

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 DA SENSIBILIDADE DE GIRINOS DE RÃ-TOURO (*Lithobates catesbeianus*) AO HERBICIDA ATRAZINA, ATRAVÉS DE TESTES DE EVITAMENTO E ESTRESSE OXIDATIVO

Mikel Eduardo de Mello

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Maris Ferreira Mostério

Coorientadora: Dra. Adriana Sacioto Marcantonio

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

SÃO PAULO - SP

2022

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 DA SENSIBILIDADE DE GIRINOS DE RÃ-TOURO (*Lithobates catesbeianus*) AO HERBICIDA ATRAZINA, ATRAVÉS DE TESTES DE EVITAMENTO E ESTRESSE OXIDATIVO

Mikel Eduardo de Mello

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Maris Ferreira Mostério

Coorientadora: Dra. Adriana Sacioto Marcantonio

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

SÃO PAULO - SP

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

M476a Mello, Mikel Eduardo de
Avaliação da sensibilidade de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) ao herbicida Atrazina, através de testes de evitamento e estresse oxidativo/ Mikel Eduardo de Mello – São Paulo, 2022
vii; 49f.; fig.; 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. Coorientadora: Adriana Sacioto Marcantonio

1. Etologia de anfíbios. 2. Proteínas hepáticas 3. Aminoácidos 4. Herbicidas 5. Ecotoxicologia.

I. Mostério, Claudia Maris. II. Título.

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 da sensibilidade de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) ao herbicida atrazina, através de testes de evitamento e estresse oxidativo

AUTOR: MIKEL EDUARDO DE MELLO

ORIENTADORA: Prof^ª. Dra. Cláudia Maris Ferreira Mostério

COORIENTADOR: Prof^ª. Dra. Adriana Sacioto Marcantônio

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

Claudia M. F. Mostério

Prof^ª. Dra. Cláudia Maris Ferreira Mostério

Marília Hartmann

Prof^ª. Dra. Marília Hartmann

Guendalina Oliveira

Prof^ª. Dra. Guendalina Turcato Oliveira

Data da realização: 09 de maio de 2022

Claudia M. F. Mostério

Presidente da Comissão Examinadora
Prof^ª. Dra. Cláudia Maris Ferreira Mostério

Aos meus pais Lúcia e Osvaldo

AGRADECIMENTOS

Agradecer é uma arte difícil, pois arriscamos ser ingrato com aqueles que tanto colaboraram com a nossa jornada. Sendo que neste caminho encontramos pessoas maravilhosas para auxiliarem em nosso crescimento.

Primeiro gostaria de agradecer aos meus pais pela oportunidade a vida e em sua condução sobre a minha educação. Aos meus irmãos pelo companheirismo e auxílio principalmente ao Kesley de Mello que topa comigo qualquer parada. A minha cunhada Andressa Carneiro de Lima por apoiar as minhas experiências de forma tão dedicada.

Ao Peterson e Thomas Hohmman por compreender minhas ausências em processos importantes de nossas vidas.

A Beatriz Araújo Secall e Luiza Minami Vieira por auxiliarem nos experimentos.

Aos pesquisadores e alunos do Instituto de Pesca, sobrevivemos a uma pandemia com cortes financeiros nas pesquisas e educação mantendo a qualidade em nossos trabalhos de forma brilhante e dedicada, e quem disse que milagres não são possíveis.

A Adriana Sacioto Marcantonia, por me coorientar nesta jornada tão importante em minha vida.

As pesquisadoras Erna Bach, Eliane Vieira, Fernanda Menezes França pelo auxílio, dedicação, ensinamentos e permitir este trabalho ser possível.

Em especial a minha orientadora Claudia Maris Ferreira Mostério, por me aceitar em seu grupo de pesquisa, me conduzir brilhantemente nesta área de conhecimento nova para mim e por participar com seu companheirismo, paciência e dedicação em minha formação acadêmica, é uma professora como você que seguirei como exemplo pela eternidade.

SUMÁRIO

Agradecimentos.....	i
Resumo geral.....	iv
Abstract.....	v
1. Introdução geral.....	1
1.1 Herbicidas e seus problemas.....	1
1.2 O herbicida atrazina.....	2
1.3 Testes de ecotoxicidade.....	3
1.4 Teste de evitamento.....	4
1.5 Teste bioquímico oxidativo.....	5
1.6 Anfíbios.....	6
2. Referências bibliográficas.....	8

CAPÍTULO I:

Alterações bioquímicas em anfíbios como resultado do evitamento a locais contaminados com atrazina

Resumo.....	15
1. Introdução.....	16
2. Material e métodos.....	19
2.1 Organismos aquáticos utilizados.....	19
2.2 Teste de evitamento.....	19
2.3 A Atrazina.....	21
2.4 Análise de aminoácidos do plasma sanguíneo.....	21
2.5 Análise dos compostos bioquímicos do fígado.....	22
2.6 Análise dos resultados.....	23
3. Resultados.....	24
4. Discussão.....	28
5. Conclusão.....	31

7.Referências.....	32
Anexos.....	39

Resumo geral

Avaliação da sensibilidade de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) ao herbicida atrazina, através de testes de evitamento e estresse oxidativo

Agrotóxicos são produtos químicos utilizados para controlar uma infinidade de organismos que afetam a produção agrícola, sendo divididos em inseticidas, fungicidas, herbicidas, acaricidas e nematicidas, passando por um rígido controle para sua liberação, avaliando principalmente os seus efeitos nos seres vivos e no ambiente. Nas últimas décadas, no Brasil foi introduzido uma série de herbicidas para prevenir danos às lavouras, sendo um deles a Atrazina (ATZ) que atua principalmente no processo de fotossíntese inibindo a produção de moléculas orgânicas pelo organismo alvo. No entanto, a introdução de um produto químico ou a utilização de forma indiscriminada dos herbicidas tem resultado em problemas metabólicos e comportamentais, pois essas substâncias químicas se acumulam no ambiente, resultando em graves impactos no solo, ar e água, afetando diretamente os organismos, principalmente os aquáticos que sofrem com essa contaminação. Os testes de evasão ou fuga, originalmente concebidos para testar compostos químicos em terra, foram adaptados para aplicação em ecossistemas aquáticos e seus organismos. Isso facilitou a coleta de dados sobre as concentrações predominantes presentes no ambiente proporcionados por derramamentos e contaminação de defensivos agrícolas. O objetivo central deste trabalho foi avaliar as características comportamentais de evasão, bem como os possíveis efeitos tóxicos da ATZ (ATANOR 50 SC®), utilizando girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) como ferramenta experimental. O teste de evitamento teve duração de 12 horas e após esse período o sistema foi fechado, mantendo os organismos por mais 36 horas nas concentrações de exposição, totalizando 48 horas para avaliação de alterações bioquímicas através da avaliação do perfil de aminoácidos no plasma sanguíneo e a degradação de proteínas do fígado. Como resultado observou-se que no teste de evitamento os girinos nas primeiras 3 a 4 horas de exposição evitaram as concentrações mais altas. Os testes bioquímicos indicaram degradação proteica e produção de peroxidase no fígado, além de alterações nos níveis de aminoácidos (arginina, isoleucina, alanina e fenilalanina) no plasma sanguíneo. Com esses resultados, podemos entender melhor os mecanismos comportamentais e estressores bioquímicos dos girinos expostos ao herbicida ATZ, mostrando que seus órgãos são sensíveis para reconhecer áreas de contaminação.

Palavras-chave: Etologia de anfíbios; proteínas hepáticas, Aminoácidos, herbicidas, ecotoxicologia.

Abstract

Evaluation of the sensitivity of bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*) to the herbicide atrazine, through avoidance and oxidative stress tests

Pesticides are chemical products used to control a multitude of organisms that affect agricultural production, being divided into insecticides, fungicides, herbicides, acaricides and nematocides, undergoing strict control for their release, mainly evaluating their effects on living beings and the environment. In the last decades, a series of herbicides was introduced in Brazil to prevent damage to crops, one of them being Atrazine (ATZ), which acts mainly in the photosynthesis process, inhibiting the production of organic molecules by the target organism. However, the introduction of a chemical or the indiscriminate use of herbicides has resulted in metabolic and behavioral problems, as these chemicals accumulate in the environment, resulting in serious impacts on soil, air and water, directly affecting organisms, mainly the aquatic ones that suffer from this contamination. Evasion or escape tests, originally designed to test chemical compounds on land, have been adapted for application to aquatic ecosystems and their organisms. This facilitated the collection of data on the predominant concentrations present in the environment provided by spills and contamination of pesticides. The main objective of this work was to evaluate the behavioral characteristics of avoidance, as well as the possible toxic effects of ATZ (ATANOR 50 SC®), using bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*) as an experimental tool. The avoidance test lasted 12 hours and after this period the system was closed, keeping the organisms for another 36 hours at the exposure concentrations, totaling 48 hours for the evaluation of biochemical changes through the evaluation of the amino acid profile in the blood plasma and the degradation of liver proteins. As a result, it was observed that in the avoidance test, the tadpoles in the first 3 to 4 hours of exposure avoided the highest concentrations. Biochemical tests indicated protein degradation and peroxidase production in the liver, in addition to changes in the levels of amino acids (arginine, isoleucine, alanine and phenylalanine) in the blood plasma. With these results, we can better understand the behavioral mechanisms and biochemical stressors of tadpoles exposed to the herbicide ATZ, showing that their organs are sensitive to recognize areas of contamination.

Keywords: Amphibian ethology; liver proteins, Amino acids, herbicides, ecotoxicology.

1. Introdução geral

1.1 Herbicidas e seus problemas

O uso de agrotóxicos aumentou devido à necessidade de eliminar as pragas das plantas, uma vez que prejudica a produção de alimentos e afeta sua comercialização (Gaboardi et al. 2019). Segundo o IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, 2017) o consumo de agrotóxicos no Brasil tem se destacado por o aumento, sendo em 2017 atingindo a marca de 540 mil toneladas comercializadas, tornando-se líder mundial no uso dessas entradas. Aliado à realidade de que a cada ano, novos ativos agrotóxicos são liberados para comercialização, ou seja, novos riscos ambientais e saúde pública (Lopes e Nascimento, 2020), em contraste com os processos estabelecidos em outros países para reduzir esta liberação. Uma variedade de espécies de anfíbios são restritas para ambientes aquáticos onde podem ser diretamente expostos a xenobióticos, incluindo os agrotóxicos, que chegam a esses ambientes por lixiviação de áreas agrícolas (Pavan et al., 2021, Reichert et al., 2022). A necessidade do setor por alta produtividade agrícola, principalmente para atender à crescente demanda de alimentos e altas taxas de exportação, influenciou um aumento significativo no uso de agrotóxicos (Veiga et al., 2006).

Dentre os poluentes da água produzidos pelas atividades humanas, os agrotóxicos (herbicidas) são os mais perigosos, justamente por serem projetados para destruir determinada forma de vida, podendo atingir espécies não-alvo de forma fatal. No ambiente aquático, os agrotóxicos afetam múltiplos níveis, incluindo moléculas, tecidos, órgãos, indivíduos, populações e comunidades (Grisolia, 2005).

Em 2020 os ingredientes ativos de agrotóxicos comercializados no Brasil somaram 685.745,678 toneladas, com um incremento de 10,5% com referência ao ano de 2019, sendo o maior consumidor de herbicidas do mundo. Os dez ingredientes ativos mais vendidos no Brasil são: Glifosato e seus sais, 2,4-D, Mancozeb, Atrazina, Acefato, Clorotalonil, Malationa, Enxofre, Imidacloprido, Clorpirifós (Brasil, 2022).

Esse aumento na utilização de herbicidas foi acompanhado pelo surgimento de novas moléculas e por alterações químicas destes produtos, capazes de propiciar funcionalidades diferenciadas e comportamentais em ambientes distintos, resultando em grandes alterações nos perfis toxicológicos e ecotoxicológicos. Atualmente, compreendem uma variedade de moléculas com distintas propriedades, que lhes conferem diferentes graus de persistência ambiental, mobilidade e potencial tóxico, carcinogênico, mutagênico e teratogênico a diversos organismos não alvos, inclusive ao ser humano (Armas e Monteiro, 2005).

O uso de herbicidas na agricultura pode resultar na contaminação de águas superficiais adjacentes, já que a intercomunicabilidade dos sistemas hídricos possibilita que qualquer substância em um determinado corpo d'água resulte em uma contaminação distante das áreas em que foram originalmente aplicados (Veiga et al., 2006). Por exemplo, durante a aplicação do produto, somente uma parte deste atinge o seu alvo, enquanto outra parte pode atingir outros organismos, como insetos, microrganismos do solo e outros organismos aquáticos, podendo causar efeitos adversos, como redução do número de espécies, alteração na reprodução, comportamento, dentre outros (Dores e de-Lamonica-Freire, 1999). Sendo que na maioria das aplicações, menos de 0,1% da quantidade de agrotóxicos aplicados alcançam o alvo, enquanto o restante 99,9% tem potencial para mover-se a outros compartimentos ambientais como as águas superficiais e subterrâneas (Sabik et al., 2000).

Comumente contaminantes que ocorrem em ambientes aquáticos mostram-se imperceptíveis às análises químicas tradicionais (Lebboroni et al. 2006). Portanto, como forma de avaliar e evidenciar a presença de poluentes, analisa-se os efeitos causados em organismos aquáticos, como mortalidade, alterações comportamentais, fisiológicas, indicando e alertando a respeito da presença de substâncias com alto potencial de devastação ambiental. Nesse sentido, a ecotoxicologia aquática surgiu com o princípio de analisar essas contaminações que algumas vezes estão imperceptíveis por análise, implicando uma respostas nas espécies com aspectos biológicos e ecológicos bem conhecidos e que sejam sensíveis a perturbações ambientais e representativas na teia trófica, onde qualquer alteração causada nesses indivíduos poderá desencadear uma série de respostas, sendo capaz de afetar todos os níveis tróficos (Lebboroni et al., 2006). Os testes de evitamento vêm auxiliar na compreensão destes mecanismos de fuga para organismos aquáticos em exposição aos agrotóxicos e analisar os aspectos bioquímicos destas ações para mensuração e possível aplicação em prejuízos metabólicos nos indivíduos expostos. As respostas comportamentais oferecem vantagens uma vez que os processos bioquímicos e fisiológicos são integrados, e essas respostas podem ser consideradas o mais cedo, sinais de defesa de proteção, rápidos e imediatos acionados pela presença de contaminantes (Hellou, 2011).

1.2 O herbicida atrazina

Os herbicidas são a classe de pesticidas mais utilizados no mundo (Li et al., 2017), dentre eles, a Atrazina (ATZ) (1-cloro-3-etilamino-5-isopropilamino- 2,4,6 triazina). Ela pertence ao grupo das triazinas, que são os herbicidas responsáveis por inibir o crescimento da planta alvo interferindo no fotossistema II (Graymore et al., 2001; Arias et al., 2007). A ATZ

é um herbicidas utilizados nas fases pré e pós-emergência em plantações de milho, cana de açúcar, soja, sorgo e trigo (Silva et al., 2007). 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 (Singh et al., 2017), mais precisamente em 41 países conforme os dados de Pan, 2021. A meia vida da ATZ é de 60 dias no solo e 1200 dias na água, mas dependendo do tipo de solo, temperatura, luz solar, microrganismos e concentração do produto ela pode ser diferente (Konstantinou et al., 2005; Silva et al., 2007). Ela pode ser facilmente encontrada em recursos hídricos e sua concentração máxima permitida em águas brasileiras de classe I a III é de $2 \mu\text{g L}^{-1}$ (Conama, 2005).

Sendo um dos herbicidas mais amplamente utilizado no país. Segundo dados de comercialização disponibilizados pelo Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais (IBAMA) entre os anos de 2020 a (ATZ) esteve na lista dos 10 princípios ativos mais vendidos no Brasil. Nesse período foram vendidas cerca de 33.321,11 toneladas de P.A., sendo o quarto mais vendido no período (Brasil, 2022). Este sem dúvida um dos herbicidas mais utilizados, por sua eficiência no controle de plantas daninhas em grandes culturas, aplicado na cultura pré e/ou pós-emergência (Hang et al., 2007).

1.3 Testes de ecotoxicidade

Os ensaios ecotoxicológicos aplicados em organismos aquáticos também são utilizados para avaliação da contaminação ambiental por agrotóxicos. Nessas categorias de ensaios os principais riscos de contaminação e toxicidade dos agrotóxicos surgem a partir da identificação do nível de toxicidade destes compostos químicos, como o escoamento superficial para a água, resultantes de fortes chuvas após a aplicação de pesticidas (Chelinho et al., 2012), conseguindo comprometer a estrutura dos ecossistemas aquáticos mesmo quando aplicado na sua menor concentração (Azevedo e Coronas, 2018). Os riscos aos organismos resultantes da exposição a contaminantes estão comumente relacionados a danos causados aos indivíduos, incluindo efeitos letais e subletais (Martinez-Haro et al., 2015).

