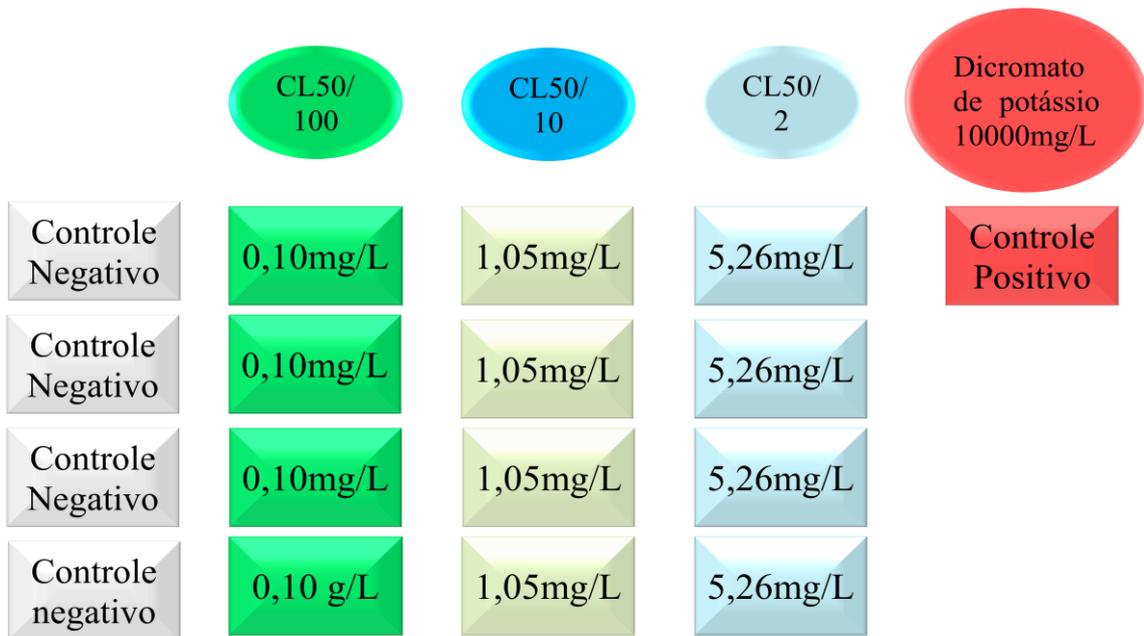


Figura 2: Esquematização experimental do teste de exposição crônica, contendo as concentrações nominais de 0,10mg/L, 1,05mg/L e 5,26mg/L de formaldeído (Vetec®), além do controle negativo (sem adição do produto) e controle positivo (10000mg/L de dicromato de potássio).



Figura 3: Tanques de aclimatação dos girinos.



Figura 4: Tanques de água de abastecimento de clorada por pernoite.

Figura 5: Delineamento experimental do teste de exposição aguda.



Figura 6: Vista aproximada do aquário de 18mg/L pertencente ao teste de exposição aguda (ênfase aos animais mortos e apenas 1 sobrevivente)



Figura 7: Delineamento experimental do teste de exposição crônica.

Figura 8: Delineamento experimental do teste de exposição crônica.



Figura 9: Coleta sanguínea do vaso caudal utilizando a pipeta.



Figura 11: Micronúcleo em eritrócito de girino de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) analisado em objetiva de imersão

Figura 10: Coleta sanguínea no capilar de hematócrito.

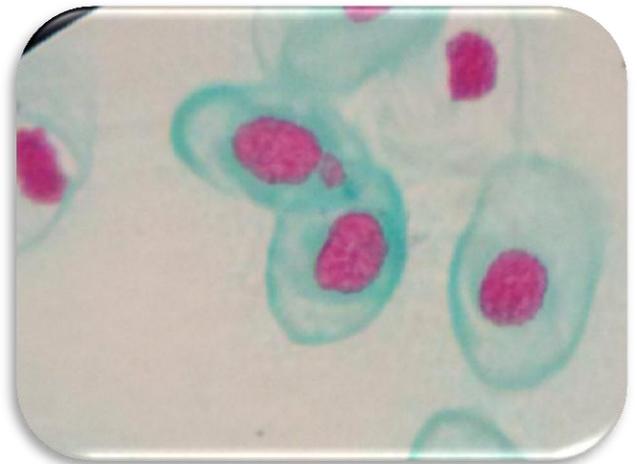


Figura 12: Eritrócitos de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) com carioteca preservada.

