

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E
TECNOLOGIA GOIANO - CAMPUS RIO VERDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
CONSERVAÇÃO**

**O USO DE BIOMARCADOR MORFOLÓGICO E GENOTÓXICO
PARA AVALIAR EFEITOS DE CONTAMINANTES AGRÍCOLAS
SOBRE GIRINOS**

Autora: Eliane Andreia dos Santos Oliveira
Orientadora: Dra. Lia Raquel de Souza Santos
Coorientadora: Dra. Lilian Franco-Belussi

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E
TECNOLOGIA GOIANO - CAMPUS RIO VERDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
CONSERVAÇÃO**

**O USO DE BIOMARCADOR MORFOLÓGICO E GENOTÓXICO
PARA AVALIAR EFEITOS DE CONTAMINANTES AGRÍCOLAS
SOBRE GIRINOS**

Autora: Eliane Andreia dos Santos Oliveira
Orientadora: Dr.^a Lia Raquel de Souza Santos
Coorientadora: Dr.^a Lilian Franco-Belussi

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO, no Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde – Área de Concentração: Conservação dos recursos naturais.

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

OOL48u Oliveira, Eliane Andreia dos Santos
 O USO DE BIOMARCADOR MORFOLÓGICO E GENOTÓXICO PARA
 AVALIAR EFEITOS DE CONTAMINANTES AGRÍCOLAS SOBRE
 GIRINOS / Eliane Andreia dos Santos
 Oliveira;orientadora Lia Raquel Souza Santos; co-
 orientadora Lilian Franco-Belussi. -- Rio Verde,
 2018.
 44 p.

Dissertação (Graduação em Programa de Pós-Graduação
em Biodiversidade e Conservação) -- Instituto Federal
Goiano, Câmpus Rio Verde, 2018.

1. Pigmentação. 2. Melanóforos. 3. Girinos. 4.
Áreas agrícolas. I. Souza Santos, Lia Raquel ,
orient. II. Franco-Belussi, Lilian , co-orient. III.
Título.

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
CONSERVAÇÃO

**O USO DE BIOMARCADOR MORFOLÓGICO E
GENOTÓXICO PARA AVALIAR EFEITOS DE
CONTAMINANTES AGRÍCOLAS SOBRE GIRINOS**

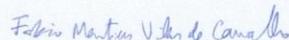
Autora: Eliane Andreia dos Santos Oliveira
Orientadora: Lia Raquel de Souza Santos

TITULAÇÃO: Mestre em Biodiversidade e Conservação – Área de
concentração Conservação dos Recursos Naturais.

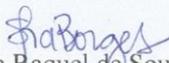
APROVADA em 23 de fevereiro de 2018.



Prof. Dr. Classius de Oliveira
Avaliador externo
UNESP/São José do Rio Preto



Prof. Dr. Fabio Martins Vilar
Carvalho
Avaliador interno
IF Goiano/Campus Rio Verde



Prof.ª. Dr.ª. Lia Raquel de Souza Santos
Presidente da banca
IF Goiano/Campus Rio Verde

DEDICO ESTE TRABALHO:

Ao meu filho Ivan, por ter sido sempre a minha inesgotável fonte de inspiração e motivação.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter nos dado a inteligência para investigar a Natureza e a esperança de que, um dia, os seres humanos aprendam a respeitá-la e a preservá-la;

À Prof.^a Dr.^a. Lia Raquel de Souza Santos, minha orientadora e modelo de profissional, por ter me orientado com paciência, compreensão e gentileza. E, acima de tudo, por ser uma Professora cuja delicadeza e constante preocupação pelo bem-estar dos alunos a tornaram admirável e inesquecível para mim;

À Dr.^a Lilian Franco-Belussi, minha coorientadora, a quem tanto admiro como pessoa e pesquisadora, por todo o aprendizado e por toda a ajuda que ela tão incansável e gentilmente me concedeu e que tornaram esta dissertação possível;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), pela concessão de bolsa durante toda a duração do mestrado;

