

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 da atrazina sobre girinos de rã-touro  
(*Lithobates catesbeianus*)**

**Fernanda Lie Ikari**  
**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Cláudia Maris Ferreira Mostério**  
**Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Cintia Badaró-Pedroso**

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  
Agosto – 2018

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 da atrazina sobre girinos de rã-touro  
(*Lithobates catesbeianus*)**

**Fernanda Lie Ikari**  
**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Cláudia Maris Ferreira Mostério**  
**Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Cintia Badaró-Pedroso**

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  
Agosto – 2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

M966a

Ikari, Fernanda Lie

Avaliação do potencial tóxico da atrazina sobre girinos de rã-touro  
(*Lithobates catesbeianus*). - São Paulo, 2018  
vi, 50f. ; 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: Claudia Maris Ferreira Mostério

1. Pesticidas. 2. Sangue. 3. Anfíbios. 4. Proteína. 5. Glicose.  
5. Marcadores bioquímicos. 6. Toxicologia. I. Mostério, Claudia Maris Ferreira.

CDD 597.8

Permitida a cópia parcial, desde que citada a fonte – O autor

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

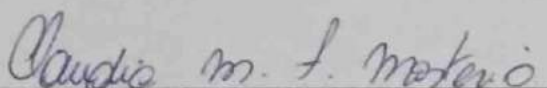
**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

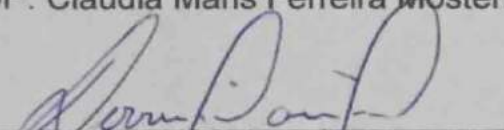
**Avaliação do potencial tóxico da atrazina sobre girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*)**

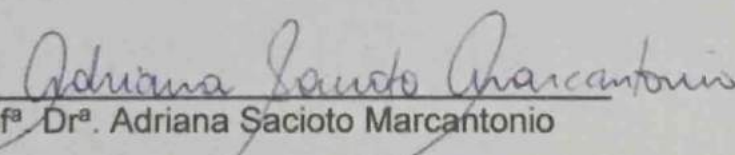
**AUTORA:** Fernanda Lie Ikari

**ORIENTADORA:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Claudia Maris Ferreira Mostério

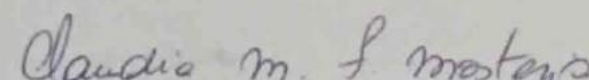
Aprovado como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM AQUICULTURA E PESCA, Área de Concentração em Aquicultura, pela Comissão Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Claudia Maris Ferreira Mostério

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Clóvis Ferreirã do Carmo

  
\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana Sacioto Marcantonio

Data da realização: 28 de agosto de 2018

  
\_\_\_\_\_  
Presidente da Comissão Examinadora  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Claudia Maris Ferreira Mostério

*Eu tentei 99 vezes e falhei, mas na centésima tentativa eu consegui, nunca desista de seus objetivos mesmo que esses pareçam impossíveis, a próxima tentativa pode ser a vitoriosa.”*

Albert Einstein

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Instituto de Pesca APTA/SAA-SP, pela infraestrutura fornecida. E a todos os funcionários do IP.

A CAPES por ter cedido à bolsa de estudo durante a realização do Mestrado.

A minha Orientadora Dra. Cláudia Maris Ferreira e Coorientadora Dra. Cintia Badaró-Pedroso pela orientação, ajuda, apoio e amizade durante o período de Mestrado, muito obrigada.

Ao Dr. Eros Oocchiena por ter cedido às primeiras alíquotas de Atrazina.

Aos meus familiares, principalmente meus pais Carlos Ikari e Lídia Ikari e à minha irmã Carolina Ikari, pelo apoio, compreensão, carinho e amor.

Ao Dr. Eduardo de Medeiros Ferraz pela amizade e apoio.

À Cinthia Oliveira, Karen Ferreira, Sthefany Alfaia e Iara Bufarra, muito obrigada pela amizade, apoio, ajuda e pelos momentos de descontração.

Aos demais colegas de Mestrado Danilo Araújo, Diego Sales, Cristina Viriato, Felipe Araujo e Mariana Landucci. E aos colegas de laboratório Isabela Brosco, Pamella Adrielle e Renan, muito obrigada pela amizade, apoio, ajuda e principalmente pelos momentos de lazer.

Às minhas amigas da faculdade que sempre estiveram me apoiando nessa jornada, muito obrigada.

E à Amanda Carvalho, Cosette Monteiro, Monique Lee, Nayla Gabriele e Priscilla Bajon, muito obrigada pelas inúmeras palavras de apoio e incentivo e principalmente pela amizade de vocês. Muito obrigada!

## Sumário

AGRADECIMENTOS .....	i
RESUMO .....	iii
ABSTRACT.....	iv
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
REFERÊNCIAS .....	4
CAPÍTULO 1.....	11
Análises bioquímicas do fígado de girinos de rã-touro ( <i>Lithobates catesbeianus</i> ) após a exposição ao herbicida atrazina.....	12
Resumo .....	12
Abstract .....	13
Introdução .....	14
Materiais e métodos.....	17
Discussão .....	23
Agradecimentos .....	28
Conflito de interesse e conflitos éticos .....	28
Referências.....	28
ANEXOS .....	39

## RESUMO

A detecção de agrotóxicos em corpos d'água tem se tornado cada dia mais frequente, devido ao aumento da produção e exportação agrícolas, uso indiscriminado e descarte inadequado de derivados desses contaminantes. Essa contaminação se dá através da chuva, irrigação, lixiviação e ventos podendo atingir o aquífero freático. A biota aquática é uma das mais prejudicadas, pois está constantemente exposta a substâncias tóxicas oriundas de efluentes domésticos, industriais, drenagem agrícola e lavagem de embalagens. A atrazina é um herbicida pertencente ao grupo das triazinas, que representam 30% da produção mundial de herbicidas e é utilizada no controle de ervas daninhas em plantações de milho, cana de açúcar e sorgo. Os anuros são considerados ótimos bioindicadores ambientais, pois estão constantemente expostos a água e ao ambiente terrestre. O objetivo desse trabalho foi analisar os efeitos bioquímicos do herbicida atrazina sobre o fígado de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*). As concentrações de atrazina foram calculadas tomando-se como base a concentração máxima permitida em águas brasileiras para o consumo humano ( $2\mu\text{g L}^{-1}$ ). Foram testadas as concentrações de  $40\mu\text{g L}^{-1}$ ,  $200\mu\text{g L}^{-1}$ ,  $2.000\mu\text{g L}^{-1}$  e  $20.000\mu\text{g L}^{-1}$  além de um controle negativo (sem adição do produto), aos quais os organismos ficaram expostos por 168h. Os biomarcadores de rim, lipídeos, fígado, ossos, cálcio e sangue demonstraram que a atrazina causou desnutrição, anemia, perda de massa muscular e danos hepáticos no fígado, indicando que os girinos tiveram um aumento no gasto de energia para tentar manter a homeostase.

**Palavras-chave:** pesticidas, sangue, anfíbios, proteína, glicose, marcadores bioquímicos, toxicologia



## ABSTRACT

The detection of agrochemicals in water bodies has become increasingly frequent due to increased agricultural production and export, indiscriminate use and inadequate disposal of derivatives of these contaminants. This contamination occurs through rain, irrigation, leaching and winds, reaching the water table. Aquatic biota is one of the most impaired because it is constantly exposed to toxic substances from domestic, industrial effluents, agricultural drainage and washing of packaging. Atrazine is a herbicide belonging to the triazine group, which accounts for 30% of the world herbicide production and is used to control weeds in maize, sugar cane and sorghum plantations. Anurans are considered good environmental bioindicators, since they are constantly exposed to water and the terrestrial environment. The objective of this work was to analyze the biochemical effects of the herbicide atrazine on the liver of tadpoles of bullfrog (*Lithobates catesbeianus*). The concentrations of atrazine were calculated based on the maximum concentration allowed in Brazilian waters for human consumption ( $2\mu\text{g L}^{-1}$ ). The concentrations of  $40\ \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $200\ \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $2,000\ \mu\text{g L}^{-1}$  and  $20,000\ \mu\text{g L}^{-1}$  were tested in addition to a negative control (without addition of the product), to which organisms were exposed for 168 h. Biomarkers of kidney, lipid, liver, bone, calcium and blood demonstrated that atrazine caused malnutrition, anemia, loss of muscle mass and liver damage in the liver, indicating that tadpoles had an increase in energy expenditure to try to maintain homeostasis.

**Keywords:** pesticides, blood, amphibians, protein, glucose, biochemical markers, toxicology

## INTRODUÇÃO GERAL

A utilização de agrotóxicos tem sido intensificada visando à proteção de lavouras contra doenças e pragas devido ao aumento pela demanda por produtos agrícolas em grande escala, em menor tempo e com qualidade melhor. Isto faz com que a presença destes poluentes seja constante nos corpos hídricos aumentando assim os riscos ambientais (RAMALHO *et al.*, 2000; VASCONCELOS, 2014).

De acordo com a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, os pesticidas são definidos como produtos que alteram a composição da flora ou da fauna, preservando-as de ações danosas de seres nocivos (BRASIL, 1989). Herbicidas estão entre os tipos de agrotóxicos mais utilizados e comercializados em todo o mundo (STENERSEN, 2004). Em 2008, o Brasil assumiu o posto de maior mercado consumidor de agrotóxicos do mundo segundo o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Defesa Agrícola- SINDAG (SINDAG 2011).

Os pesticidas possuem a “Avaliação do Potencial de Periculosidade Ambiental” e são classificados de acordo com as suas propriedades físico-químicas, toxicidade para diversos organismos, capacidade de acumulação em tecidos vivos, persistência no ambiente, capacidade de deslocamento através do solo, ar ou água, capacidade de causar mutações, câncer e más formações em fetos ou embriões e se causam risco na reprodução de aves e de mamíferos. De acordo com essas características eles são incluídos em quatro classes distintas: I – Produto Altamente Perigoso, II – Produto Muito Perigoso, III – Produto Perigoso e IV – Produto Pouco Perigoso (IBAMA, 2010). Os agrotóxicos também são classificados de acordo com sua toxicidade em humanos: I - Extremamente tóxico, II – Altamente tóxico, III – Medianamente tóxico e IV - Pouco tóxico (SVS, 1992). Alguns agrotóxicos têm a capacidade de se dispersar no meio ambiente e outros possuem a capacidade de se acumular no organismo humano, inclusive no leite materno (CARNEIRO *et al.*, 2012). Grande parte dos agrotóxicos são capazes de desregular o equilíbrio endócrino em mamíferos e na biota aquática. São cancerígenos, causam infertilidade, más-formações congênitas e modificações na qualidade do sêmen em humanos (WAISSMANN, 2002; ISLAN; HARA; MIYAKE, 2002; KOIFMAN e HATAGIMA, 2003; CHRISTIN *et al.*, 2004).

A atrazina (ATZ) (1-cloro-3-etilamino-5-isopropilamino- 2,4,6 triazina) pertence ao grupo das triazinas, que são responsáveis pela inibição fotossintética, fazendo com que o fluxo de elétrons no fotossistema II seja interrompido (HESS, 2000). A ATZ possui alta persistência no solo e amplo potencial de contaminação ambiental devido sua alta capacidade de lixiviação e escoamento. É solúvel em solventes orgânicos e é encontrada facilmente em corpos d'água e em águas de abastecimento público. (BESPLUG *et al.*, 2004; FUERT and HORMAN, 1991; GRISOLIA, 2005; KLEINSCHMITT, 2007). Apresenta potencial carcinogênico para o ser humano, sendo absorvida via trato gastrointestinal e distribuída pelos rins, fígado e outros tecidos (DONNA *et al.*, 1989; VIEIRA *et al.*, 2014, STAYNER *et al.*, 2017). Resíduos de ATZ podem permanecer estáveis em leite e água, causando efeitos neurológicos e reprodutivos, entretanto, ela não magnifica (SOLOMON *et al.*, 2008; GILDEN *et al.*, 2010; GARCÍA *et al.*, 2011).