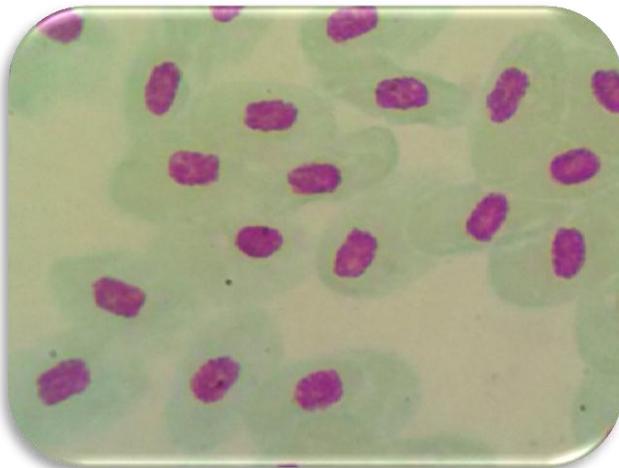
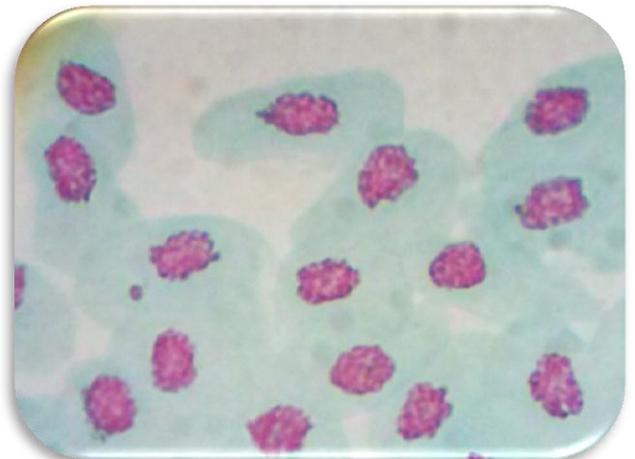


Figura 13: Eritrócito de rã-touro apresentando micronúcleo, cariorrexe e picnose.



ANEXO 4 - Tabelas complementares

Tabela 1: Peso dos girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) no início do experimento.

	Controle Negativo	0,10mg/L	0,88mg/L	5,08mg/L	Controle Positivo
réplica 1	9,2	10,6	10,4	10,2	9,2
	9,4	3,1	10,8	8,2	9,4
	9,5	10	8,9	8,3	9,5
	12,1	8,4	10,3	8,3	12,1
	12	9,9	9,6	10,2	12
	9,5	7,9	9,8	12,2	9,5
	11,4	9,6	8,7	11,4	11,4
	10,2	7	10,8	7,8	10,2
	8,9	7,8	8,8	11,7	8,9
	9,7	8,4	10,1	8,2	9,7
	10,8	7,9	10,7	8,2	10,8
	9,2	11,7	9,6	10,1	9,2
réplica 2	8,2	10,1	11,7	11,3	
	12,1	9,1	8,8	11,5	
	10,2	11,8	8,3	7,2	
	7,9	9,8	11,9	9,5	
	9	11,4	9,6	10	
	11,1	9,4	7,8	8,7	
	8,7	7	10,7	10,1	
	7,4	8,4	10,4	9,3	
	8	7,6	7,4	8,4	
	8,3	10,1	7,3	7,7	
	8,1	7	7,6	9,6	
	9	7,7	11,1	10,7	
réplica 3	12	10,1	9	8,7	
	9,4	7,2	11,6	11,6	
	8,2	11	10,8	11,4	
	8,2	9,9	9,1	10,2	
	8,1	10,3	7,5	7,6	
	8,7	8,7	8,4	10	
	8,5	9,6	10,8	11,1	
	9,8	10	8,9	7,9	
	8,7	11,1	10,1	9,9	
	7,7	8,7	9,4	9,4	
	8,90	9,30	7,90	7,50	
	10,7	9,1	9,6	8,4	
réplica 4	10,2	10,7	9,2	8,7	
	11,4	9,5	11,6	10,2	
	8,8	11,4	11,4	9,9	
	8,7	9,7	9,6	9,7	
	9,5	9,3	7,2	9	
	9,2	9,2	9,2	9,1	
	8,2	7,8	8,4	10	
	8,2	9,1	9,8	7,4	
	8,9	9,3	8,8	8,4	
	8,4	10	11,2	6,7	
	9	9,6	11,6	9,5	
	7	11,1	10,7	8,1	