Os ensaios ecotoxicológicos em diferentes sistemas, organismos e compartimentos ambientais são fundamentais para avaliação da segurança ambiental dos agrotóxicos. É importante salientar que alguns produtos são reavaliados quanto a dosagem recomendada, pois as quantidades determinadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) podem ocasionar efeitos subletais aos organismos (Azevedo e Coronas, 2018).

Os testes de toxicidade constituem-se basicamente da exposição de organismos

aquáticos às substâncias potencialmente tóxicas, visando à observação e análise das respostas destes organismos à substância testada. Podem ser utilizados para avaliar a concentração e o tempo de exposição a agentes químicos potencialmente tóxicos necessários para produzir um efeito adverso ou danoso (Rand e Petrocelli, 1995), bem como alertar para as substâncias químicas que representem risco e, assim, sugerir a aplicação de medidas preventivas antes que ocorram graves danos aos ecossistemas naturais (Dornfeld et al., 2006).

Na exposição aguda, os organismos entram em contato com a substância química, considerado potencialmente tóxico por um curto período de tempo em um evento único (Adams, 1995). Nesse tipo de exposição, onde o agente químico é assimilado rapidamente, os efeitos observados são imediatos (Tomita e Beyruth, 2002). O principal efeito observado nos testes de toxicidade aguda é a letalidade, a partir da onde se determina a CL50, que é a concentração do contaminante responsável por causar mortalidade em 50% dos organismos expostos em cada tratamento (Rand e Petrocelli, 1995).

Na exposição crônica, os organismos geralmente são expostos a uma concentração menor do composto, porém que é liberado continuamente, ou com certa periodicidade por um período maior de tempo. Os efeitos causados por esse tipo de exposição podem se demonstrar rapidamente, como em uma exposição aguda, ou se manifestarem ao longo do ciclo de vida, devido à acumulação desses compostos (Tomita e Beyruth, 2002). Podem ser observadas alterações no crescimento, na reprodução, fisiologia e histologia incluindo alterações comportamentais (Marcato et al., 2017)

A maioria dos padrões de qualidade para proteção de comunidades aquáticas foi, e ainda é estabelecido com base em estudos de laboratório, entre eles experimentos de bioacumulação, de comportamento e testes ecotoxicológicos (Pereira et al., 2009), que fornecem conhecimentos básicos e apresentam custo reduzido, e ainda simulam o que pode acontecer nos sistemas aquáticos com razoável aproximação (Bertoletti, 2000).

1.4 Teste de evitamento

O princípio do teste de evitamento (ou avoidance) é que o organismo apresenta capacidade de reconhecer os possíveis contaminantes na água, evitando os locais de maiores contaminações, baseando em seus aspectos fisiológicos e seus receptores químicos espalhados pelo corpo dos indivíduos. Além dos testes ecotoxicológicos tradicionais, estudos comportamentais também tem se mostrado muito eficazes na busca de respostas a intervenções químicas no meio ambiente. Um dos exemplos são os testes de evitamento (ou de preferência), onde os organismos são capazes de mover-se por diferentes gradientes

quando expostos a diferentes concentrações de um mesmo composto, sendo avaliada como resposta a capacidade dos mesmos em detectarem ambientes tóxicos, evitando as concentrações consideradas mais prejudiciais. São testes de curta duração, capazes de fornecer respostas comportamentais altamente relevantes (Rosa et al., 2012), já que o evitamento de um ambiente potencialmente contaminado pode fornecer respostas consideráveis sobre o deslocamento de uma população e de toda a dinâmica do ecossistema (Araújo et al., 2014).

A resposta de evasão visível em condições reais é conhecida como vôo / fuga / evasão. Esse comportamento reflete um primeiro sinal de alerta, quase sempre precoce, sobre uma possível deterioração do ecossistema (Hellou, 2011), e sua relevância é que geralmente é apreciável em baixos níveis de toxicidade (Rosa et al., 2008; Araújo et al., 2016b). Vários autores mencionam que o comportamento de evasão pode ser considerado uma ferramenta complementar na avaliação do risco ecológico, uma vez que é uma resposta facilmente apreciável, confiável, rápida e de alta relevância ecológica (Lopes et al., 2004; Rosa et al., 2008; Araújo et al., 2012). A evasão integra o conceito de dinâmica populacional onde o movimento dos organismos é considerado "como uma resposta à contaminação" (Hellou et al., 2008; Vera-Vera et al., 2021). Conseqüentemente, o deslocamento leva os evitadores a selecionar habitats mais favoráveis (preferência de habitat), desencadeando até mesmo processos de recolonização em áreas recuperadas adjacentes que apresentam melhores condições para a espécie (Araújo et al., 2018). Este tipo de resposta representa uma importante linha de evidência baseada nos principais efeitos em nível ecotoxicológico, visto que o deslocamento de um organismo que não era naturalmente encontrado no habitat condiciona as relações ecológicas em vários níveis, como a pressão competitiva por espaço e alimento nas novas áreas colonizadas (Fleeger et al., 2003; Wells et al., 2004).

1.5 Teste bioquímico oxidativo

Testes moleculares e bioquímicos decorrentes da exposição a agentes tóxicos tendem a ser mais sensíveis, menos variáveis e mais altamente conservados do que parâmetros determinados ao nível orgânico (Adams et al., 1990). O uso de biomarcadores bioquímicos em programas de monitoramento oferece algumas vantagens porque são normalmente os primeiros a serem detectados, são bastante sensíveis à presença de determinados poluentes, apresentam alta especificidade, possuem baixo custo de análise e fornecem informações a respeito do efeito metabólico causado pelo xenobiótico (Stegeman et al., 1992).

O processo de biotransformação pode ser definido como a conversão, catalisada por enzimas, de um composto xenobiótico em uma forma mais solúvel em água, que pode ser mais

facilmente excretada (Van der Oost et al., 2003).

O uso de exposição forçada em testes biológicos pode ser justificado com base em muitos motivos, sendo assim podemos analisar três deles: são fáceis de usar, permitem o estabelecimento de uma relação precisa entre a concentração-efeito no nível individual, e possibilita resultados analisáveis. Porém, se os principais efeitos estressores a serem analisados serão aqueles que ocorrem nos níveis de comunidade e ecossistema, sendo que os efeitos individuais medidos sob exposição forçada podem limitar a avaliação dos riscos ambientais (Araújo, 2016a).

A exposição forçada supõe uma exposição obrigatória à contaminantes para diferentes tipos de organismos, não oferecendo nenhuma possibilidade de escape destes indivíduos. Por esta razão, a informação que tais ensaios proporcionam é baseada em quão tóxico um contaminante é para os organismos em estudos. Porém nos últimos anos foram sugeridas abordagens para a exposição não forçada utilizando principalmente os testes de evitamento multicompartimentado linear (Blasco, 2020).

1.6 Anfíbios

Os anfíbios são um dos grupos de animais mais ameaçados de extinção em todo o mundo e vêm sofrendo uma queda de riqueza em grandes proporções desde a década de 1980 (Almeida, 2019). São considerados bioindicadores por terem contato com estressores tanto aquáticos (em suas formas larval e adulta) como atmosféricos e do solo (em sua forma adulta) e por possuírem a pele permeável e ovos sem cascas, que ficam diretamente expostos ao solo, à água e à luz solar (Blaustein e Kiesecker, 2002). Compreendem a maior biomassa de vertebrados e contribuem significativamente para a dinâmica trófica em muitas comunidades e o declínio de anfíbios anuros pode ter impactos importantes sobre outros organismos (Blaustein e Kiesecker, 2002).

O uso de espécies de anfíbios na avaliação da qualidade ambiental ainda é incipiente e não existem métodos muito difundidos e validados (Lebboroni et al., 2006), apesar de alguns deles terem sido desenvolvidos em alguns lugares do mundo (Usepa, 2002; Astm, 2004, Astm 2014). Entretanto, os estudos com esses animais têm se ampliado largamente, tornando-se mais frequente e de maior interesse na identificação de devastações ambientais, principalmente devido ao declínio dessas populações e às ameaças que esses animais têm sofrido (Houlahan et al., 2000), tornando assim os anfíbios um excelente organismo indicador de contaminação ambiental.

Esse interesse em estudos com anfíbios é reforçado pelo fato desses animais poderem

ser utilizados como bons indicadores da qualidade da água e de estresse ambiental, já que podem indicar diversos efeitos subletais quando expostos a poluentes, como mudança no crescimento e na taxa de desenvolvimento e alterações morfológicas (Pechmann e Wilbur, 1994).

Os anfíbios são mais sensíveis do que outros vertebrados que aumentam seu valor como bioindicadores, tais como: o complexo ciclo de vida, que engloba estágios aquáticos e terrestres (ciclo bifásico) e faz com que estejam expostos aos poluentes de ambos os ambientes; espécies com larvas aquáticas, o que facilita a detecção de efeitos diretos dos poluentes no crescimento dessas espécies, ou dos efeitos indiretos via rede trófica; brânquias e/ou pele em contato muito próximo com a água e com o solo, aumentando a chance de absorção de poluentes. Por serem animais ectotérmicos podem se mostrar mais susceptíveis às variações ambientais do que os organismos endotérmicos. Além disso, quando estão inativos, muitas espécies estivam no solo, o que os expõem a sedimentos tóxicos (Rosa et al., 2008).

Em estudos realizados por Birge et al. (2000) foi avaliada a sensibilidade de diversas espécies de anfíbios para múltiplos contaminantes, e quando comparados com a sensibilidade apresentada por peixes observou-se que, em 67% dos casos em que foram utilizados metais como substância teste, os anfíbios eram mais sensíveis, e para metais e outros compostos químicos orgânicos esse percentual foi de 64%. Bridges et al. (2002) verificaram que girinos de *Lithobates pipiens* foram muito mais tolerantes do que peixes quando submetidos a exposição de componentes orgânicos, como carbaril e permetrin, e muito mais sensíveis a outros componentes, como o cobre. Esses produtos podem causar uma série de efeitos adversos em anfíbios, incluindo a diminuição na taxa de crescimento e desenvolvimento, aumento de anormalidades e influência direta na reprodução e sobrevivência destes animais (Sparling e Fellers, 2009).

Os girinos possuem características estruturais específicas que são ausentes nos adultos. O aparato oral é um exemplo, pois é uma estrutura presente apenas na fase larval dos anuros. Alterações nas estruturas orais podem provocar uma redução na eficiência de forrageamento dos organismos, pois essas estruturas são fundamentais para que os girinos possam se alimentar (Almeida, 2019). Para Boone e James (2005) os anfíbios são os organismos que mais podem maximizar o controle experimental e o realismo ecológico, tanto em trabalhos realizados em laboratórios como em condições de campo.

Avaliamos a sensibilidade e os possíveis efeitos tóxicos do herbicida Atrazina (ATANOR 50 SC®) em girinos de rã-touro (*Lithobates castebianus*), através de testes de evitamento/fuga e estresse oxidativo.

A dissertação é apresentada na forma de capítulos, onde o “Capítulo 1” intitulado “Alterações bioquímicas para anfíbios como resultado do evitamento a locais contaminados com atrazina”, será submetido à revista especializada no assunto abordado neste trabalho.

2. Referências bibliográficas

- Adams, S.M.; Shugart, L.R.; Southworth, G.R.; Hinton, D.E. 1990. Application of bioindicators in assessing the health of fish populations experiencing contaminant stress. In: McCarthy, J.F. & Shugart, L.R. (Eds.) Biomarkers of environmental contamination, Boca Raton, Lewis Publishers, p. 333-353.
- Adams, W.J. 1995. Aquatic toxicology testing methods. In: Hoffman, D.J. et al. Handbook of ecotoxicology, Boca Raton, Lewis Publishers. Cap. 13, p. 25-46.
- Almeida, P.R.; Rodrigues, M.V.; Imperador, A.M. 2019. Toxicidade aguda (CL50) e efeitos comportamentais morfológicos de formulados comercial com princípio ativo glifosato em girinos de *Physalemus cuvieri* (anura, leptodactylidae) e *Rhinella icterica* (anura, bufonidae). Engenharia Sanitária Ambiental, 24, Nov/Dez. 1115-1125. <https://doi.org/10.1590/s1413-41522019166886>
- Araújo, C.V.M.; Blasco, J.; Moreno-Garrido, I. 2012. Measuring the avoidance behaviour shown by the snail *Hydrobia ulvae* exposed to sediment with a known contamination gradient. Ecotoxicology, 21: 750-758. <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0835-6>
- Araújo, C.V.M.; Griffith, D.M.; Vera-Vera, V.C.; Jentzsch, P.V.; Cervera, L.; Nieto-Ariza, B.; Salvatierra, D.; Erazo, S.; Jaramillo, R.; Ramos, L. A.; Moreira-Santos, M.; Ribeiro, R. 2018. A novel approach to assessing environmental disturbance based on habitat selection by zebra fish as a model organism. Science of the Total Environment, 620: 906-915. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.170>
- Araújo, C.V.M.; Moreira-Santos, M.; Ribeiro, R. 2016b. Active and passive spatial avoidance by aquatic organisms from environmental stressors: a complementary perspective and a critical review. Environment International, 92-93: 405-415. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.04.031>
- Araújo, C.V.M.; Moreira-Santos, M.; Sousa, J.P.; Ochoa-Herrera, V.; Encalada, A.C.; Ribeiro, R. 2014. Active avoidance from a crude oil soluble fraction by an Andean paramo copepod. Ecotoxicology, 23: 1254-1259. <https://doi.org/10.1007/s10646-014-1268-9>
- Araújo, C.V.M.; Rodríguez, E.N.V.; Salvatierra, D.; Cedeño-Macias, L.A.; Vera-Vera, V.C.; Moreira-Santos, M.; Ribeiro, R. 2016a. Attractiveness of food and avoidance from contamination as conflicting stimuli to habitat selection by fish. Chemosphere 163: 177-183. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.08.029>
- Arias, A.R.L.; Buss, D.F.; Albuquerque, C.; Inácio, A.F.; Freire, M.M.; Egler, M.; Mugnai, R. Baptista, D.F. 2007. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. Ciência e Saúde Coletiva, 12: 61-72. <http://dx.doi.org/10.1590/s1413-81232007000100011>

- Armas, E.D.; Monteiro, R.T.R. 2005. Uso de agrotóxicos em cana-de-açúcar na bacia do rio corumbataí e o risco de poluição hídrica. *Química Nova*, 28(6): 975-982. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000600008>
- Astm - American society for testing and material. 2014. Active standard: ASTM E1192-97: Standard guide for conducting acute toxicity tests on aqueous ambient samples and effluents with fishes, macroinvertebrates, and amphibians. West Conshohocken: ASTM. Book of Standards, vol. 11.06. Acesso em: <http://www.astm.org/Standards/E1192.htm>
- Astm - American society for testing and materials. 2004. Active standard: E1439-98. Standard guide for conducting the frog embryo teratogenesis assay-*Xenopus* (Fetax), 16p. <https://doi:10.1520/E1439-12R19>
- Azevedo, A.R.; Coronas; M.V. Uso de testes de fuga com minhocas *eisenia andrei* e *eisenia fetida* para identificação da toxicidade de agrotóxicos no brasil: uma breve revisão da literatura. 2018. *Ciência e Natura* v.40, edição especial: ii mostra de projetos da UFMS - Campus Cachoeira Do Sul. <https://doi.org/10.5902/2179460X35495>
- Bertoletti, E. 2000. Estimativa de efeitos tóxicos crônicos com *Danio rerio* (Pisces, Cyprinidae). 2000, 118 F. (Tese de Doutorado) - Faculdade De Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo. Disponível em: <<https://teses.usp.br/teses/disponiveis/6/6134/tde-01042020103731/ptbr.php#:~:text=Quanto%20%C3%A0%20variabilidade%20anal%C3%ADtica%2C%20foi,subst%C3%A2ncias%20para%20o%20Danio%20rerio>> Acesso em 20 dez. 2021.
- Birge, W.J.; Westerman, A.G.; Spromberg, J.A. 2000. Comparative toxicology and risk assessment of amphibians. In: Sparling, D. W. Et al. (Eds). *Ecotoxicology of amphibians and reptiles*. 2nd Edition, Pensacola, Fl, 2010, 916p.
- Blasco, J.; Araújo, C.V.M.; Ribeiro, R.; Moreira-Santos, M. 2020. Do contaminants influence the spatial distribution of aquatic species? how new perspectives on ecotoxicological assays might answer this question. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 39(1): 7-8. <https://doi.org/10.1002/etc.4594>
- Blaustein, A.R.; Kiesecker, J.M. 2002. Complexity and conservation: lessons for the global decline of amphibian populations. *Ecology Letters*, 5(4): 597-608. <https://doi.org/10.1046/J.1461-0248.2002.00352.X>
- Boone, M.D.; James, S.M. 2005. Aquatic and terrestrial mesocosms in amphibian ecotoxicology. *Applied Herpetology*, 2: 231-257. <https://doi.org/10.1163/1570754054507442>
- Brasil. 2005. Resolução CONAMA 357, de 17 de março de 2005 Conselho Nacional de Meio Ambiente. Disponível em: <www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>. Acesso em: 2 jan. 2021.
- Brasil. 2017. Ministério da Saúde. Portaria de consolidação Nº 5, De 28 de setembro de 2017 - Anexo xx, Brasília, Df, 03 Out. Seção 1, P. 360.
- Brasil. 2017. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA. (2017). Boletim de Comercialização de Agrotóxicos e Afins: histórico de vendas 2000-2017. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#historicodecomercializacao>> Acesso em 29 mai. 2022.