A aplicação da ATZ, na pré- emergência das plantações é realizada antes simultaneamente ou depois da semeadura. Na pós-emergência, deve ser feita preferencialmente nos estágios iniciais de desenvolvimento das ervas daninhas em plantações de milho, cana de açúcar, milho e soja (EMBRAPA, 2006; SILVA *et al.*, 2007). Sua classificação quanto ao potencial de periculosidade ambiental é III (produto perigoso) e quanto a toxicologia é III (medianamente tóxico).

No Brasil de acordo com a portaria 2914 o limite máximo de ATZ permitido em águas destinadas ao consumo humano e em águas doces pertencentes às classes I, II e III é de  $2 \mu\text{g l}^{-1}$  (BRASIL, 2011; CONAMA, 2005).

A meia vida no solo varia em torno de 60 dias, mas isso pode variar de acordo com o tipo de microbiota, condição climática, disponibilidade de nutrientes como carbono e nitrogênio. Na água sua meia vida é em torno de 1200 dias (SILVA *et al.*, 2007; HUNTER and SHANER, 2010). A maioria das investigações sobre os efeitos da ATZ se concentram em peixes e anfíbios (ROHR e MCCOY, 2010).

A introdução dos herbicidas no ambiente aquático ocorre através da aplicação na agricultura ou diretamente na água, visando à eliminação de espécies de plantas, algas ou vetores de doenças indesejáveis (ABEL, 1989). Estes usos podem causar problemas a curto, médio e longo prazo na comunidade aquática e são dependentes das características físico-químicas, desta forma, podem se ligar ao material

particulado em suspensão, se depositar no sedimento de fundo ou ser absorvidos por organismos aquáticos (SILVA & SANTOS, 2007).

O conhecimento da toxicidade de agentes químicos a diferentes organismos aquáticos possibilita avaliar, quantificar e definir limites de emissão destas substâncias, estabelecendo padrões na qualidade da água e avaliando o nível de periculosidade ambiental. Os ensaios ecotoxicológicos são uma ferramenta para atingir esses objetivos (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008). Para avaliar esses impactos o uso de biomarcadores são necessário, pois avaliam os efeitos subletais a diferentes tipos de contaminantes, tais como os metais, xenobióticos orgânicos e compostos organometálicos (ROSS *et al.*, 2002).

Desde a década de 1980 a população de anfíbios vem sofrendo uma drástica diminuição (BLAUSTEIN *et al.*, 1994; SPARLING e FELLERS, 2009; HAYES *et al.*; 2010). Diversos autores relacionam esse declínio devido à poluição química, introdução de espécies exóticas, aumento da radiação ultravioleta e patógenos que causam diminuição na taxa de crescimento, má formação e anormalidades (ALLRAN e KASAROV, 2000; BOONE *et al.*, 2007; HAYES *et al.*, 2002).

Os anfíbios são utilizados como modelos de estudos em ensaios ecotoxicológicos, porque possuem pele permeável e dependem do ambiente aquático para reprodução e desenvolvimento larval. Muitas vezes esses reservatórios de água estão próximos a áreas agrícolas e podem ser depósitos de pesticidas (FRANÇA *et al.*, 2015; KIESECKER, 2004; STUART *et al.*, 2004; STORRS e KIESECKER, 2004; SILVANO e SEGALLA, 2005).

A espécie *Lithobates catesbeianus* popularmente conhecida como rã-touro é uma espécie exótica do nordeste dos E.U.A e sudeste do Canadá (SCHLOEGEL *et al.*, 2010). É considerada um excelente bioindicador ambiental e seu uso em ensaios ecotoxicológicos ocorre pela sua distribuição ampla, facilidade de criação, aquisição e sensibilidade elevada na avaliação de efeitos deletérios de águas contaminadas.

Seus órgãos são excelentes biomarcadores de qualidade ambiental, alimentar, sanitário e zootécnico. Qualquer alteração ambiental irá afetar suas brânquias, rins, fígado e sangue (FERREIRA *et al.*, 2002; FERREIRA *et al.*, 2004; HIPOLITO *et al.*, 2004). Também podem ser analisados os marcadores de sangue (glicose sanguínea e plasmática), dos rins (ureia e creatinina), de lipídios (colesterol,

HDL, triglicérides), de ossos (cálcio) e do fígado (Transaminase glutâmico pirúvica-TGP, Fosfatase alcalina – FAL, quantificação de proteína, fenóis, peroxidase e polifenoloxidase).

O sangue é uma excelente ferramenta para as avaliações fisiológicas, bioquímicas e patológicas nos animais, pois está constantemente em contato com os órgãos, tecidos e células (ADHIKARI *et al.*, 2004). Através dos parâmetros hematológicos é possível estimar se o animal apresenta problemas nutricionais, má alimentação, má absorção intestinal, parasitoses, inflamações, intoxicações, infecções, estresse, distúrbios metabólicos e outras anomalias (RANZANI-PAIVA *et al.*, 2004).

O fígado possui funções, de excreção de produtos de degradação, secreção da bile, armazenamento de lipídios e glicogênio, síntese de globulinas e albumina, esterificação de ácidos graxos livres, metabolismo de proteínas, carboidratos e gorduras, regulando a concentração de metabólitos no sangue. Dessa forma, alterações nas funções básicas podem prejudicar o desenvolvimento desse organismo, podendo levar a um quadro irreversível, diminuição na taxa de crescimento e a morte (DELLMANN and BROWN, 1982; GUYTON and HALL, 2002).

O presente trabalho está escrito em um capítulo, na forma de artigo científico, intitulado “Avaliação do potencial tóxico da atrazina sobre girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*)”, que teve como objetivo analisar os danos gerados ao equilíbrio bioquímico desses animais após à exposição ao herbicida atrazina .

## REFERÊNCIAS

ABEL, P.D. 1989. Water pollution. Chichester: Ellis Horwood Limited. London. Taylor & Francis. 296p.

ADHIKARI, S.; SARKAR, B.; CHATTERJEE, A.; MAHAPATRA, C.T.; AYYAPPAN, S. 2004. Effects of cypermethrin and carbofuran on certain hematological parameters and prediction of their recovery in a freshwater teleost, *Labeo rohita* (Hamilton). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 58(2): 220-226.

ALLRAN, J.W.; KARASOV, W.H. 2000. Effects of atrazine and nitrate on northern leopard frog (*Rana pipiens*) larvae exposed in the laboratory from posthatch through metamorphosis. *Environmental Toxicology*, 19(11): 2850–2855.

BESPLUG, J.; FILKOWSKI, J.; BURKE, P.; KOVALCHUK, I.; KOVALCHUK, O. 2004. Atrazine Induces Homologous Recombination But Not Point Mutation in the Transgenic Plant-Based Biomonitoring Assay. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 46(3): 296-300.

BLAUSTEIN, A.R.; WAKE, D.B.; SOUSA, W.P. 1994. Amphibian declines: judging stability, persistence, and susceptibility of populations to local and global extinctions. *Conservation Biology* 8:60-71.

BOONE, M.D.; SEMLITSCH, R.D.; EDWARD, E.L.; DOYLE, M.C. 2007 Multiple stressors in amphibian communities: effects of chemical contamination, bullfrogs, and fish. *Ecological Applications*, 17(1): 291–301.

BRASIL, 1989 LEI nº. 7.802, de 11 de julho de 1989. Legislação federal de agrotóxicos e afins. Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Brasília. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/LEIS/L7802.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/L7802.htm). Acesso em agosto de 2018.

BRASIL, 2011. Portaria n.º 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Brasília. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914\\_12\\_12\\_2011.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html). Acesso em agosto de 2018.

CARNEIRO, F.; RIGOTTO, R.; GIRALDO, L.; PIGNATI, W.; RIZZOLO, A.; ALEXANDRE, V.P.; FARIA, N.M.X.; FRIEDRICH, K.; MELLO, M.S.C. 2012. Dossiê

ABRASCO – Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Parte 1 - Agrotóxicos, Segurança Alimentar e Nutricional e Saúde. Rio de Janeiro.

Disponível em: [https://www.abrasco.org.br/dossieagrototoxicos/wp-content/uploads/2013/10/DossieAbrasco\\_2015\\_web.pdf](https://www.abrasco.org.br/dossieagrototoxicos/wp-content/uploads/2013/10/DossieAbrasco_2015_web.pdf)

CHRISTIN, M. S.; MÉNARD, L.; GENDRON, A. D.; RUBY, S.; CYR, D.; MARCOGLIESE, D. J.; ROLLINS-SMITH, L.; FOURNIER, M. 2004. Effects of agricultural pesticides on the immune system of *Xenopus laevis* and *Rana pipiens*. *Aquatic Toxicology*, 67(1): 33-43.

CONAMA 2005. Conselho Nacional de Meio Ambiente, nº357, de 17 de Março de 2005. Disponível em: <http://www2.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>. Acesso em agosto de 2018.

DELLMANN, H.D.; BROWN, E.M. 1982. *Histologia veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 397p.

DONNA, A.; CROSIGANI, P.; ROBUTTI, F.; BETTA, P.G.; BOCCA, R.; MARIANI, N.; FERRARIO, F.; FISSI, R.; BERRINO, F. 1989 Triazine herbicides and ovarian epithelial neoplasms. *Scandinavian Journal of work. Environment and health*, 15(1): 47-53.

EMBRAPA. 2006. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Principais herbicidas indicados para cultura de milho no sistema plantio direto e no preparo convencional do solo. Passo Fundo, RS. Disponível em: [http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p\\_do61\\_13.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do61_13.htm); Acesso em: Agosto de 2018

FERREIRA, C.M.; LOMBARDI, J.V.; MACHADO-NETO, G.; BUENO-GUIMARAES, H.M.; SOARES, S.R.C.; SALDIVA, P.H.N. 2004. Effects of Copper Oxychloride in *Rana castelbeiana* Tadpoles: Toxicological and Bioaccumulative Aspects. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 73(3): 465–470.

FERREIRA, C.M.; PIMENTA, A.G.G.; PAIVA-NETO, J.S. 2002. Introdução à ranicultura. Boletim do Instituto de Pesca, 33: 15p.

FRANÇA, F.M.; BRAZIL DE PAIVA, T.C.; MARCANTÔNIO, A.S.; TEIXEIRA, C.; FERREIRA, C.M. 2015. Acute toxicity and ecotoxicological risk assessment of rice pesticides to *Lithobates catesbeianus* tadpoles. *Journal of Environmental Science and Health*, 50(6): 406-410.

FUERT, E.P.; HORMAN, M.A. 1991. Interactions of herbicides with photosynthetic electron transport. *Weed Science*, 39(3): 458-464.

GARCÍA, M. Á.; SANTAEUFEMIA, M.; MELGAR, M. J. 2011. Triazine residues in raw milk and infant formulas from spanish northwest, by a diphasic dialysis extraction. *Food and Chemical Toxicology*, 50(03-04): 503-510.

GILDEN, R.C., HUFFLING, K., SATTLER, B. 2010. Pesticides and health risks. *Journal of Obstetric, Gynecologic & Neonatal Nursing*, 39(1): 103–110.

GRISOLIA, C.K. 2005. Agrotóxico: mutações, câncer e reprodução. Editora Universidade de Brasília, 392p.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. 2002. Tratado de fisiologia médica. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan 972 p.

HAYES, T.B.; KHOURY, V.; NARAYAN, A.; NAZIR, M.; PARK, A.; BROWN, T.; ADAME, L.; CHAN, E.; BUCHHOLZ, D.; STUEVE, T.; GALLIPEAU, S. 2010. Atrazine induce complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(10): 4612- 4617.