média	9,30	9,24	9,64	9,36	10,16
desvio padrão	1,29	1,57	1,31	1,37	1,14

Tabela 2: Valores da análise de concentração efetiva de formaldeído na água nas quatro diferentes trocas de solução (0h, 96h, 144h e 240h).

	1,05 mg/L	5,26mg/L
troca 1 (0h)	0,9	3,9
troca 2 (96h)	1,1	5,9
troca 3 (144h)	0,7	5,7
troca 4 (240h)	0,9	4,8
média	0,88	5,08

Tabela 3: Contagem de micronúcleo e análise da carioteca dos diferentes tratamentos (momento zero, controle negativo, 0,10mg/L, 0,88mg/L, 5,08mg/L e controle positivo) nos momentos 0h, 96h, 192h e 288h.

Lâmina	Tratamento	Momento	Micronúcleo	Carioteca
1	Momento Zero	0h	0	preservada
2	Momento Zero	0h	4	alterada
3	Momento Zero	0h	4	alterada
4	Momento Zero	0h	0	preservada
5	Momento Zero	0h	0	preservada
6	Momento Zero	0h	0	preservada
7	Momento Zero	0h	2	preservada
8	Momento Zero	0h	1	preservada
9	Momento Zero	0h	1	preservada
10	Momento Zero	0h	3	alterada
11	Momento Zero	0h	1	preservada
12	Momento Zero	0h	1	preservada
13	Controle negativo 1	96 h	0	alterada
14	Controle negativo 1	96 h	1	preservada
15	Controle negativo 1	96 h	1	preservada
16	Controle negativo 2	96 h	0	preservada
17	Controle negativo 2	96 h	1	alterada
18	Controle negativo 2	96 h	2	preservada
19	Controle negativo 3	96 h	6	preservada
20	Controle negativo 3	96 h	0	preservada
21	Controle negativo 3	96 h	1	preservada
22	Controle negativo 4	96 h	0	preservada
23	Controle negativo 4	96 h	0	preservada

24	Controle negativo 4	96 h	0	preservada
25	0,10mg/L 1	96 h	0	preservada
26	0,10mg/L 1	96 h	0	preservada
27	0,10mg/L 1	96 h	0	preservada
28	0,10mg/L 2	96 h	0	preservada
29	0,10mg/L 2	96 h	0	preservada
30	0,10mg/L 2	96 h	0	preservada
31	0,10mg/L 3	96 h	1	preservada
32	0,10mg/L 3	96 h	0	preservada
33	0,10mg/L 3	96 h	3	alterada
34	0,10mg/L 4	96 h	0	preservada
35	0,10mg/L 4	96 h	0	preservada
36	0,10mg/L 4	96 h	1	preservada
37	0,88mg/L 1	96 h	1	preservada
38	0,88mg/L 1	96 h	0	alterada
39	0,88mg/L 1	96 h	2	alterada
40	0,88mg/L 2	96 h	0	preservada
41	0,88mg/L 2	96 h	0	preservada
42	0,88mg/L 2	96 h	0	alterada
43	0,88mg/L 3	96 h	-	-
44	0,88mg/L 3	96 h	0	preservada
45	0,88mg/L 3	96 h	2	alterada
46	0,88mg/L 4	96 h	0	preservada
47	0,88mg/L 4	96 h	0	preservada
48	0,88mg/L 4	96 h	1	preservada
49	5,08mg/L 1	96 h	1	preservada
50	5,08mg/L 1	96 h	-	-
51	5,08mg/L 1	96 h	1	preservada
52	5,08mg/L 2	96 h	0	preservada
53	5,08mg/L 2	96 h	1	alterada
54	5,08mg/L 2	96 h	4	alterada
55	5,08mg/L 3	96 h	0	preservada
56	5,08mg/L 3	96 h	1	preservada
57	5,08mg/L 3	96 h	0	preservada
58	5,08mg/L 4	96 h	2	alterada
59	5,08mg/L 4	96 h	0	preservada
60	5,08mg/L 4	96 h	0	preservada
61	Controle positivo	96 h	1	preservada
62	Controle positivo	96 h	2	preservada
63	Controle positivo	96 h	7	alterada
64	Controle negativo 1	192 h	0	preservada
65	Controle negativo 1	192 h	0	preservada
66	Controle negativo 1	192 h	5	alterada
67	Controle negativo 2	192 h	0	alterada
68	Controle negativo 2	192 h	0	preservada
69	Controle negativo 2	192 h	0	preservada