Ao Prof. Me. Rinneu Elias Borges, pelo auxílio inestimável nas coletas de campo, e pelas sugestões úteis para o aperfeiçoamento desta pesquisa;

Ao meu brilhante colega e estimado amigo do PPGBIO, Marcelino Benvindo de Souza, por ter me ajudado imensamente em todas as etapas da realização desta pesquisa, por ter-me “socorrido” sempre com presteza e boa vontade nos inúmeros momentos em que precisei de apoio (sobretudo com a estatística e o *Statistica!*), pelas frutíferas discussões sobre teoria e prática durante as inúmeras horas em que ele foi minha única e leal companhia no Laboratório de Biologia Animal e pelos bons momentos de descontração;

Ao Prof. Me. Claudio Herbert Nina e Silva, pelo apoio e incentivo durante toda a realização desta pesquisa e, sobretudo, por ter justificado as minhas inevitáveis ausências ao nosso filho Ivan, explicando a ele a importância do “trabalho da mamãe com os sapinhos”.

BIOGRAFIA

Eliane Andreia dos Santos Oliveira, natural de Goiânia – GO, filha de João de Oliveira Tavares e Cleonice dos Santos Lima, mãe de Ivan Herbert Oliveira Nina e Silva. Graduada em Licenciatura em Ciências Biológicas pelo Instituto Federal Goiano. Em 2016, ingressou no Mestrado em Biodiversidade e Conservação, no IF Goiano – Campus Rio Verde.

ÍNDICE

	Página
AGRADECIMENTOS	vi
BIOGRAFIA	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABELAS	x
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES	xi
RESUMO GERAL	xii
GENERAL ABSTRACT	xiii
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	3
CAPÍTULO 1	5
RESUMO	6
ABSTRACT	7
INTRODUÇÃO	8
MATERIAL E MÉTODOS	11
RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
CONCLUSÃO GERAL	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo 1 - Escurecimento corpóreo como biomarcador para avaliar efeitos de contaminantes agrícolas em duas espécies de anuros neotropicais.

- Figura 1.** Cauda de um espécime de girino para demonstrar a metodologia da área analisada A: área delimitada para análise do escurecimento corpóreo; M: musculatura; PS: porção superior da cauda; PI: porção inferior da cauda. 14
- Figura 2.** (A) Porcentagem de escurecimento corpóreo de *Dendropsophus minutus* e *Leptodactylus fuscus*, independentemente do local de coleta e (B) nos ambientes estudados: Preservada: Parque Nacional das Emas; Cana-de-açúcar: Usina; Soja/milho: Fazenda. Diferentes letras minúsculas indicam diferenças estatísticas de acordo com a ANOVA. Valores acompanhados da mesma letra representam semelhança estatística..... 15
- Figura 3.** Fotodocumentação da cauda dos girinos de *Dendropsophus minutus* e de *Leptodactylus fuscus* coletados nos três ambientes. Setas: indicação dos melanóforos cutâneos..... 16

ÍNDICE DE TABELAS

Capítulo 1 - Escurecimento corpóreo como biomarcador para avaliar efeitos de contaminantes agrícolas em duas espécies de anuros neotropicais.

Tabela 1. Média e desvio padrão da porcentagem de escurecimento corpóreo de <i>Dendropsophus minutus</i> e <i>Leptodactylus fuscus</i> nos três ambientes estudados. Preservado: Parque Nacional das Emas; Cana: Usina de cana-de-açúcar; Soja/milho: Fazenda com cultivo de milho/soja.....	15
---	----

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES

D. minutus: *Dendropsophus minutus*.

L. fuscus: *Leptodactylus fuscus*.

MMCs: Melanomacrófagos.

MN: Micronúcleo.

PNE: Parque Nacional das Emas.

L-DOPA: L-3,4 dihidroxifenilalanina.

mm: Milímetro.

cm: Centímetro.

μ : Micro.

g: Grama.

mg: Miligrama.

mL: Mililitros.

g/L: Grama/litro.

μ g/l: Micrograma/Litro.

CIE: Comitê Internacional "l'Eclairage.

L*: Lightness (luminosidade).