HAYES, T.; HASTON, K.M.; TSUI, M.; HOANG, A.; HAEFFELE, C.; VONK, A. 2002. Feminization of male frogs in the wild. *Nature*, 419(6910): 895-896.



HESS DAN, F. 2000. Light dependent herbicides: an overview. *Weed Science*, 48(2): 160- 170.

HIPOLITO, M.; MARTINS, A.M.C.R.P.F.; BACH, E.E. 2004. Aspectos bioquímicos em fígados de rãs-touro (*Rana castebeiana* SHAW, 1802) sadias e doentes. *Arquivos do Instituto Biológico*, 71(2): 147-153.

HUNTER, W.J.; SHANER, D.L. 2010. Biological Remediation of Groundwater Containing Both Nitrate and Atrazine. *Current Microbiology*, 60(1): 42–46.

IBAMA 2010. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Produtos Agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil uma abordagem ambiental. Disponível em: <http://www.ebah.com.br/content/ABAAABjtEAl/produtos-agrotoxicos-comercializados-brasil-2009>. Acesso em: Agosto de 2018.

ISLAN, M. O.; HARA, M.; MIYAKE, J. 2002. Induction of P-glycoprotein, glutathione-S-transferase and cytochrome P450 in rat liver by atrazine. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 12(1): 1-6.

KIESECKER, J.M.; BLAUSTEIN, A.R.; BELDEN, L.K. 2001. Complex causes of amphibian population declines. *Nature* 410 (6829): 681–684

KLEINSCHMITT, A.R.B. 2007. *Transporte e retenção de triazinas em compartimentos ambientais terrestres e aquáticos em área de milho no sistema de plantio direto*. Porto Alegre. (Dissertação de Doutorado, Rio Grande do Sul Universidade Federal do Rio Grande do Sul).

KOIFMAN, S.; HATAGIMA, A. 2003. Disruptores endócrinos no ambiente: efeitos biológicos potenciais (Editorial). *Revista Brasileira de Mastologia*, 13(1): 9-11.

RAMALHO, J.F.G.P.; SOBRINJO, N.M.B.A.; VELLOSO, A.C.X. 2000. Contaminação da microbacia de Caetés com metais pesados pelo uso de agroquímicos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 35(7): 1289-130.

RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.A.P. 2004. *Sanidade de Organismos Aquáticos*. São Paulo Editora Varela. 89-120p.

ROHR, J.R.; MCCOY, K.A.A. 2010 A Qualitative Meta-Analysis Reveals Consistent Effects of Atrazine on Freshwater Fish and Amphibians. *Environmental Health Perspectives*, 118(1): 20-33.

ROSS, K.; COOPER, N.; BIDWELL, J.R.; ELDER, J. 2002. Genetic diversity and metal tolerance of two marine species: a comparison between populations from contaminated and reference sites. *Marine Pollution Bulletin*, 44(7): 329-334.

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 (1): 53-61.

SILVA, J.F.; FERREIRA, L.R.; FERREIRA F.A. 2007. Herbicidas: absorção, translocação, metabolismo, formulação e misturas. In: Silva AA, Silva JF. *Tópicos em manejo de plantas daninhas*. Editora UFV, 22: 367.

SILVA, J.M.; SANTOS, J.R. 2007. Toxicologia de agrotóxicos em ambientes aquáticos. *Oecologia Brasiliensis*, 11(4): 565-573.

SILVANO, D.L.; SEGALLA, M.V. 2005. Conservação de anfíbios no Brasil. *Megadiversidade*, 1(1): 79-86.

SINDAG 2011. Sindicato Nacional das Indústrias de Defensivos Agrícolas. Vendas de defensivos agrícolas são recordes e vão a US\$ 8,5 bi em 2011. Folha de São

Paulo. Disponível em: [http://www.sindag.com.br/noticia.php?News\\_ID=2256](http://www.sindag.com.br/noticia.php?News_ID=2256). Acesso em agosto de 2018.

SOLOMON, K. R.; CARR, J. A.; DU PREEZ, L. H.; GIESY, J. P.; KENDALL, R. J.; SMITH, E.E. 2008. Effects of atrazine on fish, amphibians, and aquatic reptiles: a critical review. *Critical Reviews in Toxicology*, 38(13): 721–772.

SPARLING, D.W.; FELLERS, G.M. 2009. Toxicity of two insecticides to California, U.S.A, anurans and its relevance to declining amphibian populations. *Environmental Ecotoxicology Chemical*, 28(8): 1696–1703.

STAYNER, L. T.; ALMBERG, K.; JONES, R.; GRABER, J.; PEDERSEND, M.; TURYK, M. 2017. Atrazine and nitrate in drinking water and the risk of preterm delivery and low birth weight in four Midwestern states. *Environmental Research*, 152 (2017): 294-303.

STENERSEN, J. 2004. *Chemical pesticides: mode of action and toxicology*. Boca Raton, Flórida. 276p.

STORRS, S.I.; KIESECKER, J.M. 2004. Survivorship Patterns of Larval Amphibians Exposed to Low Concentrations of Atrazine. *Environmental Health Perspective*, 112(10): 1054-1057.

STUART, S.N.; CHANSON, J.S.; COX, N.A.; YOUNG, B.E.; RODRIGUES, A.S.L.; FISCHMAN, D.L.; WALLER, R.W. 2004. Status and Trends of Amphibian Declines and Extinctions Worldwide. *Science*, 306(5702): 1783-1786.

SVS- Secretaria de vigilância sanitária. 1992 Portaria nº. 03, de 16 de janeiro de 1992. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs1/1992/prt0003\\_16\\_01\\_1992.html](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs1/1992/prt0003_16_01_1992.html). Acesso em Agosto de 2018.

VASCONCELOS, A. M. 2014. *Avaliação dos efeitos do agrotóxico Vermitec 18CE sobre girinos de Lithobates catesbeianus (Amphibia, Anura, Ranidae)*. São Paulo 149 (Dissertação de Doutorado São Paulo Universidade de São Paulo).

VIEIRA, E. F. S.; CESTARIA, A. R.; CHAGAS, R. A.; CORTES, G. K.R. 2014. Obtenção e caracterização de matriz apropriada para sistemas de liberação prolongada – estudos de liberação dos herbicidas atrazina e diuron. *Quimica Nova*, 37(30): 398-403.

WAISSMANN, W. 2002. Vigilância sanitária e desreguladores endócrinos. *Caderno de Saúde Pública*, 18(2): 511-7.

ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. 2008. *Ecotoxicologia Aquática: princípios e aplicações*. 2ª ed. São Carlos: RIMa, 478.

# **CAPÍTULO 1**

## **Análises bioquímicas do fígado de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) após a exposição ao herbicida atrazina**

### **Resumo**

A atrazina é o terceiro herbicida mais vendido no Brasil, ocupando o sétimo lugar entre os pesticidas mais comercializados. Devido ao seu escoamento fácil, sua baixa reatividade e solubilidade, moderada adsorção a matéria orgânica e argila e alta persistência em solo, seus resíduos podem ser encontrados após longo tempo de aplicação e seu uso já foi proibido em inúmeros países. Os anfíbios são importantes bioindicadores para avaliar o impacto de pesticidas como a atrazina, pois passam boa parte de seu ciclo de vida na água. Este estudo teve como objetivo avaliar a resposta de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) frente à exposição a este herbicida. Os animais foram expostos por 168h as seguintes concentrações: controle negativo, 40  $\mu\text{g L}^{-1}$ , 200  $\mu\text{g L}^{-1}$ , 2.000  $\mu\text{g L}^{-1}$ , 20.000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de atrazina. Foram realizadas análises da atividade natatória e também avaliação do perfil bioquímico através de análises da glicose sanguínea e plasmática, ureia, creatinina, colesterol, HDL, triglicérides, Transaminase glutâmico pirúvica - TGP, Fosfatase alcalina - FAL, cálcio, proteínas totais, fenol, atividade da peroxidase e da polifenoloxidase. Os resultados evidenciaram desnutrição, anemia, provável perda de massa muscular e danos hepáticos, indicando que a atrazina pode levar a um aumento no gasto de energia para manter a homeostase e a sobrevivência dos animais.

**Palavras chave:** Herbicidas. Triazina. Fígado. Sangue. Anfíbio. Biomarcadores.

## **Biochemical analyzes of the liver of tadpoles of bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) under the exposure of herbicide atrazine**

### **Abstract**

Atrazine is the third best-selling herbicide in Brazil, occupying the closest place among the most commercialized pesticides. Facility to the easy, low reactivity and solubility, adsorption to a physical matter and high persistence and solubility, moderate adsorption to organic matter and high and persistence in soil Amphibians are important bioindicators to evaluate the impact of pesticides such as atrazine, such as atrazine the good part of its life cycle in the water. This study aimed to evaluate the response of bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*) to exposure to this herbicide. The animals were exposed for 168h the following amounts: negative control, 40  $\mu\text{g L}^{-1}$ , 200  $\mu\text{g L}^{-1}$ , 2,000  $\mu\text{g L}^{-1}$ , 20,000  $\mu\text{g L}^{-1}$  of atrazine. The activity and analyzes were performed to evaluate the biochemical profile (blood and plasma glucose, urea, creatinine, cholesterol, HDL, triglycerides, glutamic pyruvic transaminase (GPT), alkaline phosphorase (AP), calcium, total proteins, phenol peroxidase and polyphenoloxidase, anemia, loss of muscle mass and hepatic action, have to be increased to maintain the homeostasis and survival of the animals.

**Keywords:** Herbicides. Triazine. Liver. Blood. Amphibian. Biomarkers.

## Introdução

Pesticidas são sinônimos de agrotóxicos ou defensivos agrícolas definidos como quaisquer substâncias que tenham como objetivo prevenir, destruir ou diminuir organismos que causem danos à plantação, e são também conhecidos por: herbicidas, bactericidas, fungicidas, acaricidas e praguicidas (Mezzari 2002; Coutinho et al. 2005; Arias-Estévez et al. 2008; Jardim and Caldas 2012).

O uso inadequado ou indiscriminado destes produtos pode causar prejuízos ao ecossistema e a saúde ambiental. O controle químico para espécie invasoras é responsável pela contaminação do solo e da água, pois somente 0,1% do que é aplicado atinge seu alvo específico, o restante se desloca para o ambiente (Ueta et al. 2001). Quando atinge o ambiente aquático, o pesticida pode degradar, volatilizar, dissolver na água, ser adsorvido a matéria em suspensão, depositar no sedimento ou ser absorvido pelos organismos vivos (Younos and Weigman 1988). Grisolia (2005) acrescenta que muitos agrotóxicos apresentam risco de mutagenicidade, carcinogenicidade e teratogenicidade aos humanos.

A fim de minimizar as possíveis consequências no meio ambiente, diversos países possuem limites de aplicação e de produção destes produtos (Zagatto and Bertolletti 2008). Os resíduos agrícolas podem ser encontrados em plantas, animais, águas, solo e no aquífero freático. Sua contaminação ocorre através da aplicação intencional, indiscriminada, chuva, irrigação, lavagem de embalagens e descartes de efluentes industriais e domésticos, sendo que muitos desses resíduos são persistentes no meio ambiente (Tomita and Beyruth 2002; Arias et al. 2007; Zagatto and Bertolletti, 2008; EPA 2017).

Desde 2009 o Brasil é o maior consumidor e produtor de agrotóxicos do mundo (MDA 2012; ANVISA 2013).

A atrazina (ATZ) (1-cloro-3-etilamino-5-isopropilamino- 2,4,6 triazine) foi comercializada pela primeira vez na década de 1950 e desde então seu uso vem sendo detectado no ecossistema aquático. Ela pertence ao grupo das triazinas, que são os herbicidas responsáveis por inibir o fotossistema II, atuando na membrana do cloroplasto, inibindo o transporte de elétrons, sua eficácia pode ser potencializada com a combinação a outros pesticidas (Graymore et al. 2001; Spadotto et al. 2004; Coutinho et al. 2005; Arias et al. 2007). Esses herbicidas são utilizados em pré e pós



emergência em plantações de milho, cana de açúcar, soja, sorgo e trigo (Graymore et al. 2001; Christoffolet et al. 2004; Zhang et al. 2014).