- Brasil. 2022. Ibama - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente. Disponível em: <<http://ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#>> Acesso em: 22 mai. 2021.
- Bridges, C.M.; Dwyer, F.J.; Hardesty, D.K.; Whites, D.W. 2002. Comparative contaminant toxicity: are amphibian larvae more sensitive than fish? *Bulletin of Environmental Contaminant and Toxicology*, 69: 562-569. <https://doi.org/10.1007/s00128-002-0098-2>
- Chelinho, S.; Lopes, I.; Natal-Da-Luz, T. 2012. Integrated ecological risk assessment of pesticides in tropical ecosystems: a case study with carbofuran in Brazil. *Environmental toxicology and chemistry*, 31(2): 437-445. <https://doi.org/10.1002/etc.738>
- Dores, E.F.G.C.; De-Lamonica-Freire, E.M. 1999. Contaminação do ambiente aquático por pesticida: vias de contaminação e dinâmica dos pesticidas no ambiente aquático. *pesticidas: Revista de ecotoxicologia e meio ambiente*, 9: 1-18. <http://dx.doi.org/10.5380/pes.v9i0.39598>
- Dornfeld, C.B.; Espindola, E.L.G.; Fracácio, R.; Rodrigues, B. K.; Novelli, A. 2006. Comparação de bioensaios laboratoriais e in situ utilizando *Chironomus xanthus* na avaliação da toxicidade de sedimentos do rio Monjolinho (São Carlos, SP). *Journal of the brazilian society of ecotoxicology*, 1(2): 161- 165. <https://doi.org/10.5132/jbse.2006.02.014>
- Fleeger, J.W., Carman, K.R., Nisbet, R.M., 2003. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *Science of the Total Environment*, 317: 207-233. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(03\)00141-4](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(03)00141-4)
- Gaboardi, S.C., Candioto, L.Z.P., & Ramos, L.M. 2019. Perfil do uso de agrotóxicos no Sudoeste do Paraná (2011-2016). *Revista NERA*, 22(46), 13-40, 2019
- Graymore, M.; Stagnitti, F.; Allison, G. 2001. Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. *Environment International*, 26:483-495. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(01\)00031-9](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(01)00031-9)
- Grisolia, C.K. 2005. *Agrotóxicos: Mutações, Câncer e Reprodução*. Brasília: Editora Universidade De Brasília, 392p.
- Hang, S.; Nassetta, M.; Cañas, A.I.; Rampoldi, E.A.; Fernández-Canigia, M.V.; Díaz-Zorita, M. 2007. Changes in the atrazine extractable residues in no-tilled mollisols. *Soil e Tillage Research* 96: 243-249. <https://doi.org/10.1016/j.still.2007.06.003>
- Hellou, J. 2011. Behavioural ecotoxicology, an “early warning” signal to assess environmental quality. *Environmental Science and Pollution Research*, 18: 1-11. <https://doi.org/10.1007/s11356-010-0367-2>
- Hellou, J., Cheeseman, K., Desnoyers, E., Jonhston, D., Jouvenelle, M.-L., Leonara, J., Robertson, S., Walker, P. 2008. A non-lethally chemically based approach to investigate the quality of harbour sediments. *Science of the Total Environment*, 389: 178-187. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.08.010>
- Houlahan, J., Findlay, C., Schmidt, B. 2000. Quantitative evidence for global amphibian population declines. *Nature*, 404: 752-755. <https://doi.org/10.1038/35008052>
- Konstantinou, I.K.; Hela, D.G.; Albanis, T.A. 2005. The status of pesticide pollution in surface

- waters (rivers and lakes) of Greece. Review on occurrence and levels. *Environmental Pollution*, 141: 555-570. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.07.024>
- Lebboroni, M.; Chelazzi, G.; Bellavita, M.; Ricchiardino, G. 2006. Potential use of anurans as indicators of biological quality in upstreams of central Italy, *Amphibia-Reptilia*, 27(1): 73-79. <https://doi.org/10.1163/156853806776052164>
- Li, K.; Wu, J.Q.; Jiang, L.L.; Shen, L.Z.; Li, J.Y.; He, Z.H.; Wei, P.; L.V.Z.; He, M.F. 2017. Developmental toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in zebrafish embryos. *Chemosphere*, 171: 40-48. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.032>
- Lopes, I.; Baird, D.J.; Ribeiro, R. 2004. Avoidance of copper contamination by field population of *Daphnia longispina*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23: 1702-1708. <https://doi.org/10.1897/03-231>
- Lopes, V.G.; Nascimento, G.N.L. 2020. Food safety: relation between pesticides and poisoning. *Food Science Technology Campinas*, 41(1): 174-179, Jan.-Mar. 2021. <https://doi.org/10.1590/fst.39519>
- Marcato, A.C., de Souza, C.P., Fontanetti, C.S. 2017. Herbicide 2,4-D: A Review of Toxicity on Non-Target Organisms. *Water. Air. Soil. Pollution* 228(3). <https://doi.org/10.1007/s11270-017-3301-0>.
- Martinez-Haro, M.; Beiras, R.; Bellas, J.; Capela, R.; Pedro, J.; Lopes, I.; Moreira-Santos, M.; Reis-Henriques, A.M.; Ribeiro, R.; Santos, M.M., Carlos, J. 2015. A review on the ecological quality status assessment in aquatic systems using community-based indicators and ecotoxicological tools: what might be the added value of their combination? *Ecological Indicators*, 48: 8-16. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2014.07.024>
- Pan, Pesticide Action Network, 2021. <<http://pan-international.org/paninternational-consolidated-list-of-banned-pesticides/>>. Acesso em: 18 mai 2022.
- Pavan, F.A., Samojeden, C.G., Rutkoski, C.F., Folador, A., Da Fr'e, S.P., Müller, C., Hartmann, P.A., Hartmann, M.T., 2021. Morphological, behavioral and genotoxic effects of glyphosate and 2,4-D mixture in tadpoles of two native species of South American amphibians. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 85, 103637 <https://doi.org/10.1016/j.etap.2021.103637>
- Pechmann, J.H.K.; Wilbur, H.M. 1994. Putting Declining Amphibian Populations. In: *Perspective: Natural fluctuations and human impacts. Herpetologica*, 50(1): 65-84.
- Pereira, J.L.; Antunes, S.C.; Castro, B.B.; Marques, C.R.; Gonçalves, A.M.; Gonçalves, F.; Pereira, R. 2009. Toxicity evaluation of three pesticides on non-target aquatic and soil organisms: commercial formulation versus active ingredient. *Ecotoxicology (London, England)*, 18(4): 455-463. <https://doi.org/10.1007/s10646-009-0300-y>
- Rand, G.M.; Petrocelli, S.R. 1995. *Fundamentals of aquatic toxicology: Methods and applications*. Hemisphere, 666 p.
- Reichert, L.M.M.; Oliveira, D.R.; Papaleo, J.L.; Valgas, A.A. N.; Oliveira, G.T. 2022. Biochemical and body condition markers in *Rhinella icterica* tadpoles exposed to atrazine, glyphosate, and quinclorac based herbicides in ecologically relevant concentrations. *Environmental*

Toxicology and Pharmacology 93. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2022.103884>

- Rosa, R., Moreira-Santos, M.; Lopes, I.; Picado, A. Mendonsca, F.; Ribeiro, R. 2008. Development and sensitivity of a 12-h laboratory test with *Daphnia magna* straus based on avoidance of pulp mill effluents. Bull. Environ. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 81: 464-469. <https://doi.org/10.1007/s00128-008-9538-y>
- Rosa, R.; Materatski, P.; Moreira-Santos, M.; Sousa, J.P.; Ribeiro, R. 2012. A scaled-up system to evaluate zooplankton spatial avoidance and the population immediate decline concentration. Environmental Toxicology and Chemistry, 31: 1301-1305. <https://doi.org/10.1002/etc.1813>
- Sabik, H.; Jeannot, R.; Rondeau, B. 2000. Multiresidue methods using solid-phase extraction techniques for monitoring priority pesticides, including triazines and degradation products, in ground and surface waters. Journal of Chromatography, 885: 217-236. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)01084-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)01084-5)
- Silva, J.F.; Ferreira, L.R.; Ferreira F.A. 2007. Herbicidas: absorção, translocação, metabolismo, formulação e misturas. UFV, 22: 367p.
- Singh, S.; Kumar, V.; Chauhan, A.; Datta, S.; Wani, A.B.; Singh, N.; Singh, J. 2017. Toxicity, degradation and analysis of the herbicide atrazine. Environmental Chemistry Letters, 16: 211-237. <https://doi.org/10.1007/s10311-017-0665-8>
- Sparling, D.W.; Fellers, G.M. 2009. Toxicity of two insecticides to California, USA, anurans and its relevance to declining amphibian populations. Environmental Toxicology and Chemistry, 8: 1696-1703. <https://doi.org/10.1897/08-336.1>
- Stegeman, J.J.; Brouwer, M.; Di Giulio, R.T.; Förlin, L.; Fowler, B.A.; Sanders, B.M.; Van Veld, P.A. 1992. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: Hugget, R.J.; Kimerle, R.A.; Mehrle Jr, P.M.; Bergman, H.L. (Eds.) Biomarkers. Biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. Boca Raton, Lewis Publishers, p. 235-335.
- Tomita, R.Y.; Beyruth, Z. 2002. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. Biológico, 64(2): 135-142.
- Usepa - United States Environmental Protections Agency. 2002. Methods for evaluating wetland and condition: Using Amphibians in Bioassessments of wetlands. Epa-822-r-02-022. Environmental Protection Agency. 41p.
- Van Der Oost, R.; Beyer, J.; Vermeulen, N.P.E. 2003. Fish Bioaccumulation and Biomarkers In Environmental Risk Assessment: A Review. Environmental Toxicology and Pharmacology, 13: 57-149. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6)
- Veiga, M.; Silva, M.; Veiga, L.; Faria, M. 2006. Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil. Cadernos de Saúde Pública - Caderno saúde pública. 22. V. 22, N. 11, p. 2391-2399, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2006001100013>
- Vera-Vera, V.; Cedeño-Macías, L.; Macías-Mayorga, D.; Blasco, J.; Santos-Moreira, M.; Ribeiro, R.; Araújo, C.V.M. 2021. Métodos de exposición no forzada en sistemas multi-

compartimentados para incluir la selección de hábitat como respuesta a la contaminación. in: recurso água: tecnologia e pesquisas para o uso e conservação de ecossistemas aquáticos. 1º Ed. São Carlos, SP. Editora Cubo. E-Book. <https://doi.org/10.4322/978-65-86819-07-6>

Wells, J.B.; Little, E.E.; Calfee, R.D. 2004. Behavioral response of young rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to forest fire-retardant chemicals in the laboratory. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23: 621–625. <https://doi.org/10.1897/02-635>

CAPÍTULO 1

ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS EM ANFÍBIOS COMO RESULTADO DO EVITAMENTO A LOCAIS CONTAMINADOS COM ATRAZINA

Resumo

Alterações bioquímicas em anfíbios como resultado do evitamento a locais contaminados com atrazina

A atrazina (ATZ) na última década foi um dos princípios ativos mais utilizados nos sistemas agropecuários. Este pesticida tem a capacidade de se acumular com facilidade nos ambientes terrestre e aquático, provocando contaminações e impactos sobre os seres vivos com efeitos crônicos adversos. Os testes de evitamento/fuga são ensaios que procuram avaliar a concentração a partir da qual determinado organismo evade em determinadas localidades, isso é, migra para outro ecossistema ou habitat. Foram inicialmente idealizados para o ambiente terrestre, mas estão sendo utilizados em meio aquoso como uma modalidade de testes ecotoxicológicos inovadores e pouco invasivos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a sensibilidade e os possíveis efeitos tóxicos da ATZ (ATANOR 50SC®) em girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), através dos testes de evitamento/fuga e análises de estresse oxidativo (Aminoácidos, Peroxidase, Fenóis e Proteínas). Realizamos o teste comportamental de evitamento com duração de 12 h, com observações a cada 60 min em sistema multicompartimentado linear com sete compartimentos. Cada compartimento correspondeu a uma concentração sendo controle (sem adição de ATZ), 1, 2, 20, 200, 2.000, 20.000 µg/L. Os possíveis efeitos metabólicos foram mensurados através de análises bioquímicas oxidativas, avaliando o perfil de aminoácidos do plasma sanguíneo e a degradação de proteínas do fígado após 48 h de exposição. Determinamos também as concentrações efetivas de ATZ às 0 h e 48 h. Os resultados evidenciaram que houve efeito do tratamento sobre a distribuição dos girinos, mas não das horas e nem do efeito combinado entre tratamentos e horas (interação). As análises bioquímicas também apresentaram uma relação dependente da concentração causando efeitos tóxicos expressivos mesmos em um curto período de tempo. Concluindo, estes anuros foram capazes de evitar locais com altas concentrações de ATZ nas primeiras horas de exposição, o que sugere que no ambiente natural estes animais possam migrar ou evitar áreas contaminadas por este herbicida.

Palavras-chave: Evitamento; Proteínas hepáticas, Peroxidase, Aminoácidos, Fenóis, Ecotoxicologia.

1. Introdução

Os agrotóxicos, utilizados na lavoura, apresentam riscos à saúde e ao meio ambiente o que justifica a importância de estudos, pesquisas, monitoramento e controle destes produtos (Matias et al., 2019; Amaro et al., 2021; Matias et al., 2021). A atrazina (ATZ) (2-cloro-4-(2-isopropilamino-6-etilamino)-s-triazina) é um herbicida de ação seletiva pré e pós-emergente, utilizado em controle de infestações predominantes de folhas largas e presença de gramíneas sensíveis, em culturas agrícolas de folhas estreitas, como milho, sorgo e cana de açúcar (Borras et al., 2010; Schmidt et al., 2021). Segundo o Boletim Nacional de Comercialização de Agrotóxicos emitido pelo órgão ambiental brasileiro IBAMA, de 2019 a 2020 o consumo de ATZ no Brasil foi bastante representativo passando de 23.429,38 ton de ingrediente ativo (i.a.) para 33.321,11 ton i.a.. Entretanto, os números ainda são altos, e mantém a ATZ como um dos agrotóxicos mais consumidos, ocupando o 4º lugar entre os herbicidas mais vendidos no país (Brasil, 2022).

A ATZ é um herbicida classificado como moderadamente tóxico para os seres humanos e outros organismos que pode atingir o ambiente aquático via deposição atmosférica e lixiviação por aplicação agrícolas, e tem meia-vida variando de 2 a 800 dias, dependendo do pH e de outros fatores ambientais (Coady et al., 2005). Em peixes, anfíbios e alguns mamíferos este herbicida possui efeitos carcinogênicos, mutagênicos, teratogênicos, podendo causar alterações no desenvolvimento do feto, problemas na reprodução, como consequência desses efeitos adversos (Tillitt et al., 2010; Papoulias et al., 2014; Liu et al., 2016; Gonçalves et al., 2017; Cleary et al., 2019). Em mamíferos os sinais de intoxicação, podem incluir dores abdominais, diarreia, vômito, irritação de olhos, irritação de mucosas e reações de pele (Rojas et al., 2015). No ser humano, afeta principalmente os sistemas endócrino, nervoso central, imunológico e reprodutivo em concentrações entre 5 e 10 µg/L no ambiente (Douglas et al., 2014; Matias et al., 2021). Em organismos aquáticos alterações na arquitetura de fígado, brânquias, além de aumento dos níveis de acetilcolinesterase no cérebro e efeitos deletérios no crescimento também foram reportados (Santos et al., 2015; Loughlin et al., 2016).

Entretanto, dados publicados pela Usepa (2016) sugerem que espécies não-alvo, incluindo anfíbios, podem ser impactadas pela ATZ por exposição crônica em concentrações ambientalmente relevantes. Este herbicida também pode ser incorporado e propagado em cadeias alimentares, podendo alterar o metabolismo de espécies vegetais e animais, levando o ecossistema ao desequilíbrio, além da geração de um tipo de contaminação derivada da mobilidade deste composto no solo e em corpos d'água (Kanissery & Sims, 2011; Matias et al., 2021). Apesar de apresentar médio potencial de contaminação por seu transporte estar

associado ao sedimento, apresenta alto potencial tóxico quando dissolvido em água. Por estas razões este herbicida foi banido de alguns países da União Europeia (2004/248/EC) e EUA (Salaberria et al., 2009; Rutkoski et al., 2018, Pan, 2021).

Entre os anfíbios, umas das espécies mais utilizadas em testes ecotoxicológicos é a *Lithobates catesbeianus*, popularmente conhecida como rã-touro. Esta espécie esta globalmente distribuída e é criada comercialmente para consumo humano, o que facilita sua aquisição (AmphibiaWeb, 2022). Comparativamente ela é mais resistente que vários anuros, mas também é sensível o suficiente para incorporar e externar os danos causados por xenobióticos (Viriato et al., 2021).