70	Controle negativo 3	192 h	1	preservada
71	Controle negativo 3	192 h	0	preservada
72	Controle negativo 3	192 h	0	preservada
73	Controle negativo 4	192 h	-	-
74	Controle negativo 4	192 h	1	alterada
75	Controle negativo 4	192 h	2	alterada
76	0,10mg/L 1	192 h	1	preservada
77	0,10mg/L 1	192 h	4	alterada
78	0,10mg/L 1	192 h	0	alterada
79	0,10mg/L 2	192 h	0	preservada
80	0,10mg/L 2	192 h	5	alterada
81	0,10mg/L 2	192 h	0	preservada
82	0,10mg/L 3	192 h	2	alterada
83	0,10mg/L 3	192 h	2	alterada
84	0,10mg/L 3	192 h	0	alterada
85	0,10mg/L 4	192 h	-	-
86	0,10mg/L 4	192 h	0	preservada
87	0,10mg/L 4	192 h	1	alterada
88	0,88mg/L 1	192 h	3	preservada
89	0,88mg/L 1	192 h	2	preservada
90	0,88mg/L 1	192 h	2	alterada
91	0,88mg/L 2	192 h	4	alterada
92	0,88mg/L 2	192 h	1	alterada
93	0,88mg/L 2	192 h	3	preservada
94	0,88mg/L 3	192 h	0	preservada
95	0,88mg/L 3	192 h	0	alterada
96	0,88mg/L 3	192 h	-	-
97	0,88mg/L 4	192 h	5	alterada
98	0,88mg/L 4	192 h	0	alterada
99	0,88mg/L 4	192 h	3	alterada
100	5,08mg/L 1	192 h	1	alterada
101	5,08mg/L 1	192 h	5	alterada
102	5,08mg/L 1	192 h	6	alterada
103	5,08mg/L 2	192 h	2	alterada
104	5,08mg/L 2	192 h	-	-
105	5,08mg/L 2	192 h	4	preservada
106	5,08mg/L 3	192 h	0	preservada
107	5,08mg/L 3	192 h	3	alterada
108	5,08mg/L 3	192 h	3	alterada
109	5,08mg/L 4	192 h	2	preservada
110	5,08mg/L 4	192 h	0	preservada
111	5,08mg/L 4	192 h	0	alterada
112	Controle positivo	192 h	8	alterada
113	Controle positivo	192 h	4	preservada
114	Controle positivo	192 h	9	alterada
115	Controle negativo 1	288 h	5	alterada