Segundo o IBAMA (2010) a ATZ é o sétimo herbicida mais vendido no Brasil, o primeiro herbicida é o glifosato e seus sais seguido pela cipermetrina. A ATZ é altamente comercializada nos estados do Mato Grosso, São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul.

A ATZ não bioacumula se de forma significativa, mas devido ao seu escoamento fácil, a sua baixa reatividade e solubilidade, moderada adsorção a matéria orgânica e argila e alta persistência em solo, seus resíduos podem ser encontrados após longo tempo de aplicação e seu uso já foi proibido em inúmeros países (Coelho 2002; Ghosh and Philip 2006; Solomon et al. 2008; Singh et al. 2017). Sua meia vida é de 60 dias no solo, mas pode variar de acordo com as características do solo. Os microrganismos são os principais responsáveis pela biodegradação de poluentes presentes na água e solos; valores extremos de pH declinam a atividade microbiana, valores moderados tornam a biodegradação mais rápida, a temperatura influencia a pressão de vapor dos pesticidas, a disponibilidade de água no solo afeta a atividade, diversidade, sobrevivência e o movimento dos microrganismos e a matéria orgânica seja nativa ou adicionada influencia a persistência dos pesticidas pelo aumento da atividade microbiana (Silva et al. 2007). Na água sua meia vida é de 1200 dias, para que ocorra a degradação e/ou diminuição da ATZ é recomendado uma filtração lenta seguida por filtros biológicos de carvão ativado (Konstantinou et al. 2005; Zanini 2010).

No Sul do Brasil a ATZ foi encontrada em águas superficiais e em poços de água (Bortoluzzi et al. 2007), por isso as agências ambientais brasileiras têm incentivado o estabelecimento de programas de monitoramento para avaliar a qualidade dos recursos hídricos, a fim de garantir a proteção da saúde humana. A concentração máxima permitida em águas brasileiras de classe I a III é de  $2 \mu\text{g L}^{-1}$  (CONAMA 2005; Brasil 2011).

No Canadá, seu limite máximo permitido é de  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  (European Commission 1998), nos Estados Unidos é  $3 \mu\text{g L}^{-1}$  (Spadotto et al. 2004; US-EPA 2005) e  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  na União Europeia, porém detecções acima do limite permitido foram encontradas em águas para consumo humano estipulados pelo Conselho da União Europeia,

dessa forma seu uso foi proibido (Salaberria et al. 2009; Ackerman et al. 2014). Na Alemanha, Itália e Suécia seu uso também é proibido (Traghetta et al. 1996; Spadotto et al. 2004).

A preservação da qualidade de água nos ecossistemas aquáticos é de fundamental importância para a biota aquática e para a utilização de recursos domésticos e agrícolas (Paulino 2011). A contaminação química vem afetando os anfíbios em nível de indivíduo, população e comunidade, evidenciando o declínio populacional de anfíbios (Blaustein et al. 2003; Boone et al. 2007).

Os anfíbios são considerados ótimos bioindicadores ambientais, pois cerca de 70% das espécies possuem parte de seu ciclo de vida na água, ovo sem casa e pele permeável os tornando sensíveis a mudanças ambientais presentes na água e no solo (Blaustein and Kiesecker 2002; França et al. 2015). Populações que vivem próximas às áreas agrícolas, correm o risco de serem afetadas durante o seu desenvolvimento, reprodução e também em sua sobrevivência (Davidson et al. 2002; Blaustein and Johnson 2003). Além disto, seus órgãos internos podem ser utilizados como biomarcadores morfológicos de efeito, com obtenção de resultados mais específicos sobre o impacto de xenobióticos na organofisiologia geral do organismo (Abdalla et al. 2013; Dal-medico et al. 2014; Salla et al. 2016; Rissoli et al. 2016).

A rã-touro *Lithobates catesbeianus* é uma espécie exótica originária do nordeste dos E.U.A e sudeste do Canadá. Foi introduzida no Brasil em 1935, adaptando se perfeitamente as condições climáticas (Schloegel et al. 2010). É onívora na fase de girino e carnívora na fase adulta. Seu uso em ensaios de ecotoxicologia se da pela sua ampla ocorrência, facilidade de criação, aquisição e seu alto potencial na avaliação de efeitos deletérios de águas contaminadas, sendo seu sangue e alguns órgãos como rins e fígado excelentes biomarcadores para este fim (Ferreira et al. 2002; Ferreira et al. 2004; Hipolito et al. 2004). Nos ensaios de ecotoxicologia pode-se utilizar marcadores de sangue (Glicose), marcadores dos rins (ureia e creatinina), marcadores de lipídios (colesterol, HDL, triglicérides), marcadores de ossos (cálcio), e marcadores do fígado (Transaminase glutâmico pirúvica - TGP, Fosfatase alcalina – FAL, quantificação de proteína, fenóis, peroxidase e polifenoloxidase).

Sendo os anfíbios bons bioindicadores ambientais utilizamos neste estudo girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) como modelo experimental e avaliamos sua resposta frente à exposição ao herbicida atrazina.

## **Materiais e métodos**

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Toxicologia Aquática do Instituto de Pesca, SP baseados nas normas da APHA (2005) e ASTM (2014) e foram conduzidos com a permissão do Comitê de Ética e Experimentação Animal do Instituto de Pesca (Protocolo N<sup>o</sup>1535). A água utilizada no experimento foi oriunda de osmose reversa e reconstituída para minimizar a variação dos parâmetros físicos e químicos e interferência de qualquer outro produto químico. Para isso foi escolhida “água mole”, com dureza entre 40-48 de mgCaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>. Para se obter essa água foram adicionados os seguintes sais a água de osmose reversa: 48 mg L<sup>-1</sup> de Bicarbonato de Sódio (NaHCO<sub>3</sub>); 30 mg L<sup>-1</sup> de Sulfato de Cálcio di-hidratado (CaSO<sub>4</sub>. 2H<sub>2</sub>O); 30 mg L<sup>-1</sup> de Sulfato de Magnésio (MgSO<sub>4</sub>) e 2,5 mg L<sup>-1</sup> de Cloreto de Potássio (KCl), garantindo que o pH ficasse entre 7,2-7,6 (APHA et al. 2005).

A ATZ utilizada foi da marca ATANOR 50 SC®, com a concentração de ingredientes inertes de 500 g L<sup>-1</sup>. Foram utilizados girinos de rã-touro no estágio 31 a 36 de Gosner (1960), com peso médio de 2,6 g ± 0,4. Os exemplares foram provenientes do Ranário de Jujutiba, SP. Os girinos foram aclimatados por sete dias, com fotoperíodo de 12h luz/12h escuro, com uma temperatura de 22°C ± 1,0. A alimentação foi realizada duas vezes ao dia com 1% da biomassa do grupo, com ração triturada Laguna, da marca Socil (40%PB).

O ensaio foi composto por quatro tratamentos e um controle negativo conduzidos em quadruplicata, totalizando 20 aquários de oito litros distribuídos aleatoriamente. Os girinos, na densidade de 1 girino por litro, foram distribuídos aleatoriamente, totalizando 160 girinos que ficaram expostos por 168 horas sem troca de água.

O controle negativo foi constituído somente de água reconstituída. Os tratamentos foram baseados na concentração do padrão de ATZ que é de 500 mg L<sup>-1</sup>, obtendo-se as seguintes concentrações 40 µg L<sup>-1</sup>, 200 µg L<sup>-1</sup>, 2.000 µg L<sup>-1</sup> e

20.000  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Ressaltasse que a concentração máxima permitida pelo CONAMA para águas brasileiras é de 2  $\mu\text{g L}^{-1}$  e para USEPA é de 3  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Durante a experimentação os girinos foram alimentados a cada 48h, dando 1% da biomassa, os parâmetros físicos e químicos da água foram medidos todos os dias. O oxigênio dissolvido e a temperatura foram analisados por um medidor portátil de oxigênio dissolvido da marca Lutron®. A amônia não ionizada ( $\text{NH}_3$ ), pH e dureza foram analisados com testes colorimétricos da marca LABCON®. A amônia não ionizada ( $\text{NH}_3$ ) foi calculada utilizando-se os valores de amônia total, pH e temperatura de acordo com os dados fornecidos pelo fabricante do teste colorimétrico.

Seguindo-se a metodologia descrita por Rutkoski et al. 2018, a atividade de natação foi avaliada pelo mesmo observador no início do experimento e a cada 48h. Que consistiu em movimentos circulares realizados com uma haste de vidro. A classificação dos movimentos foi feita sempre se comparando o controle: 0 caso o movimento dos girinos das demais concentrações fossem igual ao controle; 1 se o movimento fosse reduzido em relação ao controle; 2 movimento aumentado; 3 contração espontânea e, 4 sem atividade natatória.

Para as análises bioquímicas utilizamos um pool de alíquotas de sangue de 32 girinos, com exceção da última concentração na qual o pool foi de 22 girinos. As coletas foram realizadas no final do ensaio (168h) através de punção caudal, com o auxílio de micropipeta com ponteiros heparinizadas (Fig. 1).

O primeiro parâmetro a ser analisado foi a glicose sanguínea, medida a partir de uma gota de sangue fresco utilizando o “Kit Accu-Chek® Performa”. Para verificar as diferenças estatísticas desse biomarcador em relação ao controle negativo, foi feita a análise de variância (ONE WAY ANOVA) (ZAR 1999), para cada concentração, seguida pelo teste de Kruskal-Wallis e o teste de Tukey.

Com as demais alíquotas de sangue foi feito um pool sanguíneo dos animais por tratamento, que foram colocados em microtubos heparinizados, centrifugados por 5 minutos por 2000 x g, para a separação do plasma. O plasma foi analisado junto ao laboratório da Universidade Nove de Julho (UNINOVE) no sistema bioquímico Advia ®1200 da marca Siemens, que consiste num analisador bioquímico capacitado para processar soro, plasma e urina. As análises realizadas

nesse equipamento a partir do plasma foram: glicose plasmática, ureia, creatinina, colesterol, HDL, triglicérides, Transaminase glutâmico pirúvica (TGP), Fosfatase alcalina (FAL) e Cálcio.

Após a extração de sangue, os animais foram eutanaziados em solução de eugenol (875  $\mu$ L), álcool (3 mL) e água destilada (125 mL) para a retirada do fígado. Este órgão foi mantido sob congelamento para se realizar a quantificação de proteína, fenóis, peroxidase e polifenoloxidase.



Fig. 1 Retirada do sangue de girino de *Lithobates catesbeianus*, através de punção caudal.

Para as análises bioquímicas de quantificação de proteínas, fenol, peroxidase e polifenoloxidase foram selecionados dois girinos por aquário totalizando oito fígados por tratamento. Os órgãos foram pesados, triturados em acetona gelada, esperando a liberação da acetona em dessecador com vácuo, por aproximadamente 30 minutos. Após a secagem, foi colocado cerca de 1 mL de tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7, triturado em almofariz e pistilo, centrifugado a 10.000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi separado abaixo da camada de gordura encontrada.

A quantificação de proteínas foi realizada de acordo com o método de Lowry (Lowry et al. 1951), expressa em mg SAB mL<sup>-1</sup> (SAB = Soro-Albumina Bovina). A quantificação de fenóis foi realizada através do reativo de Folin-Ciocalteu, expressa em mg ácido clorogênico (Swain and Hillis 1959). A atividade da peroxidase foi determinada medindo-se a variação de absorvância do tetraguaiacol formado na reação enzimática com comprimento de onda de 470 nm (Moerschbacher et al. 1986). A absorvância foi lida por um espectrofotômetro computadorizado em 4 minutos e a atividade específica foi expressa como nKat mgSAB<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> de amostra (Southerton and Deverall 1990). Para a atividade da polifenoxidase, mediu-se a variação de ortoquinona formada na reação enzimática com comprimento de onda de 495 nm. A absorvância foi lida em 2 minutos e a atividade expressa como nKat mgSAB<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> de amostra (Srivastava 1987).