Testes de evitamento/fuga em meio aquoso são uma modalidade de testes ecotoxicológicos inovadores, praticamente pouco realizados. Feitos geralmente no solo (Garcia-Santos & Keller-Forrer, 2011), são experimentos de curta duração que procuram avaliar a concentração de substâncias tóxicas a partir da qual determinado organismo evade, quando possível, em resposta a contaminação em determinadas localidades, isso é, migra para outro ecossistema ou habitat menos contaminado. A grande relevância dessa análise de reprodução dos aspectos ambientais é que, na natureza, quando os organismos são expostos a determinado tóxico, muito antes da letalidade, estudada nos ensaios ecotoxicológicos agudos, os organismos migram daquelas localidades, desde que tenha condições viáveis para essa evasão. Vale observar que, do ponto de vista do equilíbrio de um ecossistema, a morte e a fuga representam o mesmo problema nas ciências ambientais, devido a diminuição da variabilidade genética e fragilidade dos organismos para o processo de seleção (Araújo et al., 2014a).

O princípio do teste de evitamento é que o organismo apresenta capacidade de reconhecer os possíveis contaminantes ambientais, evitando os locais de maiores contaminações, baseando em seus aspectos fisiológicos e seus receptores químicos espalhados pelo corpo (Rosa et al., 2012). Os organismos são capazes de mover-se por diferentes gradientes quando expostos a diferentes concentrações de um mesmo composto, sendo avaliada como resposta a capacidade deles em detectarem ambientes tóxicos (Araújo et al., 2014a).

O comportamento de fuga reflete um primeiro sinal de alerta, quase sempre precoce, sobre uma possível deterioração do ecossistema (Hellou, 2011), e sua detecção é geralmente observada em baixos níveis de toxicidade (Araújo et al., 2016). O comportamento de fuga ou evasão pode ser considerado uma ferramenta complementar na avaliação do risco ecológico, uma vez que é uma resposta facilmente apreciável, confiável, rápida e de grande importância

ecológica (Araújo et al., 2012). A evasão integra o conceito de dinâmica populacional onde o movimento de organismos é considerado "como uma resposta à contaminação" (Vera-Vera et al., 2021). Conseqüentemente, o deslocamento leva os evitadores a selecionar habitats mais favoráveis ou preferência de habitat, desencadeando até mesmo processos de recolonização em áreas recuperadas adjacentes que apresentam melhores condições para a espécie (Araújo et al., 2018). Evidências de deslocamento espacial impulsionado por contaminação em sistemas de exposição não forçada foram descritas para muitos organismos, incluindo caramujos (Araújo et al., 2012), peixes (Moreira-Santos et al., 2008, Araújo et al., 2012; 2018a; Silva et al., 2017; 2018), anfíbios (Araújo et al., 2014c; Vasconcelos et al., 2016) e espécies de invertebrados (Lopes et al., 2004; Araújo et al., 2016) expostos a diferentes contaminantes (Silva et al.; 2018).

O estresse oxidativo no fígado ocorre quando há um desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio e a capacidade antioxidante da célula (Halliwell e Whiteman, 2004). Esse desequilíbrio resulta em danos a componentes celulares, como lipídios de membrana, proteínas, ácidos nucléicos e outras pequenas moléculas. Entre os fatores que podem desencadear esta disfunção está a exposição a xenobióticos e outros contaminantes ambientais (Dornelles & Oliveira, 2014). A primeira via como defesa dos organismos são as enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), catalase ou peroxidase e, glutathione redutase. Qualquer alteração na atividade destas enzimas indica desordens ou alterações de redução ligadas ou relacionadas ao estresse oxidativo (Stara et al, 2018). As proteínas podem ser reduzidas em condições estressantes com conseqüente aumento do gasto de energia após a exposição a pesticidas. Isso pode ocorrer devido a uma tentativa de metabolizar compostos tóxicos, para aumentar a síntese de ATP, ou para a formação de lipoproteínas (Sounderraj et al., 2011; Ganeshwade, 2012).

Os aminoácidos são estruturas moleculares de extrema importância para organismos vivos com funções de formação proteínas e síntese hormonal, respostas imunes, antioxidantes e outras funções fisiológicas (Hoseini, et al., 2020). São necessários para o crescimento e classificados como não essenciais, ou seja, aqueles que podem ser produzidos pelos organismos, e essenciais, aqueles que não podem ser sintetizados ou são inadequadamente sintetizado pelos animais. Esses últimos devem ser sistematicamente fornecidos a partir da dieta em condições em que as taxas de utilização são maiores do que taxas de síntese. Para organismos aquáticos a arginina, alanina, leucina e Isoleucina exercem papel fundamental no crescimento, metabolismo de excreção e homeostase energética (Calheiros et al., 2019; Li et al., 2009).

Com objetivo de acrescentar dados consistentes sobre a sensibilidade e os possíveis efeitos

tóxicos da ATZ aos organismos aquáticos, utilizamos girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) como ferramenta experimental, expondo estes organismos a ATZ em testes de evitamento/fuga e realizando análises de estresse oxidativo.

2. Material e Métodos

2.1 Organismo aquático utilizado

Utilizamos girinos de rã-touro (*L. catesbeianus*), provenientes do Ranário experimental do Setor de Aquicultura da Unidade Regional de Pesquisa e Desenvolvimento de Pindamonhangaba - APTA Regional - SAA (SP/Brasil), classificados entre as fases 31 a 36 de Gosner (1960), com tamanho e peso médio de $8,89 \text{ cm} \pm 0,77$ e $5,92 \pm 0,54 \text{ g}$, respectivamente (n=20). Após o transporte para o laboratório, os organismos foram aclimatados durante cinco dias, em caixas plásticas preenchidas com água de abastecimento declorada por 24 h, na densidade de 2 girinos por litro. Os animais foram alimentados com somente durante a aclimação com ração Guabi® contendo: 38% Proteína Bruta, 7,5% de extrato etéreo, 4,5% de fibra bruta e 13% de matéria mineral, ofertada diariamente na proporção de 0,5% do peso vivo por animal. A experimentação foi autorizada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Pesca (certificado: 003/2021), que segue as normas internacionais de uso de animais em experimentações científicas.

2.1 Teste de evitamento

Os testes de evitamento foram realizados em um equipamento composto por Sistema Lineares Multicompartimentos (SLMs), adaptado dos sistemas desenvolvidos por Moreira-Santos et al. (2008), Araújo et al. (2018a) e Vera-Vera et al., (2021). Utilizamos canos de PVC de 100 mm de diâmetro, com 1,70 m de comprimento e corte longitudinal de 70 mm. Cada SLM possuía sete compartimentos e para uni-los utilizamos ralos populares redondos de 100 mm, unidos com luva para canos de esgoto de 40 mm. Esses ralos tinham tamanho suficiente para permitir a passagem dos girinos de um compartimento para outro. Cada compartimento foi colado dentro do cano com 90 mm de distância entre as pontas e no interior da estrutura com 110 mm cada, formando os compartimentos com 1 litro de capacidade. Após a construção do sistema foi realizado um teste com anilina alimentícia vermelha em cada compartimento para verificar possíveis vazamentos (Figura 1).

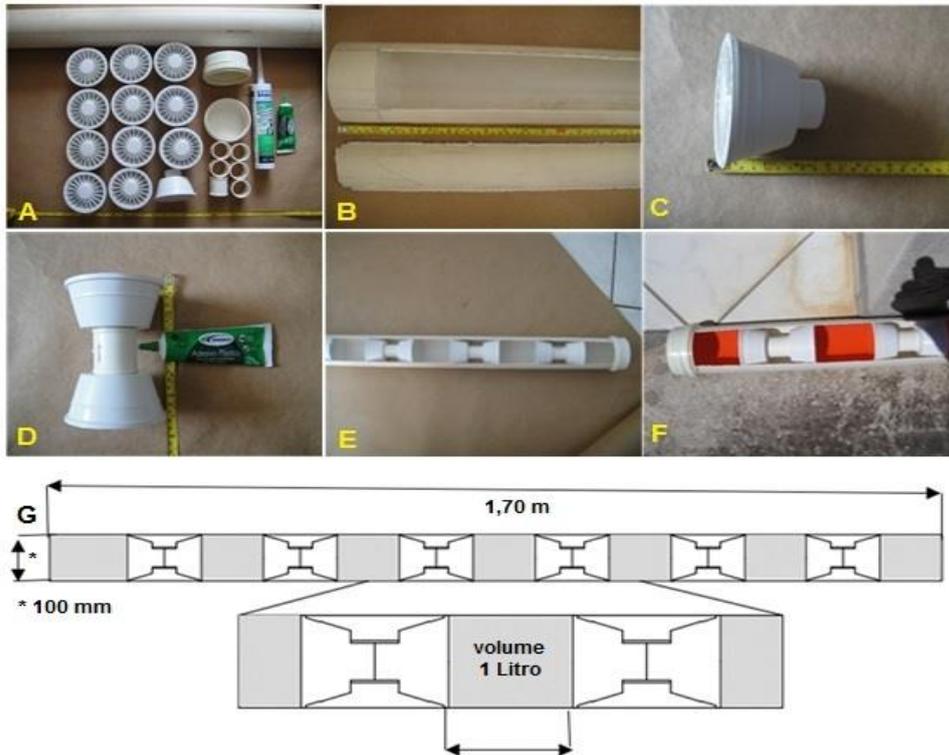


Figura 1 – Esquema de construção utilizado para montagem do Sistema Linear Multicompartimentos (SLM) e realização do teste de evitamento. **A:** Materiais utilizados. **B:** Forma de corte de 70 mm realizado no cano de PVC. **C:** Ralo popular de 100 mm. **D:** Colagem das estruturas dos ralos. **E:** Montagem e colagem da estrutura dos ralos dentro do cano. **F:** Teste de vazamento com anilina alimentícia. **G:** Esquema gráfico do sistema.]

O delineamento experimental utilizado foi composto por quatro SLMs cada um dos quais representava uma réplica e, cada unidade foi subdividida em sete compartimentos representando as concentrações/tratamentos com cinco girinos em cada compartimento ($n=140$), a saber: Controle negativo (sem adição do produto), 1, 2, 20, 200, 2.000, 20.000 $\mu\text{g/L}$, possibilitando assim avaliar concentrações muito baixas, as concentrações ambientais permitidas e extrapolar estas concentrações. Adicionalmente, para fins comparativos, utilizamos dois controles positivos, feitos também com ATZ. Animais provenientes da mesma população e no mesmo estágio de desenvolvimento (cinco organismos) foram expostos continuamente as concentrações de 2.000 e 20.000 $\mu\text{g/L}$ de ATZ em aquários de 16 L alojados no laboratório, sob as mesma água em condições de temperatura e fotoperíodo.

A duração do experimento de evitamento foi de 12 h, com observações realizadas a cada 60 min. Após o teste, os compartimentos foram fechados com os girinos presentes no compartimento que estavam onde permaneceram por mais 36 h totalizando 48 h de exposição.

2.3 A Atrazina

Para as exposições a ATZ foi obtida a partir da formulação comercial ATANOR 50 SC[®], com a concentração de ingredientes inertes de 500 g/L. Este produto tem em sua composição:

2 cloro-4(etilamino)-6(isopropilamino)-s-triazina (ATRAZINA) de 500 g/L (50,0% m/v) e outros ingredientes com 584 g/L (58,4% m/v). Este produto é altamente persistente ao meio ambiente; classificação toxicológica iii, medianamente tóxico. Esta escolha ocorreu por ser esta uma formulação de uso comum em sistemas agropecuários.

As concentrações efetivas foram mensuradas no início (0 h) e final (48 h) da experimentação. Usamos o método 3510 C da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA, 1996). Para as soluções de 1, 2, 20, e 200 µg/L em 0 h, foi colocado um litro da amostra em um funil de separação e adicionado 100 g de cloreto de sódio. Em seguida a amostra foi agitada para total dissolução do sal e, adicionamos 30 mL de diclorometano com agitação por três minutos e com abertura periódica da válvula para liberação da pressão. Por fim, o diclorometano foi coletado em um balão de fundo redondo após ser filtrado sobre sulfato de sódio anidro. A extração com diclorometano foi repetida mais duas vezes. O diclorometano foi concentrado em um rotaevaporador a 40°C, até aproximadamente 2 mL e depois seco sob fluxo suave de nitrogênio. Para as concentrações de, 1 e 2 µg/L o extrato foi resuspendido em 1 mL de acetonitrila, para as concentrações de 20 e 200 µg/L o extrato foi resuspendido em 10 mL de acetonitrila. Para as concentrações acima de 200 µg/L no tempo 0 h e para todas as soluções do tempo 48 h, 7,5 mL da solução foi adicionada em balão volumétrico de 20 mL e o volume foi completado com acetonitrila. Todas as soluções do tempo 0h e do tempo 48h foram filtradas em membrana filtrante de 0,45 µm e injetadas em cromatógrafo líquido (HPLC).

Parâmetros físicos e químicos como temperatura ambiente, temperatura da água pH e oxigênio também foram mensurados no início e no final da experimentação.

2.4 Análises de aminoácidos do plasma sanguíneo

Para as análises de aminoácidos as amostras foram coletadas antes (*i.e.* momento zero) e ao final da experimentação (48 h de exposição), em animais alocados em cada “concentração/tratamento” de preferência.

As amostras de sangue foram coletadas em pool de cinco animais por compartimentos e colocadas em tubos de 1,5 mL heparinizados e centrifugadas a 2000 x g por 5 min para a separação do plasma, sendo mantidas no freezer -20°C até a realização dos testes bioquímicos.

Para análise dos aminoácidos segundo Badaway e Morgan (2010), 500 µL do pool do plasma foi adicionado a 0,4 mL de água pura do MilliQ e precipitado com 0,1 mL de HClO₄ a 60%. O extrato foi agitado durante 10 segundos, decantado por 5min e depois centrifugado a 14.000 x g durante 10 min a 4°C. O sobrenadante foi retirado e acertado o volume original com tampão

acetato 10 mM pH=4,5. O material extraído foi filtrado em seringa com filtro millipore 45 µm e 25 µm. Vinte microlitros foram injetados no equipamento de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC).

O HPLC é da marca YL-9300 acoplado a detector UV, comprimento de onda 254 nm e com torre para manutenção de temperatura (27-30°C) para coluna C18 marca Luna, fase reversa de tamanho de 25 cm x 4,5 mm. Trata-se de um equipamento de alta sensibilidade e eficiência. A separação dos aminoácidos foi feita em fase móvel com tampão acetato de sódio 10 mM com água milliq (A) e acetonitrila (B) com o seguinte programa: 0-1 min (80% A e 20% B); 1,01-1,5 min (95% A e 5% B); 1,51-8 min (96% A e 4% B); 8,01-8,2 min (80% A e 20% B). A vazão foi de 1 mL/min sendo os picos detectados a 254 nm.

Os aminoácidos padrões utilizados foram Arginina - Arg (10 mM), Alanina - Ala (10 mM), Fenilalanina - Phe (10 mM), Triptofano - Trp (20 mM), Metionina - Met (10 mM), Prolina - Pro (10 mM), Valina - Val (10 mM), Tirosina - Tyr (10 mM), e Isoleucina - Ile (10 mM) da Sigma e Merck. Todas as amostras de plasma e os padrões foram avaliados pelos picos de saída na separação do HPLC e correlacionados com o tempo de retenção (Rt) confirmados pelo software Clarity Chromatography Software (Data Apex®), acoplado ao HPLC.

2.5 Análises dos compostos bioquímicos do fígado

Após a extração de sangue os mesmos cinco animais de cada tratamento foram eutanasiados em solução de eugenol (875 µL), álcool (3 mL) e água destilada (125 mL) para a retirada do fígado, o qual foi pesado, fotografado e posteriormente congelado para se realizar a quantificação de proteína, fenóis e peroxidase. Posteriormente foram triturados em almofariz e pistilo com tampão fosfato pH = 7 - 0,1 mol/L, na concentração de g/mL. O extrato foi filtrado em gaze e analisado imediatamente.

A quantificação de proteínas foi realizada de acordo com o método de Lowry, expressa em mg SAB mL⁻¹ (SAB = Soro-Albumina Bovina) presente em 1 g de fígado. A quantificação de fenóis foi realizada através do reativo de Folin-Ciocalteu, expressa em mg ácido clorogênico presente em 1 g de fígado. A atividade da peroxidase foi determinada medindo-se a variação de absorbância do tetraguaiacol formado na reação enzimática com comprimento de onda de 470 nm. A absorbância foi lida por um espectrofotômetro computadorizado em 4 min e a atividade específica foi expressa como nKat mgSAB-1g⁻¹ de amostra. Estes métodos são clássicos e descritos na literatura e recentemente utilizados por Mascaro et al. (2014), Bach et al. (2018) e Luquis et al. (2021).