116	Controle negativo 1	288 h	3	alterada
117	Controle negativo 1	288 h	5	alterada
118	Controle negativo 2	288 h	3	alterada
119	Controle negativo 2	288 h	0	preservada
120	Controle negativo 2	288 h	2	alterada
121	Controle negativo 3	288 h	0	preservada
122	Controle negativo 3	288 h	3	preservada
123	Controle negativo 3	288 h	0	preservada
124	Controle negativo 4	288 h	0	preservada
125	Controle negativo 4	288 h	2	alterada
126	Controle negativo 4	288 h	5	preservada
127	0,10mg/L 1	288 h	9	alterada
128	0,10mg/L 1	288 h	5	alterada
129	0,10mg/L 1	288 h	2	preservada
130	0,10mg/L 2	288 h	1	preservada
131	0,10mg/L 2	288 h	4	alterada
132	0,10mg/L 2	288 h	3	preservada
133	0,10mg/L 3	288 h	2	alterada
134	0,10mg/L 3	288 h	3	preservada
135	0,10mg/L 3	288 h	3	alterada
136	0,10mg/L 4	288 h	0	preservada
137	0,10mg/L 4	288 h	0	preservada
138	0,10mg/L 4	288 h	1	preservada
139	0,88mg/L 1	288 h	2	preservada
140	0,88mg/L 1	288 h	3	alterada
141	0,88mg/L 1	288 h	1	preservada
142	0,88mg/L 2	288 h	0	preservada
143	0,88mg/L 2	288 h	2	alterada
144	0,88mg/L 2	288 h	1	preservada
148	0,88mg/L 3	288 h	5	alterada
149	0,88mg/L 3	288 h	0	preservada
150	0,88mg/L 3	288 h	1	alterada
145	0,88mg/L 4	288 h	1	preservada
146	0,88mg/L 4	288 h	10	alterada
147	0,88mg/L 4	288 h	0	preservada
151	5,08mg/L 1	288 h	3	alterada
152	5,08mg/L 1	288 h	6	alterada
153	5,08mg/L 1	288 h	0	preservada
154	5,08mg/L 2	288 h	0	preservada
155	5,08mg/L 2	288 h	3	alterada
156	5,08mg/L 2	288 h	4	preservada
157	5,08mg/L 3	288 h	7	alterada
158	5,08mg/L 3	288 h	0	preservada
159	5,08mg/L 3	288 h	0	alterada
160	5,08mg/L 4	288 h	1	preservada
161	5,08mg/L 4	288 h	6	alterada

162	5,08mg/L 4	288 h	6	alterada
163	Controle positivo	288 h	1	preservada
164	Controle positivo	288 h	3	preservada
165	Controle positivo	288 h	7	alterada

Tabela 4: Contagem diferencial de leucócitos nos diferentes tratamentos (momento zero, controle negativo, 0,10mg/L, 0,88mg/L, 5,08mg/L e controle positivo) nos momentos 0h, 96h, 192h e 288h.

Lâmina	Tratamento	Momento	Linfócito(%)	Neutrófilo(%)	Basófilo (%)	Eosinófilo(%)	Monócito(%)	% Total
1	Momento Zero	0h	86,54	8,17	0,00	2,40	2,88	100
2	Momento Zero	0h	90,00	4,00	2,00	3,50	0,50	100
3	Momento Zero	0h	88,50	3,54	2,21	4,42	1,33	100
4	Momento Zero	0h	89,66	5,91	1,48	1,48	1,48	100
5	Momento Zero	0h	94,26	4,78	0,00	0,48	0,48	100
6	Momento Zero	0h	85,97	3,62	6,79	2,26	1,36	100
7	Momento Zero	0h	92,86	1,90	3,33	0,48	1,43	100

8	Momento Zero	0h	88,67	3,45	4,43	2,46	0,99	100
9	Momento Zero	0h	88,67	7,39	1,48	0,99	1,48	100
10	Momento Zero	0h	79,30	15,42	3,52	1,32	0,44	100
11	Momento Zero	0h	94,34	2,83	2,36	0,47	0,00	100
12	Momento Zero	0h	95,24	2,38	1,43	0,95	0,00	100
115	Controle Negativo 1	288h	95,24	2,38	1,90	0,48	0,00	100
116	Controle Negativo 2	288h	95,69	0,96	2,39	0,00	0,96	100
117	Controle Negativo 3	288h	92,17	3,23	3,69	0,46	0,46	100
118	Controle Negativo 2	288h	93,75	1,92	0,48	3,85	0,00	100
119	Controle Negativo 3	288h	98,52	0,49	0,99	0,00	0,00	100
120	Controle Negativo 4	288h	91,67	0,56	4,44	2,22	1,11	100
121	Controle Negativo 3	288h	97,01	1,99	0,00	1,00	0,00	100