## Resultados

Após 48h de exposição à ATZ os girinos do tratamento 2.000 µg L<sup>-1</sup> e 20.000 µg L<sup>-1</sup> começaram a apresentar inchaços abdominais e edemas pelo corpo, mas uma mortalidade expressiva só foi registrada às 168h de exposição (final do experimento) com a mortalidade de 31, 25 % girinos na concentração mais alta.

Os parâmetros físicos e químicos da água durante o ensaio apresentaram os seguintes resultados médios: pH 7,1±0,3; amônia não ionizada (NH<sub>3</sub>) 0,001 mg L<sup>-1</sup>; dureza 44,7°dH ±12,6; temperatura 18,7°C ±0,7 e oxigênio dissolvido 6,5 mg L<sup>-1</sup>±1,1. Esses parâmetros encontram-se dentro dos valores aceitáveis para testes de toxicidade com anfíbios (ASTM 2014).

Relativo ao teste de atividade natatória, nós observamos que após algumas horas de exposição os girinos da concentração mais alta apresentaram movimento reduzido quando comparados com o grupo controle, e isso se repetiu até o final do experimento. Também verificamos que em 96h de exposição os girinos expostos à 2.000 µg L<sup>-1</sup> começaram a apresentar este mesmo padrão. Steinberg et al. (1995) observaram mudanças comportamentais em *Danio reio* expostos a 6 µg L<sup>-1</sup>, essas alterações na atividade natatória indicam que os órgãos do sistema nervoso são afetados, causando problemas comportamentais e na capacidade alimentar deixando-os mais vulneráveis a predadores e reduzindo sua competitividade.

Para as análises de glicose sanguínea realizadas as 168h de exposição à ATZ reportamos os seguintes resultados médios expressos em  $\text{mg dL}^{-1}$ : Controle -  $26,0 \pm 4,4$ ;  $40 \mu\text{g L}^{-1}$  -  $55,5 \pm 6,8$ ;  $200 \mu\text{g L}^{-1}$  -  $58,0 \pm 11,1$ ;  $2.000 \mu\text{g L}^{-1}$  -  $59,0 \pm 7,8$  e  $20.000 \mu\text{g L}^{-1}$  -  $54,0 \pm 13,4$ . De acordo com as análises estatísticas, houve diferença altamente significativa entre o controle e os demais tratamentos ( $p < 0,000004$ ). A Fig. 2 representa graficamente estes resultados.

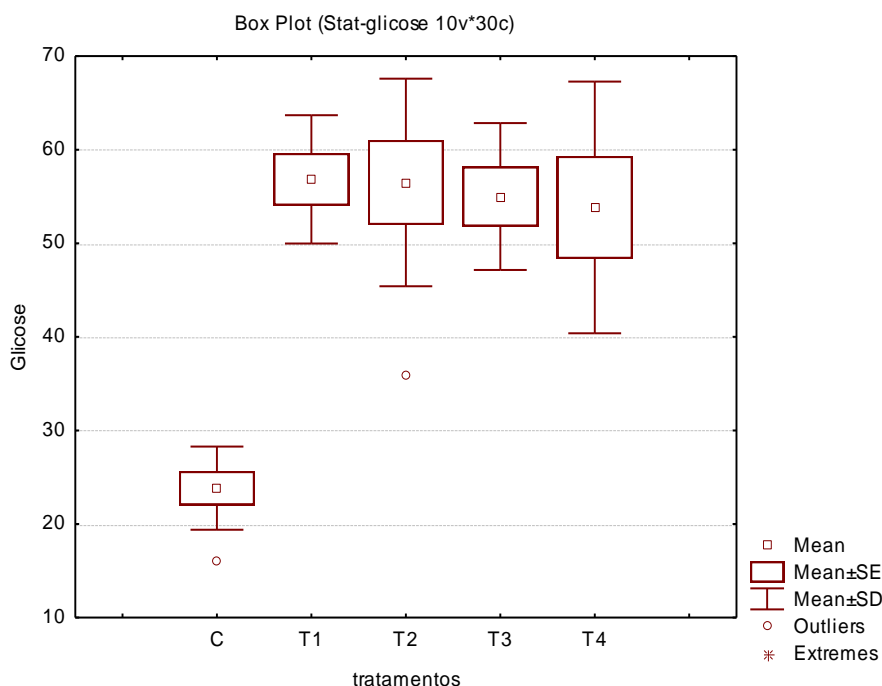


Fig. 2 Gráfico BoxPlot das médias de glicose sanguínea de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) expostos a atrazina por 168h. C - Controle (sem adição do produto),  $40 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $200 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $2.000 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $20.000 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $n=30$ ).

Na Tabela 1 são apresentados os resultados médios das análises bioquímicas realizadas a partir do plasma sanguíneo.

Tabela 1 Valores médios e desvio padrão de Glicose plasmática, Uréia, Creatinina, Colesterol total, HDL (High Density Lipoproteins), Triglicérides, TGP (transaminase glutâmico pirúvica), Fosfatase alcalina (FAL) e Cálcio, resultante das análises bioquímicas do plasma sanguíneo de girinos expostos a diferentes concentrações de atrazina

Concentrações de Atrazina	Glicose (mg dL <sup>-1</sup> )	Uréia (mg dL <sup>-1</sup> )	Creatinina (mg dL <sup>-1</sup> )	Colesterol (mg dL <sup>-1</sup> )	HDL (mg dL <sup>-1</sup> )	Triglicérides (mg dL <sup>-1</sup> )	TGP (mg dL <sup>-1</sup> )	FAL (mg dL <sup>-1</sup> )	Cálcio (mg dL <sup>-1</sup> )
Controle	32,0±0,0	3,0±0,0	0,25±0,0	105,5±0,4	15,4±0,1	122,5±0,7	119,5±0,7	160,5±0,7	4,3±0,0
40 µg L <sup>-1</sup>	57,5±0,7	4,0±0,0	0,23±0,0	128,5±0,7	14,9±0,0	172,5±0,7	154,5±0,7	135,0±0,0	4,2±0,0
200 µg L <sup>-1</sup>	60,0±0,0	4,0±0,0	0,24±0,0	127,5±0,7	14,2±0,0	178,5±0,7	158,0±0,0	111,5±0,7	4,4±0,0
2000 µg L <sup>-1</sup>	55,5±0,7	4,0±0,0	0,23±0,0	123,5±0,7	15,3±0,0	172,0±0,0	165,5±0,7	119,5±0,7	4,8±0,0
20000 µg L <sup>-1</sup>	49,1±0,1	2,0±0,0	0,15±0,0	74,8±0,0	9,5±0,0	138,5±0,7	170,5±0,7	81,5±0,7	2,4±0,0

Pelos resultados obtidos podemos observar que a glicose plasmática apresentou o mesmo comportamento das análises feitas com o sangue colhido a fresco, ou seja, aumentou nos grupos tratados com ATZ. Já para as taxas de uréia e colesterol observamos um leve aumento até a concentração T2.000 µg L<sup>-1</sup> com queda na mais alta concentração, podendo ser um indicativo de desnutrição ligada a presença do herbicida. Corroborando estes resultados observamos que a creatinina diminuiu conforme o aumento das concentrações de ATZ indicando possível perda de massa muscular. A Fosfatase alcalina (FAL), que é uma enzima presente nas células dos ductos biliares que são canais que conduzem a bile do interior do fígado para o intestino, fazendo a digestão de gorduras (Tibi et al. 1989), também diminuiu drasticamente na mais alta concentração confirmando danos hepáticos, desnutrição e anemia. O HDL, triglicérides e cálcio apresentaram um leve aumento até a concentração de T2.000 µg L<sup>-1</sup>, já o TGP teve um aumento em todas as concentrações.

A Tabela 2 apresenta os resultados das avaliações feitas a partir do fígado dos animais em experimentação quantificando proteínas, fenóis, peroxidase e polifenoloxidase.

Tabela 2 Valores médios e desvio padrão de proteína, fenol, atividade de enzima peroxidase e polifenoloxidase realizadas a partir de amostras de fígado (1g) de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) expostos a diferentes concentrações de atrazina.



Concentração de Atrazina	Proteína (mg L <sup>-1</sup> )	Fenol (mg L <sup>-1</sup> )	Peroxidase (U.I)	Polifenoxidase (U.I)
Controle	17,84±1,03	1,69±0,07	0,12±0,12	0,13±0,01
40 µg L <sup>-1</sup>	26,93±3,31	1,90±0,06	0,14±0,02	0,21±0,02
200 µg L <sup>-1</sup>	30,87±3,09	2,91±0,13	0,11±0,03	0,27±0,03
2000 µg L <sup>-1</sup>	39,65±0,57	3,10±0,06	0,22±0,01	0,13±0,01
20000 µg L <sup>-1</sup>	28,73±0,02	3,45±0,14	0,01±0,00	0,01±0,00

Podemos observar que a quantidade de proteína e atividade de peroxidase aumentaram gradativamente (44% e 54%, respectivamente em relação ao controle) até a concentração 2.000 µg L<sup>-1</sup>, caindo drasticamente na mais alta concentração (20.000 µg L<sup>-1</sup>). O mesmo comportamento foi observado para a atividade da polifenoxidase que apresentou um aumento de 48% em relação ao controle na concentração de 200 µg L<sup>-1</sup>. Já os valores de fenol tiveram uma correlação positiva conforme o aumento das concentrações.

## Discussão

A ATZ é um dos herbicidas mais utilizados nas plantações e seu principal objetivo é inibir a fotossíntese sendo que isso causa um efeito direto na comunidade das algas (Dewey 1986). Uma pequena parte dos herbicidas utilizados em plantações pode ir para os corpos de água, por escoamento, lixiviação, cursos d'água e lagos causando alterações e problemas nas comunidades aquáticas (Graymore et al. 2001). Estudos realizados por este mesmo autor demonstraram que organismos de *Daphnia magna* expostas a 250 µg L<sup>-1</sup> de ATZ apresentaram uma redução na reprodução.

A variação sazonal pode influenciar a distribuição das espécies de anuros. Seu período de reprodução é altamente afetado pela distribuição das chuvas, principalmente porque a disponibilidade de sítios aquáticos para a reprodução é maior durante a estação chuvosa (Aichinger 1987). As concentrações de ATZ em lagoas, córregos e reservatórios atingem o pico máximo durante o início da primavera e final do verão nos E.U.A, coincidindo com a época de reprodução de

alguns anfíbios, contaminando-os os através do seus micro-habitat ou através da migração que eles realizam para alcançar as áreas de reprodução (Howe et al. 1998; Solomon et al. 1996; Allran and Karasov 2001; Hayes et al. 2002).

No Brasil a ATZ é conhecida comercialmente como: Atranex 500 SC, Atrazina Nortox 500 SC, Atrazinax, Coyote 500 SC, Gesaprim 500, Gesaprim GRDA, Herbitrin 500 BR, Siptran 800 SC ou Stauzina 500 SC (Embrapa 2006).

Foi relatada como disruptor endócrino, causando alterações nas funções fisiológicas, mesmo em baixas concentrações. Hayes et al. (2002) observaram que larvas da espécie *Xenopus laevis* que ficaram expostas a  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  por 72h apresentaram anormalidades no desenvolvimento gonadal, feminização e hermafroditismo. Em outro estudo, feito por Hayes et al. (2009) observaram que machos de *X. laevis* expostos a ATZ se tornaram fêmeas e produziram ovos viáveis. Suzawa and Ingraham (2008) e Langlois et al. (2009), também observaram a feminização em peixes da espécie *Danio rerio* que ficaram expostos a  $22 \mu\text{g L}^{-1}$  e rã da espécie *Rana pipens* expostos a  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $1,8 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Neste estudo investigamos os possíveis efeitos da ATZ sobre girinos de *L. catesbeianus*. Esperávamos que este herbicida causasse mortalidade imediata aos animais, entretanto, este registro só foi feito no final do experimento e na concentração mais alta. De acordo com Johansson et al. (2006) as exposições a pesticidas em níveis encontrados na natureza geralmente não causam mortalidade imediata.