2.6 Análise dos resultados

A taxa de evasão de organismos em cada concentração/tratamento foi calculada com

base na proporção média entre o número de evitadores e o número esperado de organismos, multiplicado por 100 (Moreira-Santos et al., 2008, Silva & Gestel, 2009 e Vera-Vera et al., 2021). Segundo Vera-Vera et al (2021), organismos expostos são aqueles inicialmente colocados em cada compartimento, tendo em conta que todos os compartimentos devem ter a mesma quantidade de organismos depositados. organismos registrados corresponde ao registro da posição dos organismos em cada compartimento após a contagem em determinado tempo e, organismos esperados (N_e) representam o número total de organismos expostos no compartimento, mais aqueles organismos que devem vir dos compartimentos adjacentes com concentração mais elevada. Essa consideração é feita para todos os compartimentos, esperando que todos os organismos migrem em direção ao controle. Para o cálculo dos organismos observados (N_o), mantém-se o princípio descrito acima para os organismos esperados, onde são considerados os organismos registrados no compartimento (X), mais aqueles registrados no compartimento adjacente mais contaminado. Para calcular o número de evitadores e taxa de evasão, foram utilizadas as fórmulas propostas por esses autores:

$$\text{Evitadores} = N_e - N_o$$

$$\text{Taxa de Evasão (\%IN)} = [Evitadores / N_e] \times 100$$

Onde:

N_e = Organismos esperados.

N_o = Organismos observados.

Para determinar diferenças estatisticamente significativas na distribuição de organismos entre os compartimentos (*i.e.* preferência), foi utilizada uma ANOVA two-way de medida repetida considerando os tempos (1-12 h) e os compartimentos (1= controle até 7= 20.000 µg/L) com as diferentes concentrações como efeitos fixos. Todos os dados em % foram transformados em $\arcsen\sqrt{x/100}$ antes da análise e os assuntos de normalidade e esfericidade foram verificados respectivamente através do Normal Probability Plot do resíduo e pelo teste de Mauchly. Quando diferenças significativas foram reveladas foi aplicado o teste *a posteriori* de Tukey.

3. Resultados

Não houve mortalidade durante o período de aclimação e nem durante o teste de evitamento. Os parâmetros físicos e químicos monitorados da água apresentaram os seguintes resultados: Temperatura ambiente: 22,43 °C ± 0,90; Temperatura da água: 22,18 °C ± 0,36; Oxigênio dissolvido: 3,88 mg/L ± 0,65 e; pH: 5,72 ± 0,60.

Comparando as concentrações nominais e efetivas na hora zero (0h) verificamos uma

boa precisão com variações entre 3 a 11%. Os resultados da concentração efetiva realizada no início da experimentação encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Concentração nominal e efetiva de atrazina (ATANOR 50 SC®) quantificada no início da experimentação (0 h), para realização do teste de evitamento/fuga com girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*).

COMPARTIMENTOS	CONCENTRAÇÕES NOMINAIS (µg/L)	CONCENTRAÇÕES EFETIVAS (µg/L)
1	Controle	0
2	1	0,92
3	2	1,78
4	20	19
5	200	194
6	2000	1940
7	20000	19580

O resultado da ANOVA de medida repetida mostra que existe um efeito do tratamento ($F=2,89$; $p<0,032$) na distribuição dos girinos, mas não das horas e nem do efeito combinado entre tratamentos e horas (interação). A normalidade dos resíduos e o teste de esfericidade foram atendidos permitindo a prossecução da análise para verificar quais compartimentos eram diferentes. O teste de comparação múltipla de Tukey mostrou que somente a média da distribuição dos organismos do controle é estatisticamente diferente do tratamento com a concentração de 20.000 µg/L de ATZ (Figura 2)

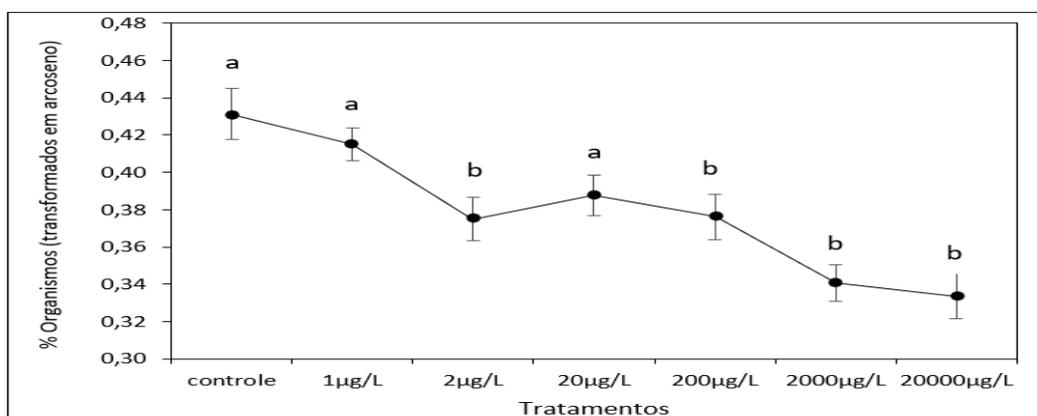


Figura 2 - Distribuição dos girinos de *Lithobates catesbeianus* expostos a diferentes concentrações de atrazina (ATANOR 50 SC®), durante o Teste de Evitamento. As barras verticais indicam o Desvio Padrão. Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes $p<0,5$ na percentagem de distribuição dos organismos.

A distribuição da porcentagem de organismos ao longo do tempo pode ser melhor apreciada na Figura 3, onde os gráficos de box-whisker plot mostram o deslocamento dos girinos de todas as réplicas nos compartimentos controle e de maior concentração de ATZ (20.000 µg/L). A linha tracejada indica a distribuição da porcentagem dos organismos na hora 0 quando o número de girinos era igual em todos os compartimentos. Distribuições acima da linha tracejada indicam “imigração” (chegada) de indivíduos ao compartimento enquanto aquelas abaixo indicam “emigração” (fuga) do compartimento.

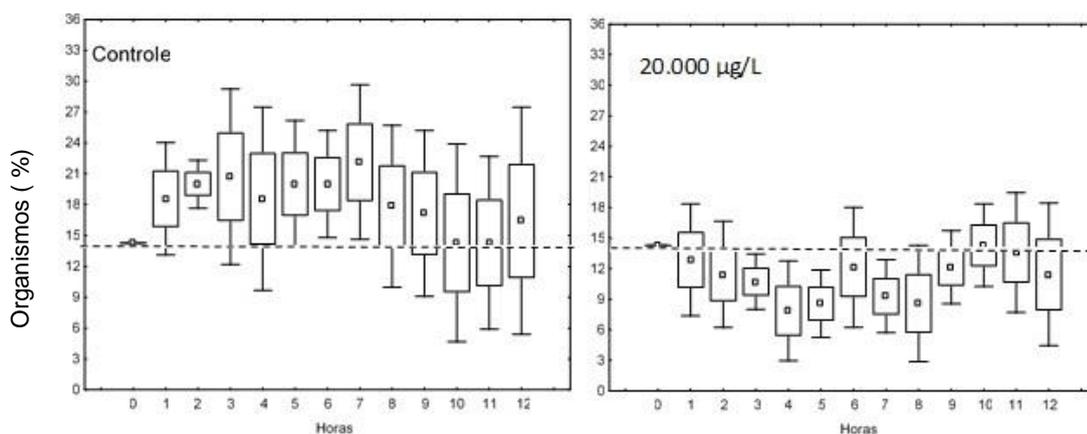


Figura 3 – Média e o erro padrão da média para os compartimentos controle e mais alta concentração (20.000 µg/L), evidenciando o efeito do tempo na movimentação dos animais durante o teste de evitamento feito com girinos de *Lithobates catesbeianus* expostos a atrazina (ATANOR 50 SC®). A linha tracejada indica a porcentagem (%) de distribuição dos organismos no início do experimento (0 h) para os dois tratamentos.

Embora, não haja diferenças estatisticamente significativas entre as horas no teste evitamento/fuga, desagregando a porcentagem de deslocamento dos girinos no controle e na concentração de 20.000 µg/L em intervalos de 3 h, podemos observar maior movimentação desses organismos nas primeiras horas após o início do experimento, sinalizado pela diminuição da porcentagem de animais até 3 h no compartimento de 20.000 µg/L, e pelo consequente aumento das presenças no compartimento do controle. Entre a 4ª e 6ª h ocorreram várias movimentações entre os dois compartimentos. A partir da 7ª h observa-se uma tendência a estabilização dos deslocamentos, que voltam a igualar os valores iniciais do experimento, representados pela linha tracejada, somente em correspondência da 10ª e 11ª hora (Figura 4).

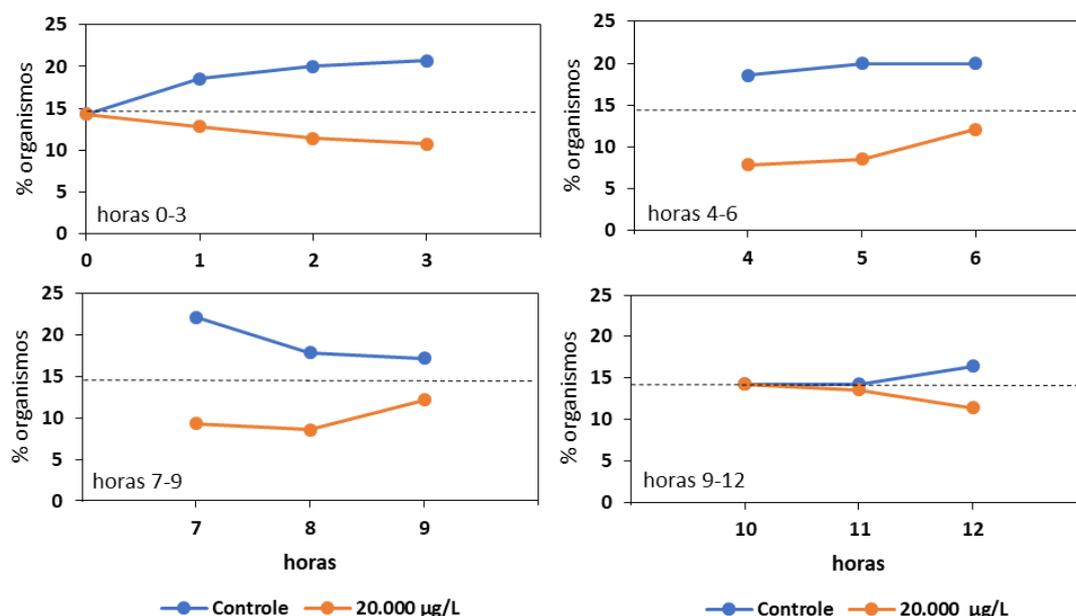


Figura 4 – Deslocamento dos indivíduos (*Lithobates catesbeianus*) expostos a atrazina (ATANOR 50 SC®), durante o teste de evitamento, ao longo do tempo no compartimento Controle e de 20.000 µg/L. A linha tracejada corresponde a hora 0, antecedente a abertura da comunicação entre os compartimentos quando o número de organismos era igual em todos eles. Porcentagem - %

O número de Evitadores e a Taxa de Evasão (% IN) assim como o registro dos organismos em números absolutos em cada compartimento encontram-se nas planilhas de material suplementar.

Após 12 h os compartimentos dos SLMs foram fechados e os girinos permaneceram expostos as diferentes concentrações de ATZ por mais 36 h, totalizando 48 h de exposição. Neste momento, as concentrações efetivas foram novamente quantificadas e evidenciamos que houve mistura das soluções ao longo dos compartimentos. Isto explica o fato dos organismos terem evitado as mais altas concentrações em um primeiro momento (primeiras 3 h) deixando de evitar tanto nas horas subsequentes. Assumimos que a mistura foi gradual ao longo das 12 primeiras horas e após o fechamento do sistema obtivemos os seguintes resultados: Controle (com mistura de ATZ) - 1610; 1 - 1819; 2 - 2201; 20 - 2832; 200 - 2776; 2.000 - 3684; 20.000 - 4389 µg/L de ATZ.

Cinco organismos de cada compartimento/tratamento foram utilizados para os testes bioquímicos. Para atender o princípio dos 3 R's (*Replace, Reduction and Refinement*) e as diretrizes da Toxicologia para o século XIX, que preconizam evitar sempre que possível o sofrimento aos animais, eutanasiámos um reduzido número de organismos e utilizamos um equipamento de altíssima sensibilidade (HPLC - YL-9300®). Por esta razão as amostras para

as análises bioquímicas foram avaliadas em pool e a leitura feita em duplicata. A Tabela 2 apresenta o perfil de aminoácidos encontrados no plasma sanguíneo, antes (Momento Zero) e após a exposição à ATZ (48 h).

Tabela 2 - Perfil de aminoácidos encontrados no plasma de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) expostos a diferentes concentrações de atrazina (ATANOR 50 SC®), quantificados no Momento Zero (antes da experimentação) e após 48 h de exposição. Separação realizada por HPLC. (pool de 5 animais).

Aminoácidos	TR	MZ	CN	1	2	20	200	2000	20000
				µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L
Arginina	1,41	150,19	91,18	192,62	136,57	112,96	89,13	81,82	79,80
Isoleucina	1,91	23,41	13,62	16,00	22,79	18,46	10,74	11,26	11,55
Alanina	2,21	40,01	37,33	38,80	41,45	39,07	35,40	35,76	29,10
Fenilalanina	2,35	0,41	0,42	0,38	0,54	0,44	0,38	0,30	0,50

TR - Tempo de retenção. Concentração em mMol. MZ - Momento Zero. CN - Controle negativo.

O resultado das análises de estresse oxidativo obtidas a partir das amostras de fígado nas mesmas condições encontram-se nas Figuras 5 e 6.

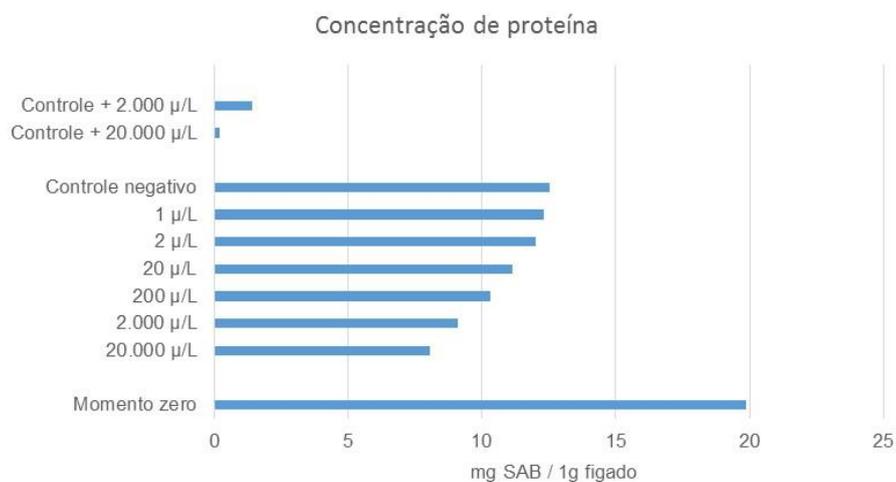


Figura 5 - Concentração de proteínas do fígado de girino de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) em diferentes concentrações de atrazina (ATANOR 50 SC®), após 48 h de exposição. SAB - soro albumina bovina. Controle + = Controle positivo.

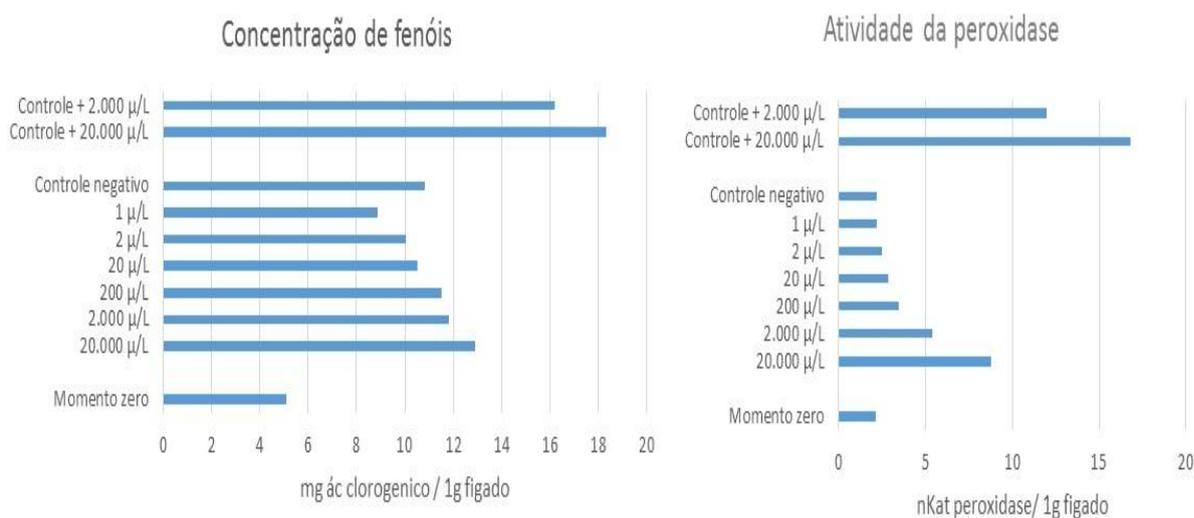


Figura 6 – Concentração de fenóis e atividade da peroxidase no fígado de girino de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) em diferentes concentrações de atrazina (ATANOR 50 SC®), após 48 h de exposição. nKat - número de nanomols de substrato transformado por 50 microlitros por segundo em pH e temperatura padronizado. Controle + = Controle positivo.