UV: Ultravioleta.

UVA: Ultravioleta A.

UVB: Ultravioleta B.

ANOVA: Análise de variância.

p: probabilidade.

r: coeficiente de correlação de Pearson.

Tab.: tabela.

Fig.: figura.

DP: desvio padrão.

FAPEG: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás.

RESUMO GERAL

Anfíbios são sensíveis às alterações ambientais devido ao ciclo de vida bifásico, que os expõe a ambientes aquáticos e terrestres, eles são especialmente sensíveis aos disruptores endócrinos, agentes químicos que desequilibram o funcionamento do sistema endócrino, acarretando problemas neurológicos, imunológicos e, sobretudo, reprodutivos aos organismos, desta forma, os anuros por causa da sensibilidade aos contaminantes ambientais, podem ser utilizados como bioindicadores de qualidade do ambiente. Entre os biomarcadores mais estudados em anfíbios anuros temos o micronúcleo, que é um teste eficaz e bastante utilizado para se detectar efeitos genotóxicos nesses animais e mais recentemente iniciaram estudos com melanóforos, que são células originadas da crista neural, que são pigmentadas e estão presentes na pele e recobrimo órgãos e membranas em anuros. No capítulo, propõe-se a utilização de melanóforos cutâneos presentes nas larvas de anuros, para auxiliar na avaliação dos efeitos de contaminantes agrícolas sobre estes organismos, com três perguntas a serem respondidas: em qual ambiente os animais foram mais afetados, em relação aos efeitos de contaminantes agrícolas? Qual espécie teve maior sensibilidade nas áreas amostradas? E, por fim, se a avaliação do escurecimento da cauda dos girinos pode ser proposta como biomarcador de efeito destes contaminantes sobre a população de girinos. Foram avaliados o total de 60 girinos de duas espécies: *Dendropsophus minutus* e *Leptodactylus fuscus* coletados em três ambientes: dois antropizados (fazenda com cultivo de soja/milho e usina de cana de açúcar) e um ambiente preservado, o Parque Nacional das Emas, como resposta houve variação no padrão de pigmentação de animais das áreas agrícolas, quando comparados aos animais de ambientes antropizados, sendo que o ambiente de cultivo de soja/milho foi o maior promotor do escurecimento corpóreo. Concluindo desta forma que a análise de escurecimento corpóreo pode ser utilizada como biomarcador dos efeitos de contaminantes agrícolas.

Palavras-chave: Pigmentação, melanóforos, girinos, áreas agrícolas.

GENERAL ABSTRACT

Amphibians are sensitive to environmental changes due to the biphasic life cycle that exposes them to aquatic and terrestrial environments, they are especially sensitive to endocrine disrupters and chemical agents that imbalance the functioning of the endocrine system, leading to neurological, immunological and, above all, reproductive problems. So organisms, like anurans, due to sensitivity to environmental contaminants, can be used as bioindicators of environmental quality. Among the most studied biomarkers in anuran amphibians there is have the micronucleus, which is an effective and widely used test to detect genotoxic effects in these animals, and more recently studies have begun with melanophores that are cells originated from the neural crest which are pigmented and are present in the skin and covering organs and membranes of these species. In Chapter 1 it is proposed the use of cutaneous melanophores present in the larvae of anurans to evaluate the effects of agricultural contaminants on these organisms, with three questions to be answered: in which environment were the animals most affected in relation to the effects of agricultural contaminants? Which species had a greater sensitivity in the areas sampled and finally if the evaluation of the body darkening of the tadpoles can be proposed as biomarker of the effect of these contaminants on the tadpoles population. A total of 60 tadpoles of two species: *Dendropsophus minutus* and *Leptodactylus fuscus* were collected in three environments: two anthropates (farm with soybean/corn cultivation and sugar cane plant) and a preserved environment, the Emas National Park. There was variation in the pattern of pigmentation of animals from agricultural areas when compared to animals from anthropic environments, and the soybean/corn environment was the major promoter of body darkening. We conclude in this way that the analysis of body darkening can be used as a biomarker of the effects of agricultural contaminants.