De acordo com Birge et al. (1983) e Howe et al. (1998) a  $CL_{50-96}$  da ATZ para *L. catesbeianus* e *L. pipiens* apresentaram valores de  $0,41 \text{ mg L}^{-1}$  e  $47,00 \text{ mg L}^{-1}$ . Kiesecker et al. (2001) e Coady et al. (2005) reportaram que a  $CL_{50-72}$  para *L. sylvaticus* e *L. clamitans* apresentaram valores de  $20,00 \text{ mg L}^{-1}$  e  $201,0 \text{ mg L}^{-1}$ , já para *Danio rerio* a  $CL_{50-48}$  foi de  $36,8 \text{ mg L}^{-1}$  (Wiegand et al. 1998), para alevinos de pacu, *Piaractus mesopotamicus* Pertilini (2012) reportou uma  $CL_{50-96}$  de  $28,58 \text{ mg L}^{-1}$ .

Portanto, o fato de que alguns pesticidas não causarem efeitos tóxicos agudos aos animais não significa que eles não tragam prejuízos aos indivíduos ou ao ambiente em que vivem. Assim, além das determinações de concentrações letais e subletais dos produtos químicos, testes comportamentais têm se mostrado muito eficazes na busca de respostas a intervenções químicas no meio ambiente. Nos

testes de evitamento, por exemplo, os organismos reagem evitando um determinado ambiente antes mesmo que efeitos deletérios ocorram (Araújo et al. 2012). A avaliação da capacidade natatória proposta por Rutkoski et al. (2018) tem este mesmo objetivo. Neste trabalho observamos, já nas primeiras 24h, alterações na atividade natatória dos animais na concentração de 20.000  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Os girinos apresentavam movimento reduzido em relação ao controle e este comportamento pode interferir a médio prazo no escape de predadores e na captura do alimento. Wrubleski et al. (2018) observaram que girinos da espécie *Physalaemus cuvieri* que ficaram expostos a 0,24  $\text{mg L}^{-1}$ , 0,48  $\text{mg L}^{-1}$  e 2,4  $\text{mg L}^{-1}$  de ATZ por 192h, apresentaram velocidade reduzida a partir de 120h de exposição. Outros autores como Svartz et al. (2012), Pérez Iglesias (2015) e Sturza (2017) além de observarem modificações na atividade natatória observaram também alterações na morfologia oral dos girinos expostos a ATZ. Isso ratifica a hipótese de que a ATZ pode além de prejudicar a atividade natatória, prejudicar também o interesse e busca por alimento e capacidade de fuga, uma vez que os girinos não terão energia suficiente para escapar de predadores. Plhalova et al. (2012) observaram que peixes como *Danio rerio* expostos a 90  $\mu\text{g L}^{-1}$  de ATZ por 28 dias apresentaram desinteresse pela comida e alterações morfológicas no fígado.

Testes bioquímicos foram feitos para avaliar as possíveis alterações relacionadas à fisiologia energética dos girinos de *L. catesbeianus*. Nos anfíbios o fígado possui inúmeras funções ligadas ao metabolismo proteico e energético, síntese de ureia, secreção de sais biliares, biotransformação e desintoxicação, seus aspectos biológicos são bem parecidos com os de peixes vertebrados (Crawshaw and Weinkle 2000). Hipolito et al. (2004) afirmam ainda que este órgão é um dos órgãos mais afetados quando se tem um mau manejo alimentar, sanitário, zootécnico ou ainda quando os organismos estão expostos a condições adversas.

Os principais e mais comuns testes bioquímicos conduzidos são os relacionados aos marcadores de sangue, rins, lipídios, fígado e ossos. A glicose ou dextrose obtida a partir do sangue fresco ou plasmático é um biomarcador de sangue. Trata-se de um carboidrato (monossacarídeo) de elevada importância biológica e é usada pelas células como mediador metabólico e como fonte energética. A ureia resultante do metabolismo das proteínas e a creatinina produzida

pelos músculos são marcadores de rins. O colesterol, HDL e triglicérides são marcadores lipídicos e estão envolvidos com a formação de hormônios e armazenamento de energia (Kramer and Hoffmann 1997). O cálcio é o principal biomarcador de ossos e é um nutriente essencial para diversas funções biológicas, dentre elas o desenvolvimento ósseo (Pereira et al. 2008). Os principais marcadores de fígado são a TGP, que representa a atividade da enzima transaminase e indica se há um problema hepático, e a FAL que é uma enzima responsável por digerir as gorduras. A partir deste órgão podemos quantificar também as proteínas totais porque são enzimas e atuam junto a hormônios e neurotransmissores, os fenóis que são ácidos que em grandes quantidades afetam fígado, rins e sistema nervoso, e a peroxidase que é uma enzima que catalisa reações de oxidação e sua elevação indica que esta ocorrendo um aumento de radicais livres (Hipolito et al. 2007). Há também a polifenoloxidase que é uma enzima responsável pela oxidação de compostos fenólicos (Lima et al. 2001).

Neste trabalho houve uma correlação positiva entre as taxas de glicose e as concentrações crescentes de ATZ, a uréia teve um leve aumento e queda na mais alta concentração, a creatinina diminuiu conforme o aumento das concentrações, os marcadores de lipídeos caíram na mais alta concentração, o TGP aumentou e a FAL também diminuiu drasticamente na mais alta concentração. A quantidade de proteínas totais e a atividade da peroxidase e da polifenoloxidase aumentaram gradativamente conforme o aumento das concentrações e tiveram queda drástica na mais alta concentração. Estes resultados indicam desnutrição, anemia, possível perda de massa muscular e danos hepáticos. Para Hodgson (2004) a menor intensidade da atividade da polifenoloxidase indica também aumento na degradação de proteínas, podendo-se, conseqüentemente, observar o aumento na produção de fenóis. Freitas et al. (2014) trabalhando com a mesma espécie também observaram queda drástica da peroxidase e polifenoloxidase mensurada a partir do fígado de animais induzidos ao estresse por aumento da densidade, também atribuindo os resultados a falta de proteína na alimentação e desequilíbrio dos aminoácidos.

Essas evidências bioquímicas traduzem as observações visuais e comportamentais registradas ao longo da experimentação. Observamos que nos aquários das maiores concentrações de ATZ havia uma grande quantidade de

resíduos (alimento + fezes) indicando deficiências na ingestão do alimento e aumento da excreção. Vale lembrar que a redução da atividade natatória também contribuiu com este resultado. Dornelles and Oliveira (2014) observaram que girinos de rã-touro que ficaram expostos por 168h em concentrações de 5, 10, 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  de ATZ apresentaram valores baixos nos níveis de proteínas totais e colesterol e níveis altos de triglicérides e peroxidação lipídica contrariamente aos resultados obtidos no presente estudo. Entretanto, em estudos realizados em 2015 estes mesmos autores observaram que girinos de *L. catesbeianus* expostos a 2,5  $\mu\text{g L}^{-1}$  de ATZ por 168h, não apresentaram mortalidade e sim alterações bioquímicas no fígado, brânquias e músculo.

A exposição a pesticidas pode ocasionar diversas alterações a nível tecidual e molecular em indivíduos expostos a tais substâncias (Berti et al. 2009; Poleza et al. 2008), sendo as alterações em marcadores bioquímicos normalmente os primeiros sinais a serem detectados (Van Der Oost et al. 2003).

Poluentes como os herbicidas são ambientalmente estressores, que podem induzir uma resposta adaptativa nos animais devido a alterações no seu equilíbrio metabólico, produzindo assim uma resposta fisiológica na tentativa do animal estabelecer a homeostase (Sasikala et al. 2011). As respostas induzidas por este estresse podem ocorrer como resultado de alterações metabólicas e consequentemente aumento de energia em função do estressor (Weissman 1990). Tão grave quanto os efeitos agudos são os efeitos crônicos de longa duração, o que nos leva a inferir que sendo a ATZ tão amplamente utilizada e sua meia vida na água tão longa, mesmo que em pequenas quantidades seu uso deve ser monitorado.

O presente trabalho corrobora os resultados obtidos por outros autores (Dornelles and Oliveira, 2015; Wrubleski et al. 2018) que obtiveram efeitos deletérios em concentrações iguais ou menores que 40  $\mu\text{g L}^{-1}$  de atrazina, evidenciando a necessidade de mais estudos para certificar que as concentrações permitidas em lei são ambientalmente seguras e protetoras de toda biota aquática.

## **Agradecimentos**

Nós agradecemos a Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro, ao Dr. Clovis Ferreira do Carmo e ao Técnico de laboratório Luiz Evangelista pelo auxílio e no preparo das soluções, a Dra. Maria Letizia Petesse, pelo auxílio nas análises estatísticas, a Dra. Daniele de Carla Dias pela coleta das amostras de sangue e ao Dr. Eros Oocchiena por ter cedido às primeiras amostras de atrazina.

## **Conflito de interesse e conflitos éticos**

Este estudo foi desenvolvido sob condições éticas e de acordo com as diretrizes nacionais, internacionais e institucionais sobre o uso de animais na pesquisa. Foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES - Brasil (concessão número 33132011001P9). Informamos que é um trabalho original e todos os autores aprovam esta submissão e contribuem integralmente para o desenvolvimento do estudo e construção deste manuscrito. Todos os autores declaram não haver conflito de interesse neste manuscrito.

## **Referências**

- Abdalla FC, Martins LPA, Zacarin-Silva ECM, Rizzi GM, Costa MJ, Salla RF, Kalinin AL, Monteiro DA (2013) The impact of cadmium chloride on the gonadal morphology of the North American bullfrog tadpoles, *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802). *Fresenius Environmental Bulletin*, 22: 1962-1966.
- Ackerman K, Conard M, Culligan P, Plunz R, Sutto MP, Whittinghill L (2014) Sustainable Food Systems for Future Cities: The Potential of Urban Agriculture. *ESR*, 45: 189-206.
- Aichinger M (1987) Annual activity patterns of anurans in a seasonal neotropical environment. *Oecologia* 71: 583-592.
- Allran JW, Karasov WH (2001) Effects of atrazine on embryos, larvae, and adults of anuran amphibians *Environ Toxicol Chem* 20: 769- 775.
- ANVISA (2013) Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em : <http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home>. Acesso em: Agosto de 2018