122	Controle Negativo 4	288h	96,62	0,48	0,00	0,48	2,42	100
123	Controle Negativo 5	288h	98,04	1,47	0,49	0,00	0,00	100
124	Controle Negativo 4	288h	99,01	0,00	0,50	0,00	0,50	100
125	Controle Negativo 5	288h	87,38	9,71	0,97	1,46	0,49	100
126	Controle Negativo 6	288h	-	-	-	-	-	-
127	0,10mg/L 1	288h	96,15	1,44	2,40	0,00	0,00	100
128	0,10mg/L 1	288h	96,55	0,99	0,00	0,99	1,48	100
129	0,10mg/L 1	288h	97,49	1,01	0,00	0,50	1,01	100
130	0,10mg/L 2	288h	97,50	1,00	1,00	0,50	0,00	100
131	0,10mg/L 2	288h	98,02	1,49	0,50	0,00	0,00	100
132	0,10mg/L 2	288h	95,00	0,00	2,78	1,11	1,11	100
133	0,10mg/L 3	288h	95,00	3,00	1,00	1,00	0,00	100

134	0,10mg/L 3	288h	93,60	5,91	0,00	0,00	0,49	100
135	0,10mg/L 3	288h	91,79	6,28	0,48	0,97	0,48	100
136	0,10mg/L 4	288h	-	-	-	-	-	-
137	0,10mg/L 4	288h	98,95	0,53	0,53	0,00	0,00	100
138	0,10mg/L 4	288h	94,34	1,42	1,89	2,36	0,00	100
139	0,88mg/L 1	288h	94,06	1,98	2,97	0,99	0,00	100
140	0,88mg/L 1	288h	99,01	0,50	0,00	0,50	0,00	100
141	0,88mg/L 1	288h	91,07	4,46	3,57	0,89	0,00	100
142	0,88mg/L 2	288h	87,38	4,85	7,28	0,49	0,00	100
143	0,88mg/L 2	288h	92,17	3,23	1,84	2,30	0,46	100
144	0,88mg/L 2	288h	93,46	0,93	5,14	0,47	0,00	100
145	0,88mg/L 4	288h	100,0 0	0,00	0,00	0,00	0,00	100

146	0,88mg/L 4	288h	-	-	-	-	-	-
147	0,88mg/L 4	288h	96,15	0,77	2,31	0,77	0,00	100
148	0,88mg/L 3	288h	89,11	7,43	0,50	1,49	1,49	100
149	0,88mg/L 3	288h	89,50	2,00	2,00	5,50	1,00	100
150	0,88mg/L 3	288h	94,50	2,00	3,00	0,50	0,00	100
151	5,08mg/L 1	288h	96,00	3,00	0,50	0,50	0,00	100
152	5,08mg/L 1	288h	97,50	0,50	1,00	0,50	0,50	100
153	5,08mg/L 1	288h	-	-	-	-	-	-
154	5,08mg/L 2	288h	92,50	2,50	2,50	1,00	1,50	100
155	5,08mg/L 2	288h	91,54	1,49	2,99	2,99	1,00	100
156	5,08mg/L 2	288h	93,03	1,00	1,00	3,98	1,00	100
157	5,08mg/L 3	288h	91,50	2,00	3,00	3,00	0,50	100

158	5,08mg/L 3	288h	95,50	2,00	1,50	1,00	0,00	100
159	5,08mg/L 3	288h	94,50	0,50	4,00	0,50	0,50	100
160	5,08mg/L 4	288h	90,00	6,00	0,50	2,50	1,00	100
161	5,08mg/L 4	288h	95,00	1,00	2,50	1,00	0,50	100
162	5,08mg/L 4	288h	86,54	7,05	3,21	1,28	1,92	100
163	Controle Positivo	288h	92,49	1,16	3,47	1,16	1,73	100
164	Controle Positivo	288h	96,62	1,93	0,97	0,00	0,48	100
165	Controle Positivo	288h	97,09	1,46	0,00	0,97	0,49	100