Key words: Pigmentation, melanophores, tadpoles, agricultural area.

INTRODUÇÃO GERAL

Desde a década de 1990, tem sido observada diminuição significativa na população de anfíbios em diversas regiões do mundo (Perez-Iglesias et al. 2016; Caraffa et al., 2013; Hayes et al., 2010). Entre as diversas causas apontadas para esse fenômeno, a poluição ambiental por contaminantes agrícolas tem sido considerada relevante, visto que os anfíbios costumam colonizar agroecossistemas (Perez-Iglesias et al. 2016; Gonçalves et al., 2015; Caraffa et al., 2013; Bosch et al., 2011).

Os anfíbios são sensíveis aos contaminantes agrícolas por causa do ciclo de vida bifásico que os expõe aos ambientes aquáticos e terrestres, à limitação na capacidade de mobilidade e dispersão populacional, à pele semipermeável e as adaptações fisiológicas altamente especializadas que necessitam para viver em microhabitats bastante específicos (Gonçalves et al., 2015; Caraffa et al., 2013; Burlibasa; Gravila, 2011; Hayes et al., 2010).

O Brasil utiliza agrotóxicos em larga escala na agricultura comercial (Pignati et al., 2017), sendo que, no sudoeste Goiano em especial, o uso de herbicidas é intenso (Barbosa, 2003). Contudo, por causa da ampla variabilidade de agentes químicos utilizados na agricultura comercial e da interação sinérgica entre eles depois de dispersos, torna-se difícil a tarefa de avaliar a qualidade ambiental de áreas sujeitas a esses contaminantes agrícolas, apenas através da mensuração de variáveis físico-químicas (França-Salgueiro, 2013).

Enquanto as análises físico-químicas são capazes somente de detectar e quantificar a presença de contaminantes específicos, o uso de bioindicadores possibilita avaliar de forma mais ampla os impactos ambientais dos contaminantes agrícolas, sobretudo em termos ecológicos (França-Salgueiro, 2013). Desse modo, as formas mais efetivas de detecção precoce e predição dos impactos ambientais de poluentes agrotóxicos seriam o biomonitoramento e os testes de toxicidade, tais como o teste de micronúcleo (França-Salgueiro, 2013).

A alta sensibilidade dos anfíbios às mudanças ambientais faz com que esses animais sejam bioindicadores ideais para o biomonitoramento de contaminação ambiental por agrotóxicos (Perez-Iglesias et al. 2016; Gonçalves et al., 2015; Caraffa et al., 2013; Burlibasa; Gravila, 2011). O nível de contaminação por agentes químicos genotóxicos em determinado ambiente tem sido avaliado em programas de

biomonitoramento com anfíbios, pelo teste de micronúcleo (Gonçalves et al., 2015; Caraffa et al., 2013) e pela análise da alteração de células pigmentares internas ou externas (Oliveira et al., 2017; Josende et al., 2015; Allen et al., 2004).

Além do teste de micronúcleo, outra forma de se avaliar genotoxicidade é através de biomarcadores de exposição a poluentes (Allen et al., 2004). Os biomarcadores de exposição a poluentes do tipo efeito, têm sido utilizados em monitoramento ambiental, sendo que estudos realizados com peixes demonstraram o aumento da densidade de células pigmentares fagocitárias do tecido hematopoiético, os chamados melanomacrófagos, como consequência da exposição desses animais a poluentes e/ou patologias (Perez-Iglesias et al., 2016; Kaur; Dua, 2015; Allen et al., 2004).

Estudos recentes empregaram os melanomacrófagos como biomarcadores morfológicos de efeito e exposição a poluentes aquáticos e os resultados indicaram que contaminantes agrícolas promovem a desregulação do sistema imunológico inato de anfíbios em fase larval, Perez-Iglesias et al. (2016), bem como manifestam respostas as alterações ambientais (Kaur; Dua, 2015; Santos et al., 2014), e patológicas (Franco-Belussi et al., 2014).