- APHA (2005) American public health association. Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, Washington, DC. Disponível em: <https://www.apha.org>. Acesso em: Agosto 2018
- Araújo CVM, Blasco J, Moreno-Garrido I (2012) Measuring the avoidance behavior shown by the snail *Hydrobia ulvae* exposed to sediment with a known contamination gradient. *Ecotoxicology*, 21: 750-758. [https://doi: 10.1007/s10646-011-0835-6](https://doi.org/10.1007/s10646-011-0835-6)
- Arias ARL, Buss DF, Albuquerque C, Inácio AF, Freire MM, Egler M, Mugnai R, Baptista DF (2007) Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos *Ciênc. saúde coletiva* 12: 61-72. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-81232007000100011>
- Arias-Estévez M, López-Periago E, Martínez-Carballo E, Simal-Gándara J, Juan-Carlos M, García-Riό L (2008) The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Agri Eco Environ* 123: 247-260. <https://doi:10.1016/j.agee.2007.07.011>
- ASTM (2014) American society for testing and materials. Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. West Conshohocken. Disponível em: [https://compass.astm.org/EDIT/html\\_annot.cgi?E1192+97\(2014\)](https://compass.astm.org/EDIT/html_annot.cgi?E1192+97(2014)). Acesso em: Agosto de 2018
- Berti AP, Düsman E, Soares LC, Grassi LEA (2009) Efeitos da contaminação do ambiente aquático por óleos e agrotóxicos. *Rev. Saúde Biol.* 4:45–51.
- Birge WJ, Black JA, Westerman AG, Ramey BA (1983) Fish and Amphibian Embryos A Model System for Evaluating Teratogenicity. *Fundam. Appl. Toxicol* 3: 237-242. [https://doi.org/10.1016/S0272-0590\(83\)80134-1](https://doi.org/10.1016/S0272-0590(83)80134-1)
- Blaustein AR, Johnson PT (2003) The complexity of deformed amphibians. *Front Ecol Environ Journal* 1: 87-94. [https://doi.org/10.1890/1540-9295\(2003\)001\[0087:TCODA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1540-9295(2003)001[0087:TCODA]2.0.CO;2)
- Blaustein AR, Kiesecker JM (2002) Complexity and conservation: lessons for the global decline of amphibian populations. *Ecology letters* 5:597-608. [https:// DOI: 10.1046/j.1461-0248.2002.00352.x](https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2002.00352.x)

- Blaustein AR, Romansic JM, Kiesecker JM, Hatch AC (2003) Ultraviolet radiation, toxic chemicals and amphibian population declines. *Diversity and Distributions*, 9 123-140. [https://DOI: 10.1046/j.1472-4642.2003.00015.x](https://doi.org/10.1046/j.1472-4642.2003.00015.x)
- Boone MD, Cowman D, Davidson C, Hayes T, Hopkins W, Relyea R, Schiesari L, Semlitsch R (2007) Evaluating the role of environmental contamination in amphibian population declines. In: Gascon C, Collins JP, Moore RD, Church DR, Eckay JE, Mendelson JR (2007) *Amphibian conservation action plan*. Switzerland: IUCN Species survival Commission, 32-35
- Bortoluzzi EC, Rheinheimer DS, Gonçalves CS, Pellegrini JBR, Maroneze AM, Kurz MHS, Bacar NM, Zanella R (2007) Investigation of the occurrence of pesticide residues in rural wells and surface water following application to tobacco. *Quím.nova* 30: 1872- 1876. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000800014>
- BRASIL, 2011. Portaria n.º 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Brasília. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914\\_12\\_12\\_2011.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html). Acesso em: Agosto de 2018.
- Christoffolet, PJ, Overejo, RFL, Carvalho, JC (2004) Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas. Associação Brasileira de Ação a Resistência de Plantas aos Herbicidas, 2ª ed.
- Coady KK, Murphy MB, Villeneuve DL, Hecker M, Jones PD, Carr JÁ, Solomon KR, Smith EE, Van Der KRAAK G, Kendall RJ, Giesy JP (2005) Effects of atrazine on metamorphosis, growth, laryngeal and gonadal development, aromatase activity, and sex steroid concentrations in *Xenopus laevis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62: 160-173
- Coelho ERC (2002) Influência da pré-oxidação com ozônio e peróxido de hidrogênio na remoção de atrazina em filtros lentos de areia e carvão ativado granular para tratamento de águas de abastecimento. Dissertação, Universidade de São Paulo
- CONAMA (2005) Conselho Nacional de Meio Ambiente, nº357, de 17 de Março de 2005. Disponível em:



- <http://www2.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>. Acesso em: Agosto de 2018.
- Coutinho CFB, Tanimoto ST, Galli A, Garbellini GS, Takayam M, Amaral RB, Mazo LH, Avaca L, Machado SAS (2005) Pesticidas: mecanismo de ação, degradação e toxidez. *Pesticidas*, 15: 65-72. <https://doi:dx.doi.org/10.5380/pes.v15i0.4469>
- Crawshaw GJ, Weinkle TK (2000) Clinical and pathological aspects of the amphibian liver. *B Vet Med*, 9: 165-173. <https://doi.org/10.1053/ax.2000.7133>
- Dal- Medico SE, Rissoli RZ, Gamero FU, Victório JÁ, Salla RF, Abdalla FC, Silva-Zacarin ECM, Carvalho CS, Costa MJ (2014) Negative Impact of a Cadmium Concentration Considered Environmentally Safe in Brazil (1 ppb) On The Cardiac Performace of Bullfrog tadpoles. *Ecotoxicology and Environmental Safety*1:168-174. <https://doi:10.1016/j.ecoenv.2014.03.003>
- Davidson C, Shafer HB, Jennings MR (2002). Spatial tests of the pesticide drift, habitat destruction, UV-B, and climate-change hypotheses for California amphibian declines. *Conserv Biol* 16:158-160. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2002.01030.x>
- Dewey SL (1986) Effects of the herbicides atrazine on aquactic insect community structure and emergence. *Ecology* 67:148-62. <https://www.jstor.org/stable/1938513>
- Dornelles MF, Oliveira GT (2014) Effect of atrazine, glyphosate and quinclorac on biochemical parameters, lipid peroxidation and survival in bullfrog tadpoles (*Lithobates castebeianus*) *Arch Environ Contam Toxicol*. 66:415-29. <https://doi:10.1007/s00244-013-9967-4>
- Dornelles MF, Oliveira GT (2015) Toxicity of atrazine, glyphosate, and quinclorac in bullfrog tadpoles exposed to concentrations below legal limits. *Environ Sci Pollut R Journal* 23:1610–1620. <https://doi:10.1007/s11356-015-5388-4>
- EMBRAPA (2006) Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Principais herbicidas indicados para cultura de milho no sistema plantio direto e no preparo convencional do solo. Passo Fundo, RS. Disponível em: [http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p\\_do61\\_13.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do61_13.htm);. Acesso em: Agosto de 2018

- EPA (2017) United States Environmental Protection Agency. Ambient aquatic life water quality criteria for atrazine - Revised draft, U.S. Environmental Protection Agency, Washington D.C.. Disponível em: <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/100047EJ.PDF?Dockey=100047EJ.PDF>. Acesso em: Agosto de 2018
- EUROPEAN COMMISSION (1998) Council of the European Union. European Union legislation: Council Directive on the quality of water intended for human consumption. Disponível em: [http://ec.europa.eu/environment/water/water-drink/legislation\\_en.html](http://ec.europa.eu/environment/water/water-drink/legislation_en.html). Acesso em: Agosto de 2018
- Ferreira CM, Lombardi JV, Machado-neto G, Bueno-Guimaraes, HM, Soares SRC, Saldiva PHN (2004) Effects of Copper Oxochloride in *Rana catesbeiana* Tadpoles: Toxicological and Bioaccumulative Aspects. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 73:465–470. <http://dx.doi.org/10.1007/s00128-004-0452-7>
- Ferreira CM, Pimenta AGG, Paiva Neto JS (2002) Introdução à ranicultura. Bol. Inst. Pesca 33: 15p
- França FM, Brazil de Paiva TC, Marcantonio AS, Teixeira C, Ferreira CM (2015) Acute toxicity and ecotoxicological risk assessment of rice pesticides to *Lithobates catesbeianus* tadpoles. J Environ Sci Health B 50:406-410. [https://doi:10.1080/03601234.2015.1011950](https://doi.org/10.1080/03601234.2015.1011950)
- Freitas JJG, Bach EE, Bordon ICAC, Martins ANCRPF, Hipolito M, Ferreira CM (2014) Resposta hepática à suplementação alimentar em rãs-touro sob condição de estresse. Bol. Inst. Pesca 40: 261 – 269
- Ghosh PK, Philip L (2006) Environmental significance of atrazine in aqueous systems and its removal by biological processes: an overview. Global Nest Journal 8:159-178
- Gosner KL. (1960) A simplified table for standing anuran embryos and larvae with notes on identification. Herpetologica 16:183-190
- Graymore M, Stagnitti F, Allison G (2001) Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. Environ Int 26:483-495. [http://doi.org/10.1016/S0160-4120\(01\)00031-9](http://doi.org/10.1016/S0160-4120(01)00031-9)
- Grisolia CK (2005) Agrotóxicos: mutações, câncer e reprodução. UNB, Brasília
- Hayes TB, Collins A, Lee M, Mendoza M, Noriega N, Stuart AA, Vonk A (2002) A Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at

- low ecologically relevant doses. P.N.A.S 99:5476-80. <http://DOI:10.1073/pnas.082121499>
- Hayes TB, Khoury V, Narayan A, Nazir M, Park A, Brown T, Adame L, Chan E, Buchholz E, Stueve T, Gallipeau S (2009) Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). P.N.A.S 107:4612-4617. <http://doi:10.1073/pnas.0909519107>
- Hayes TB, Haston K, Tsui M, Hoang A, Haeffele C, Vonk A (2002) Feminization of male frogs in the wild. Nature. 419: 895-896. [http:// DOI:10.1038/419895a](http://DOI:10.1038/419895a)
- Hipolito M, Martins AMCRPF, Bach EE (2004) Aspectos bioquímicos em fígados de rãs-touro (*Rana catesbeiana* SHAW, 1802) sadias e doentes. Arquivos do Inst. Bio 71: 147-153
- Hipolito M, Ribeiro Filho OP, Bach EE (2007) Aspecto bioquímico em fígados de *Rana catesbeiana* (SHAW, 1802) submetida a diferentes dietas. ConScientiae Saúde, 6: 49-56
- Hodgson E (2004) A textbook of modern toxicology. 4th ed, John Wiley & Sons, Inc., US
- Howe GE, Gillis R, Mowbray RC (1998) Effect of chemical synergy and larval stage on the toxicity of atrazina and alachlor to amphibian larvae. Environ Toxicol Chem 17: 519-525
- IBAMA (2010) Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Produtos Agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil uma abordagem ambiental. Disponível em: <http://www.ebah.com.br/content/ABAAABjtEAl/produtos-agrotoxicos-comercializados-brasil-2009>. Acesso em: Agosto de 2018.
- Jardim ANO, Caldas ED (2012) Brazilian monitoring programs for pesticide residues in food e Results from 2001 to 2010. Food Control 25: 607. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.11.001>
- Johansson M, Piha H, Kylin H, Merila J (2006) Toxicity of six pesticides to common frog (*Rana temporaria*) tadpoles. Environ Toxicol Chem 25(12):3164–3169. <https://doi.org/10.1897/05-685R1.1>

- Kiesecker JM, Blaustein AR, Belden LK (2001) Complex causes of amphibian population declines. *Nature* 410:681–684.
- Konstantinou IK, Hela DG, Albanis TA (2005) The status of pesticide pollution in surface waters (rivers and lakes) of Greece. Review on occurrence and levels *Environ Pollu* 141:555-570. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.07.024>
- Kramer JW, Hoffmann WE (1997) Clinical enzymology. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. (ed) *Clinical biochemistry domestic animals*, pp 303-325. <https://doi.org/10.1016/B978-012396305-5/50013-0>
- Langlois VS, Carew AC, Pauli BD, Wade MG, Cooke AGM, Trudeau VL (2009) Low levels of the herbicide atrazine alters sex ratios and reduces metamorphic success in *Rana pipiens* tadpoles raised in outdoor mesocosms. *Environ Health Perspect* 118:552-557. DOI: 10.1289/ehp.0901418
- Lima EDPA, Pastore GM, Barbery SDF, Garcia NHP, Brito ES, Lima CAA (2001) Obtenção e utilização da enzima polifenoloxidase extraída de polpa de pinha (*Annona squamosa* L.) madura no melhoramento do sabor do cacau (*Theobroma cacao* L.) *Rev Bras Frutic* 23:709-713. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452001000300053>
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randal RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-274
- MDA – Ministério do Desenvolvimento Agrário (2012) O Brasil é o maior consumidor e produtor de agrotóxicos do mundo desde 2009. Disponível em: [http://www.mda.gov.br/portal\\_noticias/18.02.2012](http://www.mda.gov.br/portal_noticias/18.02.2012). Acesso em: Agosto de 2018
- Mezzari IA (2002) Utilização de carvões adsorventes para o tratamento de efluentes contendo pesticidas. Dissertação, Universidade Federal de Santa Catarina
- Moerschbacher BM, Heck B, Kogel KH, Obst O, Reisner HJ (1986) An elicitor of the hypersensitive lignification response in wheat leaves isolated from the rust fungus *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Biosciences* 41:32-37. <https://doi.org/10.1515/znc-1986-9-1006>
- Paulino MG (2011) Efeito da exposição à atrazina nas brânquias de curimatá, *Prochilodus lineatus* (Teleosteo, Prochilodontidae). Dissertação de Mestrado da Universidade de São Carlos