Observamos que a quantidade de proteína no Momento Zero (antes da exposição) foi de 20 mg SAB / 1g de fígado e diminuiu proporcionalmente com o aumento das concentrações de ATZ, que as 48 h de exposição já haviam se misturado. A degradação foi mais intensa nos controles positivo onde os animais ficaram continuamente expostos em aquários por 48 h. Em consequência da degradação de proteínas temos o aumento da concentração de fenóis e da atividade da peroxidase, que por sua vez foi menor no Momento Zero e expressiva nos controles positivo.

4. Discussão

Vários parâmetros estão conduzindo ao declínio global de anfíbios, incluindo doenças, diminuição e fragmentação de habitats, exposição a pesticidas e mudanças climáticas (Cushman, 2006; Wake, 2012). O impacto dos pesticidas na saúde desses vertebrados está entre os fatores menos compreendidos nesta perda e classicamente descritos por Blaustein e Johnson (2003) como sendo uma das causas que afetam diretamente o desenvolvimento, reprodução, e sobrevivência das populações de anfíbios ao redor do mundo, mas existe espaço e necessidades de estudos que elucidem estes problemas (Orton e Tyler, 2015, Snyder et al., 2017).

Neste estudo, avaliamos a sensibilidade e os possíveis efeitos tóxicos da ATZ sobre anuros utilizando girinos de rãs-touro em testes de evitamento/fuga. Adicionalmente, realizamos algumas análises bioquímicas no sangue e no fígado para elucidar os resultados.

No teste de evitamento foi possível observar a movimentação dos organismos nas três primeiras horas do experimento, evitando as mais altas concentrações de ATZ. Esta é uma evidência de que na natureza os organismos seriam capazes de evitar os ambientes contaminados por um determinado período nas maiores concentrações de ATZ. Resultados semelhantes foram encontrados por Araújo et al. (2014c) trabalhando com o fungicida pyrimethanil, por Vasconcelos et al. (2016) trabalhando com abamectina, por Araújo et al. (2014b) trabalhando com cobre, por Liu et al. (2016) e Araújo et al. (2018b) avaliando a relação evasão e barreira química provocada por ATZ evitando migração no ambiente. Araújo et al. (2014b) afirmam que o evitamento foi uma resposta sensível de algumas espécies de anfíbios (*Leptodactylus latrans*, *L. catesbeianus*, e *Pelophylax perezi*,) para evitar a mortalidade e que, a resposta de evitação desempenha um papel fundamental para diminuir a mortalidade e o declínio da população.

Por outro lado, acreditamos que em função do tamanho dos animais, principalmente pelo tipo de natação e cauda dos girinos de *L. catesbeianus*, além das características de alta solubilidade do produto utilizado em nosso estudo com ATZ, houve grande mistura das concentrações iniciais, e que a partir de 3 h as características do sistema foram alteradas. Araújo et al. (2014a) estudando o evitamento de pirimetanil por *Danio rerio* já alertava para a possibilidade de mistura no sistema devido a movimentação dos peixes o que requer atenção especial por parte dos investigadores em relação ao tempo de resposta e estabilidade do gradiente no SLMs. Com base nos resultados do presente estudo, sugerimos que futuros teste de evitamento com anuros, principalmente aqueles realizados com animais com mais de 3g, sejam realizados com um período de exposição e intervalos de observações menores, talvez 6 h e 30 minutos, respectivamente. Esta sugestão é corroborada pelo estudo de Silva et al. (2018) que trabalharam com peixes reportando a eficiência de evitamento aos compartimentos contaminados com cobre com apenas 3 h de duração. Cabe lembrar que nossa opção inicial de mantermos os animais por um período maior de exposição ocorreu em função das análises bioquímicas de hepatotoxicidade, que auxiliariam na elucidação de dados controversos reportados para intoxicações com ATZ.

No presente estudo os resultados dos testes bioquímicos foram equivalentes as concentrações de ATZ, evidenciando alterações no perfil de aminoácidos e degradação de proteínas com consequente aumento dos níveis de fenóis e atividade da peroxidase.

A arginina, também conhecida como L-arginina é um aminoácido utilizado principalmente para produção de proteínas. Sendo um aminoácido essencial para peixes desempenha papéis importantes na fisiologia, desempenho do crescimento e na saúde destes

organismos (Wilson, 2002; Hoseini et al., 2020). A arginina em diferentes espécies possui papel modulador, em peixes este aminoácido está envolvido na produção de óxido nítrico (NO), síntese de poliaminas, respostas inflamatórias e imunes inatas (Zhou et al., 2015), auxiliando no aumento das taxas de insulina (Andoh, 2014), no hormônio do crescimento (GH) e outros fatores de crescimento relacionados à insulina 1 (IGF-1) (Wang et al., 2017) contribuindo para resposta ao estresse e produção de cortisol (Costas et al., 2013; Hoseini et al., 2020). Alanina e aspartato são importantes precursores da molécula de glicogênios sendo um aparato energético indispensável para os peixes. Além disso, o aspartato é essencial para produção de nucleotídeos de purina em todos os tipos celulares. Sendo que a alanina é um transportador importante de nitrogênio para o metabolismo de aminoácido entre os órgãos em peixes (Li et al., 2009). Leucina, Isoleucina e Valina possuem papéis importantes na regulação da homeostase energética, metabolismo nutricional, saúde intestinal, imunidade e doenças em humanos e animais. Como os mais abundantes dos aminoácidos essenciais, servem como substratos para a síntese de compostos nitrogenados, sinalização moléculas que regulam o metabolismo da glicose, lipídios, produção de proteínas e imunidade através de redes de sinalização, especialmente fosfoinositide 3-quinase/Sinal de AKT/alvo de mamífero de rapamicina (PI3K/AKT/mTOR) (Neinast et al., 2019; Coleman et al., 2020). A Fenilalanina é um aminoácido essencial que pode ser convertido em tirosina, que é um precursor da dopamina sendo os neurotransmissores responsáveis pelas respostas ao estresse em peixes (Saavedra et al., 2009), podendo ser utilizado como ansiolítico na piscicultura, sendo responsável pela regulação metabólica, crescimento e respostas ao estresse formando o neurotransmissor dopamina (Li et al., 2009, Calheiros et al., 2019).

Pouco se sabe ainda a respeito da real interferência dos pesticidas sobre a fisiologia destes aminoácidos, proteínas e lipídios e as consequências bioquímicas no desenvolvimento dos organismos aquáticos. Recentemente, Sena et al. (2021) trabalhando com *Xenopus leavis* expostos as concentrações de 200 e 500 µg/L de ATZ, concluíram que este pesticida também causou lesões graves hepática, renal e alterações dos níveis de aminoácidos (Alanina aminotransferase e creatinina) sugerindo intoxicação hepato-renal grave devido concentrações estudadas. Dornelles & Oliveira (2014) expondo girinos de *L. catesbeianus* a este pesticida encontraram aumento da peroxidase lipídica e degradação de proteínas, o que corrobora nossos resultados. Adesiyani et al. (2011) trabalhando com fígados de ratos intoxicados com ATZ demonstraram que este composto pode promover estresse oxidativo, aumentando a concentração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e produtos de danos oxidativos, tais como peróxidos de lipídios e malondialdeído e, conseqüentemente influenciando a atividade de

enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, glutathione peroxidase (GPx) e catalase. Zhu et al. (2009) concluíram que a ATZ induz estresse oxidativo e danos ao DNA em minhocas (*Eisenia foetida*). Jin et al. (2010) estudaram fêmeas de *D. rerio* expostas a ATZ, encontrando mudanças significativas nas atividades de enzimas antioxidantes e estresse oxidativo no fígado. Da mesma forma, demonstraram alteração significativas nos níveis de genes do mRNA, que codificam proteínas antioxidantes e proteínas da membrana interna mitocondrial relacionadas à produção de ROS (como Bcl-2 e Ucp-2). Dong, et al. (2009) utilizaram machos e fêmeas de *D. rerio* verificando efeitos tóxicos da ATZ no citocromo P450 microsomal do fígado, NADPH-P450 redutase, aminopirina N-desmetilase e eritromicina N-desmetilase.

Snyder et al. (2017) utilizando girinos de sapo americano (*Anaxyrus americanus*) e rã-cinza (*Hyla versicolor*) como ferramentas experimentais após exposição à ATZ por 48 h encontrou indícios de alterações metabólica nos parâmetros bioquímicos apresentando alterações em várias classes de macromoléculas biológicas, incluindo ácidos graxos, aminoácidos, nucleosídeos de purina, pirimidinas e monossacarídeos e dissacarídeos. Em sapo *Rhinella schneideri* os efeitos subletais induzidos, causaram anormalidades e alterações morfológicas na natação e no crescimento (Pérez-Iglesias et al., 2019). Rimayi et al. (2018) estudaram efeitos da exposição da ATZ em girinos e machos adultos de *Xenopus laevis*, encontrando alteração na massa, morfologia da mitocôndria, alterações bioquímicas e metabólicas. As análises da via metabólica são consistentes com os achados de outros estudos que demonstram a interrupção do metabolismo de aminoácidos e energia da exposição à ATZ a espécies não-alvo.

É certo que mesmo altas concentrações de ATZ da formulação comercial ATANOR 50 SC® não provocam efeitos agudos e imediatos a várias espécies de anfíbios. Isto já foi reportado por autores como Solomon et al. (2008) e Rutkoski et al. (2018). Entretanto, a possibilidade de escolha de um habitat não contaminado feita pelos organismos foi evidenciada nos testes comportamentais de evitamento/fuga. Posteriormente, quando houve mistura este pesticida impactou o metabolismo dos girinos, que desviaram sua energia para processos de desintoxicação, reparo de tecidos e restauração da homeostase. Desta forma, somos da opinião de que este herbicida precisa ser sim monitorado para não comprometer a comunidade aquática circundante.

5. Conclusão

Nossos resultados mostram que os girinos de rã-touro foram capazes de evitar locais com altas concentrações de ATZ nas primeiras horas de exposição, o que sugere que no

ambiente natural estes animais possam migrar ou evitar áreas contaminadas por este herbicida. A ATZ também provocou uma rápida e eficiente resposta metabólica dos animais expressando alterações no perfil de aminoácidos, degradação de proteínas e hepatotoxicidade.

6. Declaração de conflito de interesse

Os autores declaram não ter interesses financeiros ou ocorrências de interesse pessoais que possam interferir ou influenciar o desenvolvimento deste artigo.

7. Referências

- Adesiyan, A.C., Oyeloja, T.O., Abarikwu, S.O., Oyeyemi, M.O., Farombi, E.O., 2011. Selenium provides protection to the liver but not the reproductive organs in an atrazine-model of experimental toxicity. *Exp. Toxicol. Pathol.* 63, 201-207. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2009.11.008>
- Amaro, B.B.D.F., Correia, D.B., Freitas, R.A., Teixeira, P.H.R., Nascimento, C.A., Pereira, C.M., Silva, J.R.L., Silva, M.S.A., Cruz, G.V., Queiroz, M.B., Oliveira, J.P.C., Silva, R.A.R., Macedo, G.F., Kamdem, J.P., 2021. A Biossegurança no uso de agrotóxicos na percepção de agricultores do Distrito de Cuncas, Barro – Ceará: Saúde Física e Ambiental. *Res. Soc. Dev.* 10(1), e15610111644. <https://doi.org/10.33448/rsdv10i1.11644>
- Amiard-Triquet, C., 2009. Behavioral disturbances: the missing linking between suborganismal and supra-organismal responses to stress? Prospect based on aquatic research. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 15, 87–110. <http://doi.10.1080/10807030802615543>
- AmphibiaWeb. 2022. Disponível em: <<https://amphibiaweb.org>> University of California, Berkeley, CA, USA. Acesso em: 8 abr. 2022.
- Andoh, T., 2014. Stress inhibits insulin release induced by feeding and arginine injection in barfin flounder *Verasper moseri*. *Fish. Sci.* 80:311–316. <https://doi.org/10.1007/s12562-013-0689-3>
- Araújo, C.V.M., Blasco, J., 2019. Spatial avoidance as a response to contamination by aquatic organisms in nonforced, multicompartmented exposure systems: A complementary approach to the behavioral response. *Environ. Toxicol. Chem.* 38(2), 312–320. <https://doi.org/10.1002/etc.4310>
- Araújo, C.V.M., Blasco, J., Moreno-Garrido, I., 2012. Measuring the avoidance behaviour 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>
- Araújo, C.V.M., Griffith D.M., Vera-Vera, V.C., Jentzsch, P.V., Cervera, L., Nieto-Ariza, B., Salvatierra, D., Erazo, S., Jaramillo, R., Ramos, L.A., Moreira-Santos, M., Ribeiro, R., 2018a. A novel approach to assessing environmental disturbance based on habitat selection by zebra fish as a model organism. *Sci. Total Environ.* 620, 906-915. <https://doi.10.1016/j.scitotenv.2017.11.170>

- Araújo, C.V.M., Moreira-Santos, M., Ribeiro, R., 2016. Active and passive spatial avoidance by aquatic organisms from environmental stressors: A complementary perspective and a critical review. *Environ. Int.* 92-93, 405-415. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2016.04.031>
- Araújo, C.V.M., Shinn, C., Mendes, L.B., Delello-Schneider, D., Sanchez, A.L., Espindola, E.L.G., 2014a. Avoidance response of *Danio rerio* to a fungicide in a linear contamination gradient. *Sci. Total Environ.* 484, 36-42. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.03.037>
- Araújo, C.V.M., Shinn, C., Moreira-Santos, M., Lopes, I., Espíndola, E. L.G., Ribeiro, R., 2014b. Copper-driven avoidance and mortality in temperate and tropical tadpoles. *Aquat. Toxicol.* 146, 70-74. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.10.030>
- Araújo, C.V.M., Shinn, C., Vasconcelos, A.M., Ribeiro, R., Espidola, E.L., 2014c. Preference and avoidance responses by tadpoles: the fungicide pyrimethanil as habitats disturber. *Ecotoxicology* 23, 851-860. <https://doi.org/10.1007/s10646-014-1225-7>
- Araújo, C.V.M., Silva, D.C.V.R., Gomes, L.E.T. Acayaba, R.D., Montagner, C.C., Moreira-Santos, M., Ribeiro, R., Pompêo, M.L.M., 2018b. Habitat fragmentation caused by contaminants: Atrazine as a chemical barrier isolating fish populations. *Chemosphere* 193, 24-31. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.11.014>
- Bach, E.E., Hi, E.M.B., Martins, A.M.C., Nascimento, P.A.M., Wadt, N.S.Y., 2018. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of *Ganoderma lucidum* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Medicines*. 5(3), 78. <https://doi.org/10.3390/medicines5030078>
- Badawy, A.A-B., Morgan, C.J. 2010. Rapid isocratic liquid chromatographic separation and quantification of tryptophan and six kynurenine metabolites in biological samples with ultraviolet and fluorimetric detection. *Int. J. Tryptophan Res.* 3, 175-186. <https://doi.org/10.4137/IJTR.S6225>
- Blasco, J., Araújo, C.V.M., Ribeiro, R., Moreira-Santos, M., 2020. Do contaminants influence the spatial distribution of aquatic species? how new perspectives on ecotoxicological assays might answer this question. *Environ. Toxicol. Chem.* 39(1), 7-8. <https://doi.org/10.1002/etc.4594>
- Blaustein, A.R., Johnson, P.T.J., 2003. The complexity of deformed amphibians. *Front. Ecol. Environ.* 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)
- Borras, N., Oliver, R., Arias, C., Crillas, E., 2010. Degradation of atrazine by electrochemical advanced oxidation process using a boron-doped diamond anode. *J. Phys. Chem.* 114, 6613-6621. <https://doi.org/10.1021/jp1035647>
- Brasil. 2022. Ibama - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente. Disponível em: <http://ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#> Acesso em: 22 mai. 2021.
- Calheiros, A.C., Reis, R.P., Castelar, B., Cavalcanti, D.N., Teixeira, V.L. 2019. *Ulva* spp. as a natural source of phenylalanine and tryptophan to be used as anxiolytics in fish farming. *Aquac.* 509, 171-177. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.05.028>
- Cleary, A.J., Tillit, D.E., Sall, F.S.V., Nicks, D.K., Claunch, A.R., Bhandari, R.K., 2019. Atrazine