- Pereira GAP, Genaro OS, Pinheiro MM, Szejnfeld VL, Martini LA (2008) Cálcio dietético- estratégias para otimizar o consumo. Rev Bras Reumatol 49:164-80. <http://dx.doi.org/10.1590/S0482-50042009000200008>
- Pérez Iglesias JM (2015) Biomarcadores de exposição e efeito para avaliação dos efeitos da atrazina a distintos níveis em girinos de anuros neotropicais. Dissertação de Mestrado da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho
- Peterlini MF (2012) Avaliação morfológica em brânquias e tegumento como biomarcadores da intoxicação aguda induzida por atrazina em alevinos de pacu, *Piaractus mesopotamicus*. Dissertação, Universidade Estadual de Campinas
- Plhalovam L, Blahova I, Mikulikovan I, Stepanovan S, Dolezelovan P, Praskovan E, Marsalek P, Skoric M, Pistekovan V, Bedanovan I, Svobodovan Z (2012) Effects of subchronic exposure to atrazine on zebrafish (*Danio rerio*). Pol J Vet Sci 15:417-423. <http://doi.10.2478/v10181-012-0065-8>
- Poleza F, Souza RC, Stramosk CA, Rorig LR, Resgalla CJR (2008) Avaliação da toxicidade aguda para o organismo-teste *Vibrio fischeri* dos principais herbicidas e inseticidas aplicados na lavoura de arroz irrigado dos estados de Santa Catarina e Rio Grande Do Sul. Pesticidas. Rev. Ecotoxicol. Meio Ambiente. 18:107–114.
- Rissoli RZ, Abdalla FC, Costa MJ, Rantin FT, McKenzie DJ, Kalinin AN (2016) Effects of glyphosate and the glyphosate based herbicides Roundup Original and Roundup Transorb on respiratory morphophysiology of bullfrog tadpoles. Chemosphere 1:37-44. <https://doi.10.1016/j.chemosphere.2016.04.083>
- Rutkoski CF, Macagnan N, Kolcenti C, Vanzetto GV, Sturza PF, Hartmann PA, Hartmann MT (2018) Lethal and Sublethal Effects of the Herbicide Atrazine in the Early Stages of Development of *Physalaemus gracilis* (Anura:Leptodactylidae) Ecotoxicol Environ Contam 74:1.202. <https://doi.org/10.1007/s00244-017-0501-y>
- Salaberria I, Hansen BH, Asensio V, Olsvik PA, Andersen RA, Jenssen BM (2009) Effects of atrazine on hepatic metabolism and endocrine homeostasis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Toxicology and Applied Pharmacology 234:98–106
- Salla RF, Gameroa FU, Rissoli RZ, Dal-Medico SE, Castanho LM, Carvalho CS, Silva-Zacarin ECM, Kalinind AL, Abdallac FC, Costa MJ (2016) Impact of an

- environmental relevant concentration of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol on the cardiac function of bullfrog tadpoles. *Chemosphere*, 1:1862-1868. [https:// doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.10.042](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.10.042)
- Sasikala G, Palanisamy P, Mallikaraj D, Bhuvaneswari N, Natarajan GM (2011) Biochemical modulations induced by metasystox in fresh water snakeheaded fish *Channa striata* blood. *IJPBA* 2:772–774
- Schloegel LM, Ferreira CM, James T, Hipolito M, Longcore J, Hyatt A, Yabsley M, Martins AMCR, Mazzoni R, Davies AJ, Daszak P (2010) The North American Bullfrog (*Rana catesbeiana*) as a reservoir for the spread of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Brazil. *Anim Conserv* 13:53-61. [https://doi:10.1111/j.1469-1795.2009.00307.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-1795.2009.00307.x)
- Silva JF, Ferreira LR, Ferreira FA (2007) Herbicidas: absorção, translocação, metabolismo, formulação e misturas. In: Silva AA, Silva JF (ed). *Tópicos em manejo de plantas daninhas*. Viçosa, Editora UFV. pp149-188
- Singh S, Kumar V, Chauhan A, Datta S, Wani AB, Singh N, Singh J (2017) Toxicity, degradation and analysis of the herbicide atrazine 16:211–237. *Environ Chem Lett*. <https://doi.org/10.1007/s10311-017-0665-8>
- Southerton SG, Deverall BJ (1990) Changes in phenylalanine ammonia-lyase and peroxidase activities in wheat cultivars expressing resistance to the leaf-rust fungus. *Plant Pathol* 39:223-230. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1990.tb02496.x>
- Spadotto CA, Gomes MAF, Luchini LC, Andrea MM (2004) Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente.
- Srivastava SK (1987) Peroxidase and poly-phenol oxidase in *Brassica juncea* plants infected with *Macrophomina phaseolina* (Tassai) Goid, and their implication in disease resistance. *Journal Pathol* 120(3):249-254. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1987.tb04439.x>
- Steinberg CEW, Lorenz R, Spieser OH (1995) Effects of atrazine on swimming behaviour ofzebrafish, *Brachydanio rerio*. *Water RES* 29:981-5
- Sturza PA (2017) Toxicidade aguda e crônica em girinos de *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae) expostos à atrazina e tebuconazole. Dissertação, Universidade Federal da Fronteira Sul

- Suzawa M, Ingraham H (2008) The herbicide atrazine activates endocrine gene networks via non-steroidal NR5A nuclear receptors in fish and mammalian cells. 3:2127. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002117>
- Svartz G, Herkovits J, Pérez Coll CS (2012) Sublethal effects of atrazine on embryonal larval development of *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae). *Ecotoxicology* 21:1251-1259. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-0880-9>.
- Swain R, Hillis WE (1959) The phenolic constituents of *Prunus domestica*. The quantitative analysis of phenolic constituents. *J Sci Food Agric* 10:63-68 <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740100110>
- Tibi L, Patrick AN, Leslie P, Toft AD, Smith AF (1989) Alkaline phosphatase isoenzymes in plasma in hyperthyroidism. *Clin Chem* 35: 427-430
- Tomita RY, Beyruth Z (2015) Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. *O Biológico* 64(2): 135-142
- Traghetta DG, Vaz CMP, Machado SAS, Crestana S, Vieira EM, Martin-Neto L (1996) Mecanismos de sorção da atrazina em solos: estudos espectroscópicos e polarográficos. *EMBRAPA* 14:1-7
- Ueta J, Pereira NL, Shuhama IK, Cerdeira AL (2001) Biodegradação de herbicidas e bioremediação: microorganismos degradadores de atrazine provenientes de solos da região do Aquífero Guarani. *Revista Plantio Direto*. [http://plantiodireto.com.br/?body=cont\\_int&id=81](http://plantiodireto.com.br/?body=cont_int&id=81)
- U.S.EPA (2005) Drinking Water Contaminant Candidate List 2. <http://water.epa.gov/drink/contaminants/index.cfm#List>. Acesso em: Agosto de 2018
- Van Der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13: 57–149.
- Weissman C (1990) The metabolic response to stress: an overview and update. *Anesthesiology* 73:308-327
- Wiegand C, Plügmacher S, Giese M, Frank H, Steinberg C (1998) Uptake, Toxicity and effects on detoxication enzymes of atrazine and trifluoroacetate in embryos of zebrafish. *Ecotox Environ Safe* 45:122-131. <https://doi.org/10.1006/eesa.1999.1845>

- Wrubleski J, Reichert FW, Galon L, Hartmann PP, Hartmann MT (2018) Acute and chronic toxicity of pesticides on tadpoles of *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leptodactylidae). *Ecotoxicology*. 27(3):360-368. [https://doi: 10.1007/s10646-018-1900-1](https://doi.org/10.1007/s10646-018-1900-1)
- Younos TM, Weigman DL (1988) Pesticides: a continuing dilemma. *J Water Pollut Control Fed* 35:1199-1205
- Zagatto PA, Bertoletti E (2008) *Ecotoxicologia Aquática Princípios e aplicações*. São Carlo RiMa
- Zanini, J. 2010 Estudo da remoção do herbicida atrazina por biofiltração em filtros lentos de areia e carvão ativado associada à ação microbiana.
- Zar JH (1999) *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, New Jersey



# **ANEXOS**

## Anexo 1

### Figuras ilustrativas



Figura 1. Punção do sangue do vaso caudal de girinos de *L. catesbeianus*

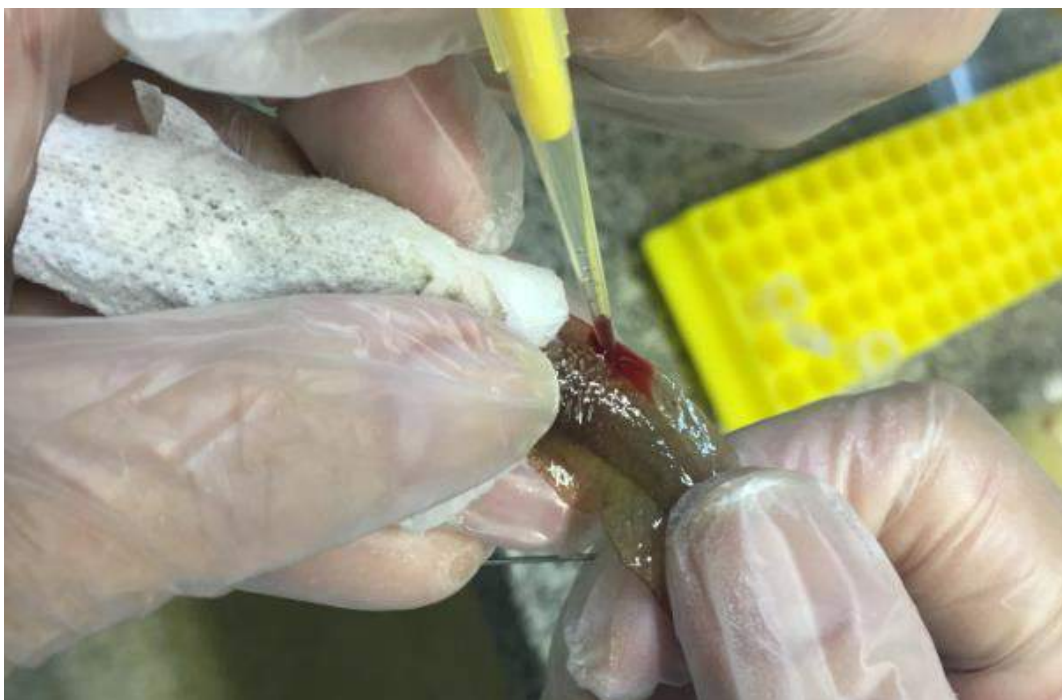


Figura 2. Coleta do sangue de girinos de *L. catesbeianus* através de uma micropipeta



Figura 3- Girino de *L. catesbeianus* exposto a  $20.000\mu\text{g L}^{-1}$  de atrazina, apresentando sinais de inchaço abdominal



Figura 4- Aquário do controle, sem acúmulo de fezes e ração no fundo do aquário



Figura 5- Aquário do T20.000 $\mu\text{gL}^{-1}$  de atrazina com acúmulo de fezes e ração no fundo do aquário