- induced transgenerational reproductive effects in medaka (*Oryzias latipes*). Environ. Pollut. 251, 639-650. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.05.013>
- Coady, K.K., Murphy, M.B., Villeneuve, D.L., Hecker, M., Jones, P.D., Carr, J.A., Solomon, K.R., Smith, E.E., Van Der Kraak, G., Kendall, R.J., Giesy, J.P., 2005. Effects of atrazine on metamorphosis, growth, laryngeal and gonadal development, aromatase activity, and sex steroid concentrations in *Xenopus laevis*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 62, 160-173. <https://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.10.010>
- Coleman, D.N., Lopreato, V., Alharthi, A., Loor, J. 2020. Amino acids and the regulation of oxidative stress and immune function in dairy cattle. J. Anim. Sci. Vol. 98, No. Suppl. 1, S175-S193. <https://doi.org/10.1093/jas/skaa138>
- Costas, B., Rego, P., Conceição L., Dias, J., Afonso, A. 2013. Dietary arginine supplementation decreases plasma cortisol levels and modulates immune mechanisms in chronically stressed turbot (*Scophthalmus maximus*). Aquac. Nutr. 19: 25-38. <https://doi.org.ez87.periodicos.capes.gov.br/10.1111/anu.12086>
- Cushman, S.A., 2006. Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: a review and prospectus. Biol. Conserv. 128 (2), 231-240. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.09.031>
- Dellamatrice, P.M., Monteiro, R.T., 2014. Principais aspectos da poluição de rios brasileiros por pesticidas. Braz. Journal. of Agric. and Environ. Engine. 18 (12). <https://doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v18n12p1296-1301>
- Dong, X., Zhu, L., Wang, J., Jun, Wang., Xie, H., Hou, X., Jia, W., 2009. Effects of atrazine on cytochrome P450 enzymes of zebrafish (*Danio rerio*). Chemosphere 77, 404-412. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.06.052>
- Dornalles, M.F., Oliveira, G.T., 2014. Effect of atrazine, glyphosate and quinclorac on biochemical parameters, lipid peroxidation and survival in bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 66, 415-429. <https://doi.org/10.1007/s00244-013-9967-4>
- Douglass, J.F., Radosevich, M., Tuovinen, O.H., 2014. Mineralization of atrazine in the river water intake and sediments of a constructed flow-through wetland. Ecol. Eng. 72, 35-39. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.08.016>
- Efsa-European food safety authority, 2013. Guidance on tiered risk assessment for plant protection products for aquatic organisms in the edge-of-field surface waters. EFSA Journal 11, 3290. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3290>
- Epa-environmental protection agency united states, USA., 1996. Government. Method 3510 C Separatory funnel liquid-liquid extraction, Revision 3, 6, 8p. Disponível em: <<https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-12/documents/3510c.pdf>> Acesso: 12 jan. 2022.
- Ganeshwade, R.M., 2012. Biochemical changes induced by dimethoate (Rogor 30 % EC) in the gills of freshwater fish *Puntius ticto* (Hamilton). J. Ecol. Nat. Environ. 4, 181-185. <https://dx.doi.org/10.5897/JENE11.134>
- García-Santos, G., Keller-Forrer, K., 2011. Avoidance behaviour of *Eisenia fetida* to carbofuran,

- chlorpyrifos, mancozeb and metamidophos in natural soils from the highlands of Colombia. *Chemosphere* 84, 651-656. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.03.036>
- Gonçalves, M.W., Campos, C.B.M., Batista, V.G., Cruz, A.D., Junior, P.M., Bastos, R.P. Melo e Silva, D., 2017. Genotoxic and mutagenic effects of Atrazine Atanor 50 SC on *Dendropsophus minutus* Peters, 1872 (Anura: Hylidae) developmental larval stages. *Chemosphere* 182, 730-737. <https://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.078>
- Gosner, K.L., 1960. A simplified table for standing anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* 6, 183-90. <https://doi.org/10.2307/3890061>
- Halliwell, B., Whiteman, M. 2004. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 142(2): 231-55. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705776>
- Hammond, J.I., Jones, D.K., Stephens, P.R., Relyea, R.A., 2012. Phylogeny meets ecotoxicology: evolutionary patterns of sensitivity to a common insecticide. *Ecol. Appl.* 5, 593-606. <https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2011.00237.x>
- Hellou, J., 2011. Behavioral ecotoxicology, an “early warning” signal to assess environmental quality. *Environ. Sci. Pollut.* 18, 1-11. <https://doi.org/10.1007/s11356-010-0367-2>
- Hoseini, S.M., Khan, M.A., Yousefi, M., Costas, B. 2020. Roles of arginine in fish nutrition and health: insights for future research. *Rev. Aquac.* 1-18. <https://doi.org/ez87.periodicos.capes.gov.br/10.1111/raq.12424>
- Jin, Y., Zhang, X., Shu, L., Chen, L., Sun, L., Qian, H., 2010. Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposure in adult female zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 78 (7), 846-852. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.11.044>
- Kanissery, R.G., Sims, G.K., 2011. Biostimulation for the Enhanced Degradation of Herbicides in Soil. *Appl Environ Soil Sci* 2011, Article ID 843450, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2011/843450>
- Li, P., Mai, K.S., Trushenski, J., Wu, G.Y. 2009. New developments in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds. *Amino Acids* 37: 43-53. <https://doi.org/10.1007/s00726-008-0171-1>
- Liu, Z., Wang, Y., Zhu, Z., Yang, E., Feng, X., Fu, Z., 2016. Atrazine and its main metabolites alter the locomotor activity of larval zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 148, 163-170. <https://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.01.007>
- Lopes, I., Baird, D.J., Ribeiro, R., 2004. Avoidance of copper contamination by field populations of *Daphnia longispina*. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 1702-1708. <https://doi.org/10.1897/03-231>
- Loughlin, C.M., Canosa, I.S., Silveyra, G.R., Greco, L.S.L., Rodriguez, E.M., 2016. Effects of atrazine on growth and sex differentiation, in juveniles of the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 131, 96-103. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.05.009>
- Luquis, F., Silva, A.A.O., Wadt, N.S.Y., Hi, E.M.B., Martins, A.M.C., Bach, E.E., 2021. Arctium

- lappa L.: Chemical composition, antioxidants, phytochemical compounds and use for healing activity. *South Flo. J. Dev.*, 2(2), 2063-2071. <https://doi.org/10.46932/sfjdv2n2-073>
- Machado, C.S., Fregonesi, B.M., Zagui, G.S., Martinis, B.S., Segura-Muñoz, S., 2018. Atrazine in river water: human health risk assessment by recreational exposure. *Environ. Dev. Sustain.* 7 36–46. <https://doi.org/10.19177/rgsa.v7e3201836-46>
- Mascaro, M.B., França, C.M., Esquerdo, K.F., Lara, M.A.N., Wadt, N.S.Y., Bach, E.E., 2014. Effects of Dietary Supplementation with *Agaricus sylvaticus* Schaeffer on Glycemia and Cholesterol after Streptozotocin-Induced Diabetes in Rats. *Evid.-Based Complementary Altern. Med.* Volume 2014. <https://dx.doi.org/10.1155/2014/107629>
- Matias, T.P., Braga, J.K., Brucha, G., 2019. Anaerobic biodegradation of atrazine under different redox conditions. *Int. J. Adv. Eng. Res. Sci.*, 6(10), 227–236. <https://doi.org/10.22161/ijaers.610.35>
- Matias, T.P., Braga, J.K., Damasceno, L.H.S., Brucha, G., 2021. Overview of atrazine biodegradation under different oxidation-reduction conditions. *Res., Soc. Dev*, v. 10, n. 8. <https://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i8.17689>
- Moreira-Santos, M., Donato, C., Lopes, I., Ribeiro, R., 2008. Avoidance tests with small fish: determination of the median avoidance concentration and of the lowest-observed-effect gradiente. *Environ. Toxicol. Chem.* 27(7), 1576–1582. <https://doi.org/10.1897/07-094.1>
- Neinast, M., D.M., Arany, Z. 2019. Branched chain amino acids. *Annu. Rev. Physiol.* 81:139–164. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-020518-114455>
- Orton, F., Tyler, C.R., 2015. Do hormone-modulating chemicals impact on reproduction and development of wild amphibians? *Biol. Rev.* 90 (4), 1100–1117. <https://doi.org/10.1111/brv.12147>
- Pan, Pesticide Action Network, 2021. <<http://pan-international.org/paninternational-consolidated-list-of-banned-pesticides/>>. Acesso em: 18 mai 2022.
- Papoulias, D.M, Tillit, D.E., Talykina, M.G., Whyte, J.J., Richter, C.A., 2014. Atrazine reduces reproduction in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat. Toxicol.* 154, 230–239. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.05.022>
- Pérez-Iglesias, J.M., Franco-Belussi, L., Natale, G.S., Oliveira, C., 2019. Biomarkers at different levels of organisation after atrazine formulation (SIPTRAN 500SC) exposure in *Rhinella schneideri* (Anura: Bufonidae) Neotropical tadpoles. *Environ. Pollut.* 244, 733–746. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.073>
- Rimayi, C., Odusanya D., Weiss, J.M., Boer, J., Chimuka, L., Mbajjorgu, F., 2018. Effects of environmentally relevant sub-chronic atrazine concentrations on African clawed frog (*Xenopus laevis*) survival, growth and male gonad development. *Aquat. Toxicol.* 199, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.03.028>
- Rojas, R., Morillo, J., Usero, J., Vanderlinden, E., El Bakouri, H., 2015. Adsorption Study of Low-Cost and Locally Available Organic Substances and a Soil to Remove Pesticides from Aqueous Solutions. *J. Hydrol.* 520, 461-472. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2014.10.046>

- Rosa, R., Materalski, P., Moreira-Santos, M., Sousa, J.P., Ribeiro, R., 2012. A scaled-up system to evaluate zooplankton spatial avoidance and the population immediate decline concentration. *Environ. Toxicol. Chem.* 31(6), 1301-1305. <https://doi.org/10.1002/etc.1813>
- Rutkoski, C.F.; Macagnan, N.; Kolcenti, C.; Vanzetto, G.V.; Sturza, P.F.; Hartmann, P.A.; Hartmann, M.T. 2018 Lethal and Sublethal Effects of the Herbicide Atrazine in the Early Stages of Development of *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae). *Arch. Environ Contam. Toxicol.* 74, 587–593. <https://doi.org/10.1007/s00244-017-0501-y>
- Saavedra, M., Barr, Y., Pousão-Ferreira, P., Helland, S., Yúfera, M., Dinis, M.T., Conceição, L.E.C. 2009. Supplementation of tryptophan and lysine in *Diplodus sargus* larval diet: effects on growth and skeletal deformities. *Aquac. Res.* 40, 1191–1201. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02219.x>
- Salaberria, I., Hansen, B.H, Asensio, V., Olsvik, P.A., Andersen, R.A., Jenssen, B.M. 2009. Effects of atrazine on hepatic metabolism and endocrine homeostasis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 234, 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.09.023>
- Santos, E.A., Cruz, C., Carraschi, S.P., Silva, M.J.R., Botelho, R.G., Velini, E.D., Pitelli, A.R., 2015. Atrazine levels in the Jaboticabal water stream (São Paulo State, Brazil) and its toxicological effects on the pacu fish *Piaractus mesopotamicus*. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* 66:73-82. <https://doi:10.1515/aiht-2015-66-2571>
- Schmidt, C.J., Dieter, J., Sampaio, S.C., ROSA, D.M., Sbizzaro, M., Suszek, F.L., Schmidt, A.O., 2021. Adsorption of atrazine for biochar corn straw in soil columns. *Res. Soc. Dev.* 10(15) 1-12. <https://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i15.22826>
- Sena, L., Asouzu Johnson, J., Nkomozepe, P., Mbajiorgu, E. F., 2021. Atrazine-Induced Hepato-renal Toxicity in Adult Male *Xenopus laevis* Frogs. *Appl. Sci.*, 11, 11776. <https://doi.org/10.3390/app112411776>
- Silva, D.C.V., Araújo, C.V.M., López-Doval, J.C., Neto, M.B., Silva, F.T., Paiva, T.C.B., Ponpêo, M.L.M., 2017. Potential effects of triclosan on spatial displacement and local population decline of the fish *Poecilia reticulata* using a non-forced system. *Chemosphere* 184, 329-336. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.06.002>
- Silva, D.C.V.R., Araújo, C.V.M., Marassi, R.J., Cardoso-Silva, S., Neto, M.B., Silva, G.C., Ribeiro, R., Silva, F.T., Paiva, T.C.B., Pompêo, M.L.M., 2018. Influence of interspecific interactions on avoidance response to contamination. *Sci. Total Environ.* 642, 824–831. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.127>
- Silva, P.M.C., Gestel, C.A.M. 2009. Comparative sensitivity of *Eisenia andrei* and *Perionyx excavatus* in earthworm avoidance tests using two soil types in the tropics. *Chemosphere* 77, 1609–1613. <https://doi:10.1016/j.chemosphere.2009.09.034>
- Snyder, M.N, Henderson, W.M. Glinski, A.D., Purecker, S.T., 2017. Biomarker analysis of American toad (*Anaxyrus americanus*) and greytree frog (*Hyla versicolor*) tadpoles following exposure to atrazine. *Aquat. Toxicol.* 182, 184–193. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.11.018>
- Solomon, K.R., Carr, J.A., Preez, L.H.D., Giesy, J.P., Kendall, R.J., Smith, E.E., Kraak, G.J.V.D.

- 2008 Effects of Atrazine on Fish, Amphibians, and Aquatic Reptiles: A Critical Review, Crit. Rev. Toxicol. 38(9), 721-772. <https://doi.org/10.1080/10408440802116496>
- Sounderraj, S.F.L., Sekhar, P., Kumar, P.S., Lesley, N., 2011. Effect of systemic pesticide phosphamidon on haematological aspects of common frog *Rana tigrina*. Int. J. Pharm. Biol. Sci. Arch. 2, 1776-1780.
- Stara, A., Kouba, A., Velisek, J., 2018. Biochemical and histological effects of subchronic exposure to atrazine in crayfish *Cherax destructor*. Chem. Biol. Interact. 291, 95-102. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.06.012>
- Tillitt, D.E., Papoulias, D.M., Whyte, J., Ritcher, C.A., 2010. Atrazine reduces reproduction in fathead minnow (*Pimephales promelas*). Aquat. Toxicol. 99, 149-159. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.04.011>
- U.S. Environmental protection agency (USEPA), 2016. Refined Ecological Risk Assessment for Atrazine. Environmental Fate and Effects Division, OPP. Disponível em <https://www.biologicaldiversity.org/campaigns/pesticides_reduction/pdfs/AtrazinePreliminaryERA.pdf> Acesso: 03 jan. 2022
- U.S. Environmental Protection Agency (USEPA). 2004. Overview of the ecological risk assessment process in the Office of Pesticide Programs. U.S. Environmental Protection Agency, US EPA, Washington, USA. Disponível em: <<https://www.epa.gov/sites/default/files/2014-11/documents/ecorisk-overview.pdf>> Acesso: 08 jan. 2022
- Vasconcelos, A.M., Daam, M.A., Santos, L.R.A., Sanches, A.L.M., Araújo, C.V.M., Espindola, E.L.G., 2016. Acute and chronic sensitivity, avoidance behavior and sensitive life stages of bullfrog tadpoles exposed to the biopesticide abamectin. Ecotoxicology 25, 500-509. <https://doi.org/10.1007/s10646-015-1608-4>
- Vera-Vera, V., Cedeño-Macías, L., Macías-Mayorga, D. Blasco, J., Santos-Moreira, M. Ribeiro, R., Araújo, C.V.M., 2021. Métodos de exposición no forzada en sistemas multi-compartimentados para incluir la selección de hábitat como respuesta a la contaminación. In: Recurso água: Tecnologia e Pesquisas para o uso e conservação de Ecossistemas Aquáticos. 1º ed. São Carlos, SP. Editora Cubo. E-book. 2021. <https://doi.org/10.4322/978-65-86819-07-6>
- Wake, D.B., 2012. Facing extinction in real time. Science 335 (6072), 1052-1053. <https://doi.org/10.1126/science.1218364>
- Wang, L., Wu, J., Ca, W., Li, J., Zhao, Z., Luo, L. 2017. Dietary arginine requirement of juvenile hybrid sturgeon (*Acipenser schrenckii*♀ x *Acipenser baerii*♂). Aquac. Res. 48, 5193-5201. <https://doi-org.ez87.periodicos.capes.gov.br/10.1111/are.13331>
- Wilson, R.P. 2002. Amino acids and proteins. In: Halver, J., Hardy, R.W. (eds) Fish Nutrition, pp. 143-179. Academic Press, New York, NY.
- Zhou, Q., Jin, M., Elmada, Z.C., Liang, X., Mai, K. 2015. Growth, immune response and resistance to *Aeromonas hydrophila* of juvenile yellow catfish, *Pelteobagrus fulvidraco*, fed diets with different arginine levels. Aquaculture 437, 84-91. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.11.030>

Anexo I



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO – SP
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE PESCA
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL



CERTIFICADO

CERTIFICAMOS QUE O PROTOCOLO DE NÚMERO 03/2021 DO TRABALHO DE PESQUISA INTITULADO " AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE GIRINOS DE RÁ-TOURO, (*Lithobates catesbeianus*) AO HERBICIDA ATRAZINA (ATANOR 50 SC®) ATRAVÉS DE TESTES DE EVITAMENTO E ESTRESSE OXIDATIVO. SOB RESPONSABILIDADE DA PQC CLAUDIA MARIS FERREIRA, MOSTÉRIO, ESTÁ DE ACORDO COM OS PRINCÍPIOS ÉTICOS NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL ADOTADO PELO COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (COBEA) E FOI APROVADO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL DO INSTITUTO DE PESCA (CEEAI^P), EM 30 DE DEZEMBRO DE 2021.

SÃO PAULO, 30 DE DEZEMBRO DE 2021

EDUARDO DE MEDEIROS FERRAZ
Presidente - CEEAI^P

COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL DO INSTITUTO DE PESCA
Av. Conselheiro Rodrigues Alves, 1252 - Vila Mariana, São Paulo - SP, 04014-002- São Paulo - SP
e-mail: ceesai@pesca.sp.gov.br / SITE: www.pesca.sp.gov.br

Figura 1 - Certificado de Experimentação animal.

Anexo II

Tabela I: Números de organismos encontrados em cada concentração por réplicas em porcentagem (%)

HORA	REPLICA	CONCENTRAÇÕES (µg/L) X % DE EVITAMENTO						
		CONTROLE	1	2	20	200	2.000	20.000
0	#1	14,3	14,3	14,3	14,3	14,3	14,3	14,3
	#2	14,3	14,3	14,3	14,3	14,3	14,3	14,3
	#3	14,3	14,3	14,3	14,3	14,3	14,3	14,3
	#4	14,3	14,3	14,3	14,3	14,3	14,3	14,3
1	#1	17,1	17,1	17,1	2,9	17,1	11,4	17,1
	#2	11,4	11,4	20,0	14,3	22,9	14,3	5,7
	#3	22,9	14,3	17,1	14,3	5,7	8,6	17,1
	#4	22,9	14,3	14,3	14,3	14,3	8,6	11,4
2	#1	20,0	14,3	17,1	11,4	17,1	5,7	14,3
	#2	20,0	11,4	5,7	22,9	20,0	14,3	5,7
	#3	17,1	22,9	8,6	20,0	8,6	5,7	17,1
	#4	22,9	22,9	20,0	11,4	5,7	8,6	8,6
3	#1	22,9	20,0	8,6	22,9	8,6	2,9	14,3
	#2	11,4	11,4	8,6	28,6	14,3	17,1	8,6
	#3	17,1	14,3	22,9	14,3	14,3	5,7	11,4
	#4	31,4	20,0	14,3	11,4	5,7	8,6	8,6
4	#1	28,6	17,1	8,6	5,7	8,6	22,9	8,6
	#2	8,6	11,4	17,1	14,3	20,0	14,3	14,3
	#3	14,3	20,0	8,6	8,6	25,7	17,1	5,7
	#4	22,9	14,3	20,0	11,4	20,0	8,6	2,9
5	#1	22,9	14,3	20,0	17,1	8,6	11,4	5,7
	#2	20,0	14,3	5,7	11,4	20,0	17,1	11,4
	#3	11,4	17,1	5,7	14,3	22,9	17,1	11,4
	#4	25,7	14,3	17,1	20,0	11,4	5,7	5,7
6	#1	14,3	20,0	20,0	8,6	17,1	2,9	17,1
	#2	25,7	22,9	8,6	14,3	17,1	2,9	8,6
	#3	17,1	8,6	17,1	5,7	22,9	11,4	17,1
	#4	22,9	17,1	17,1	11,4	11,4	14,3	5,7
7	#1	22,9	8,6	22,9	8,6	11,4	11,4	14,3
	#2	25,7	25,7	11,4	17,1	5,7	8,6	5,7
	#3	11,4	28,6	14,3	8,6	20,0	8,6	8,6
	#4	28,6	14,3	11,4	17,1	8,6	11,4	8,6
8	#1	22,9	11,4	14,3	17,1	14,3	8,6	11,4
	#2	14,3	17,1	20,0	20,0	14,3	14,3	0,0
	#3	8,6	17,1	11,4	11,4	31,4	8,6	11,4
	#4	25,7	25,7	5,7	11,4	11,4	8,6	11,4
9	#1	11,4	14,3	25,7	11,4	17,1	8,6	11,4
	#2	17,1	14,3	20,0	25,7	5,7	5,7	11,4
	#3	11,4	20,0	8,6	14,3	14,3	14,3	17,1
	#4	28,6	20,0	8,6	14,3	8,6	11,4	8,6
10	#1	8,6	8,6	22,9	11,4	14,3	20,0	14,3
	#2	8,6	17,1	11,4	28,6	14,3	8,6	11,4

	#3	11,4	20,0	8,6	8,6	17,1	14,3	20,0
	#4	28,6	20,0	8,6	11,4	8,6	11,4	11,4
11	#1	5,7	17,1	11,4	20,0	20,0	8,6	17,1
	#2	14,3	14,3	17,1	20,0	11,4	14,3	8,6
	#3	11,4	20,0	11,4	14,3	8,6	14,3	20,0
	#4	25,7	22,9	8,6	11,4	8,6	14,3	8,6
12	#1	5,7	14,3	17,1	22,9	5,7	17,1	17,1
	#2	17,1	14,3	8,6	22,9	22,9	11,4	2,9
	#3	11,4	14,3	14,3	14,3	8,6	20,0	17,1
	#4	31,4	14,3	8,6	14,3	8,6	14,3	8,6

Anexo III

Tabela II – Porcentagem de girinos por réplica por horas.

HORA	PLANILHA COM PORCENTAGEM DE INDIVDUOS EVITADOS NO SISTEMA						
	CONCENTRAÇÃO DE ATRAZINA X EVITAMENTO EM %						
	0	1	2	20	200	2000	20000
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	18,57	14,29	17,14	11,43	15,00	10,71	12,86
2	20,00	17,86	12,86	16,43	12,86	8,57	11,43
3	20,71	16,43	13,57	19,29	10,71	8,57	10,71
4	18,57	15,71	13,57	10,00	18,57	15,71	7,86
5	20,00	15,00	12,14	15,71	15,71	12,86	8,57
6	20,00	17,14	15,71	10,00	17,14	7,86	12,14
7	22,14	19,29	15,00	12,86	11,43	10,00	9,29
8	17,86	17,86	12,86	15,00	17,86	10,00	8,57
9	17,14	17,14	15,71	16,43	11,43	10,00	12,14
10	14,29	16,43	12,86	15,00	13,57	13,57	14,29
11	14,29	18,57	12,14	16,43	12,14	12,86	13,57
12	16,43	14,29	12,14	18,57	11,43	17,71	11,43

Anexo IV

Tabela III – Exemplo de cálculo utilizados na planilha do Excel para calcular a evasão.

Replicates	TIME: 60 min Concentrations (ug/L)							Total
	0	1	2	20	200	2000	20000	
#1	6	6	6	1	6	4	6	35
#2	4	4	7	5	8	5	2	35
#3	8	5	6	5	2	3	6	35
#4	8	5	5	5	5	3	4	35
Average	6,50	5,00	6,00	4,00	5,25	3,75	4,50	
SD	1,9	0,8	0,8	2,0	2,5	1,0	1,9	
In %	17,1	17,1	17,1	2,9	17,1	11,4	17,1	100
	11,4	11,4	20,0	14,3	22,9	14,3	5,7	100
	22,9	14,3	17,1	14,3	5,7	8,6	17,1	100
	22,9	14,3	14,3	14,3	14,3	8,6	11,4	100
Mean	18,57	14,29	17,14	11,43	15,00	10,71	12,86	14,29
SD	5,47	2,33	2,33	5,71	7,14	2,74	5,47	
Org. por compart. (inicial)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	
Compartimentos	1	2	3	4	5	6	7	
Org. esperados (por réplica)	35,0	30,0	25,0	20,0	15,0	10,0	5,0	
Experados (total)	140,0	120,0	100,0	80,0	60,0	40,0	20,0	
Org. observados #1	35,0	29,0	23,0	17,0	16,0	10,0	6,0	
Org. observados #2	35,0	31,0	27,0	20,0	15,0	7,0	2,0	
Org. observados #3	35,0	27,0	22,0	16,0	11,0	9,0	6,0	
Org. observados #4	35,0	27,0	22,0	17,0	12,0	7,0	4,0	
Obserados total	140,0	114,0	94,0	70,0	54,0	33,0	18,0	
Evitadores #1	0,0	1,0	2,0	3,0	-1,0	0,0	-1,0	
Evitadores #2	0,0	-1,0	-2,0	0,0	0,0	3,0	3,0	
Evitadores #3	0,0	3,0	3,0	4,0	4,0	1,0	-1,0	
Evitadores #4	0,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	1,0	
Evitadores (total)	0,0	6,0	6,0	10,0	6,0	7,0	2,0	
%Evitamento #1	0,0	3,3	8,0	15,0	-6,7	0,0	-20,0	
%Evitamento #2	0,0	-3,3	-8,0	0,0	0,0	30,0	60,0	
%Evitamento #3	0,0	10,0	12,0	20,0	26,7	10,0	-20,0	
%Evitamento #4	0,0	10,0	12,0	15,0	20,0	30,0	20,0	
%Evitamento (média)	0,0	5,0	6,0	12,5	10,0	17,5	10,0	
Desvio Padrão	0,0	6,4	9,5	8,7	15,9	15,0	38,3	
Coefficiente de variação	#DIV/0!	127,7	158,7	69,3	158,7	85,7	383,0	

Anexo V

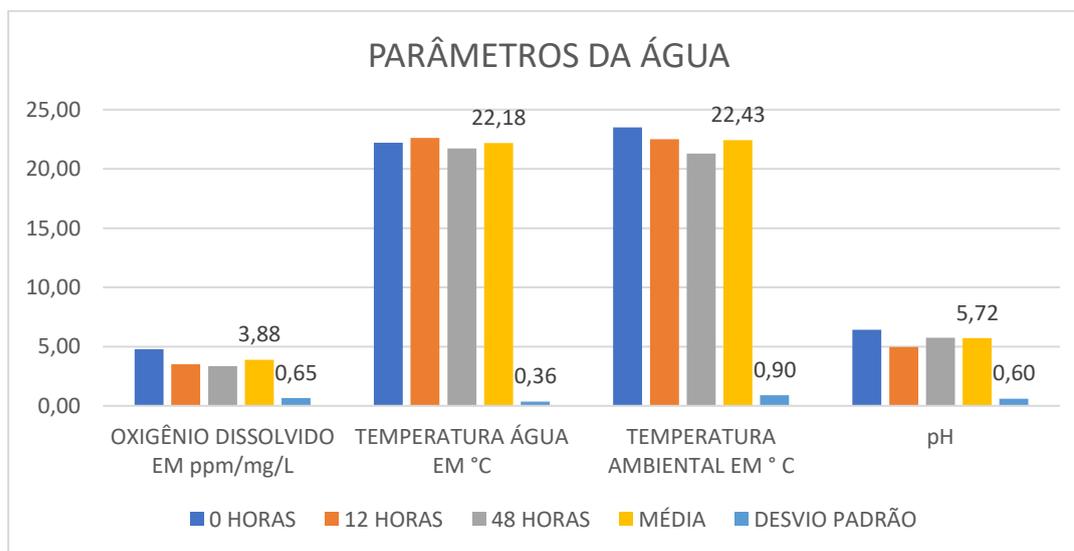


Figura 2 – Parâmetros da qualidade da água no tempo de exposição e experimentação.

Anexos IV – Fotos.

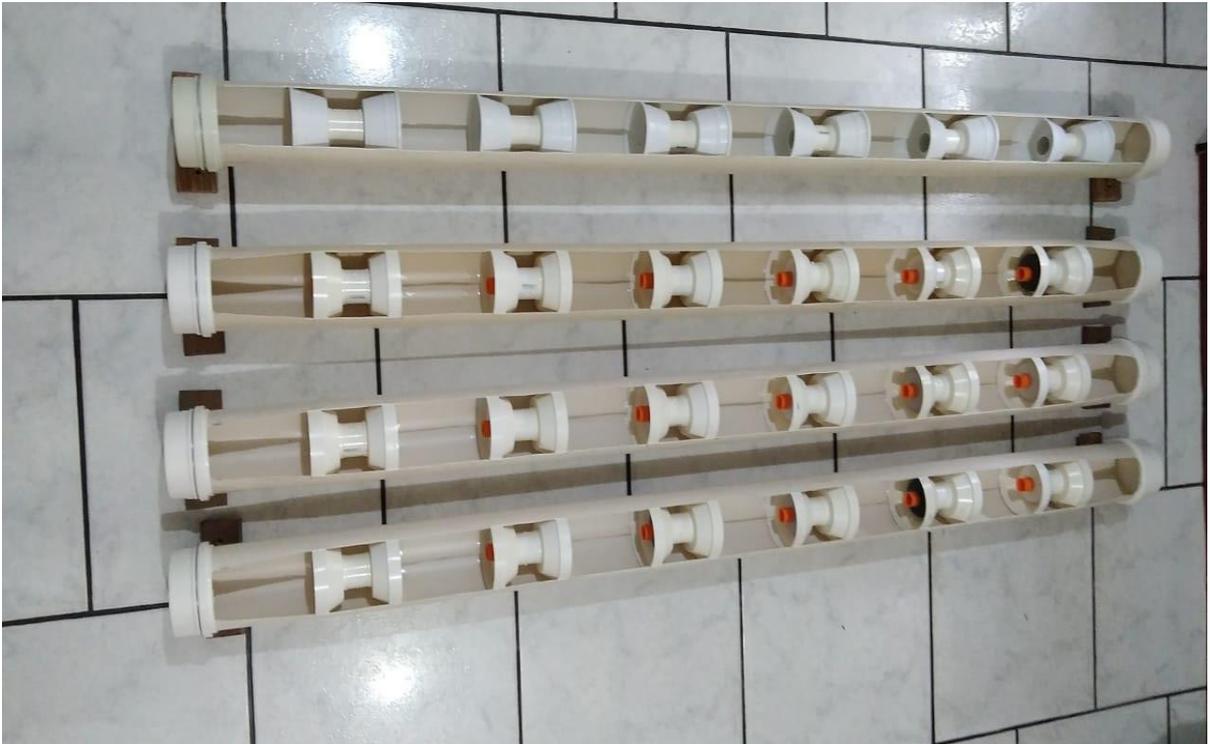


Figura 3 – Sistemas multicompartimentados utilizados nos testes de evitamento (4 réplicas com sete compartimentos cada).



Figura 4 – Sistemas multicompartimento em preparação para experimentação.



Figura 5 - Aclimação dos girinos de *Lithobates catesbeianus* no Laboratório do Instituto de Pesca.

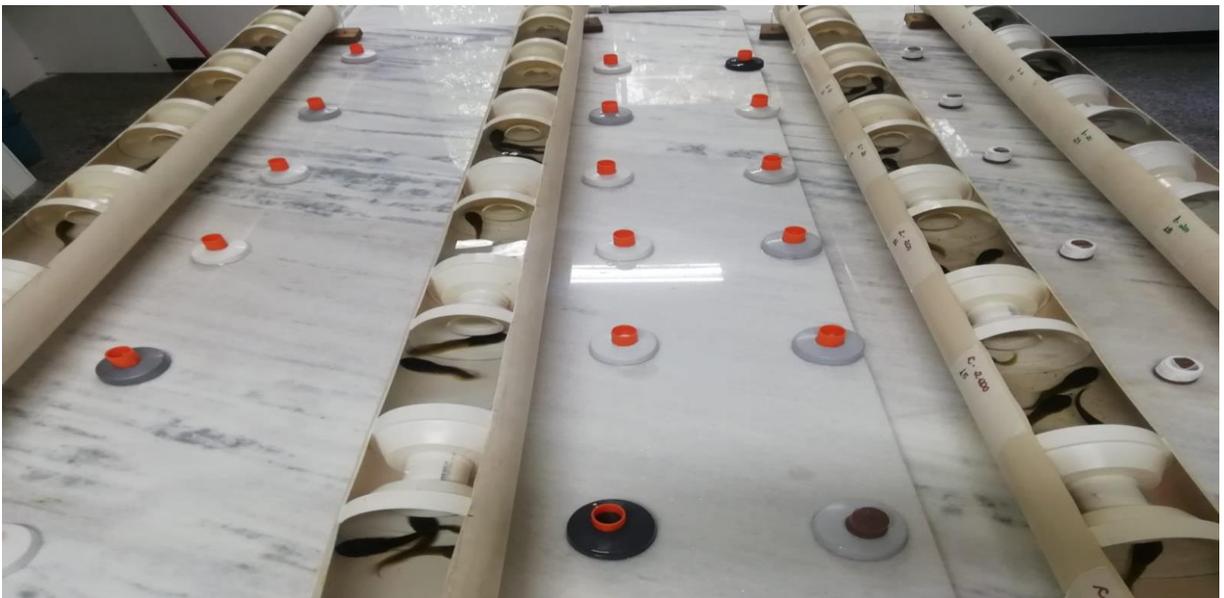


Figura 6 - Sistema multicompartimentos sobre a bancada de experimentação.



Figura 7 - Disposição dos girinos de *Lithobates catesbeianus* no compartimento controle.



Figura 8 - Disposição dos girinos de *Lithobates catesbeianus* no compartiment de maior concentração de atrazina (20.000 $\mu\text{g/L}$).



Figura 9 - Preparação do girino de *Lithobates catesbeianus* para anestesia e retirada de sangue.