A quantidade de estudos publicados sobre o efeito de herbicidas em larvas de anfíbios em todo mundo tem aumentado na última década (Gonçalves et al., 2015). Contudo, além de o emprego de anfíbios como bioindicadores de qualidade de água permanecer incipiente no Brasil (Montalvão; Malafaia, 2017), há escassez de estudos sobre espécies de anuros que têm como habitat o Cerrado brasileiro. Desse modo, considerando o avanço contínuo de plantios de monocultura (milho, soja, sorgo e cana-de-açúcar) sobre áreas cada vez mais extensas do Cerrado brasileiro (Barbosa, 2003; Vieira-Júnior et al., 2015), a presente dissertação visou propor um novo biomarcador morfológico dos efeitos de contaminantes de origem agrícola, sobre a população de anuros de agroecossistemas.

A presente dissertação foi desenvolvida em um capítulo que teve como objetivo geral verificar a exequibilidade da utilização de melanóforos cutâneos presentes nas larvas de anuros (*Dendropsophus minutus* e *Leptodactylus fuscus*), para auxiliar na avaliação dos efeitos de contaminantes agrícolas sobre esses organismos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, T.; AWASTHI, A.; RANA, S.V.S. Fish chromatophores as biomarkers of arsenic exposure. **Environmental Biology of Fishes**, v. 71, p. 7-11, 1993.

BARBOSA, C.C. **Proposta de gestão de recursos hídricos na bacia do rio Paranaíba**. 2003. 98 f.. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003..

BOSCH, B. et al. Micronucleus test in post metamorphic *Odontophrynus cordobae* and *Rhinella arenarum* (Amphibia: Anura) for environmental monitoring. **Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences**, v. 3, n. 6, p. 155-163, jun., 2011.

BURLIBASA, L.; GRAVILA, L. Amphibians as model organisms for study environmental genotoxicity. **Applied Ecology And Environmental Research**, v. 9, n. 1, p. 1-15, jan., 2011.

FRANÇA-SALGUEIRO, F.M. **Avaliação da toxicidade de agrotóxicos utilizados na cultura do arroz irrigado para girinos de *Lithobates catesbeianus***. 2013. 104 f.. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Industrial, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2013.

FRANCO-BELUSSI, L.; LEITE, G. B; FREITAS, J S; OLIVEIRA, C. Morphological effects of bacterial compounds on the testes of *Eupemphix nattereri* (Anura). **Animal Biology (Print)**, v. 64, p. 261-275, 2014.

GONÇALVES, M.W. et al. Detecting genomic damages in the frog *Dendropsophus minutus*: preserved versus perturbed areas. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 5, p. 3947-3954, 2015.

HAYES, T.B. et al. The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's perspective. **The Journal of Experimental Biology**, v. 213, p. 921-933, 2010.

JOSENDE, M.E.; TOZETTI, A.M.; ALALAN, M.T.; FILHO, V.M.; DA SILVA XIMENEZ, S. Genotoxic evaluation in two amphibian species from Brazilian subtropical wetlands. **Ecological Indicators**, v.49, p.83–87, 2015.

KAUR, R.; DUA, A. Colour changes in *Labeo rohita* (Ham.) due topigment translocation in melanophores, on exposure to municipal wastewater of Tung Dhabdrain, Amritsar, India. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 39, p. 747-757, 2015.

MONTALVÃO, M.F. MALAFAIA, G. Effects of abamectin on bullfrog tadpoles: insights on cytotoxicity. **Environmental Science Pollution Research** (2017) 24:23411–23416 DOI 10.1007/s11356-017-0124-x.

OLIVEIRA, C., FRANCO-BELUSSI, L., FANALI, L. Z. and SANTOS, L.R.S. Use of melanina- pigmented cells as a new tool to evaluate effects of agrochemicals and other emerging contaminants in brazilian anurans. *Ecotoxicology and Genotoxicology: Non-traditional terrestrial models. Section II: Terrestrial Vertebrates as Experimental Models Chapter 6. Issues in Toxicology n° 32*, 2017.

PÉREZ-IGLESIAS, J.M.; FRANCO-BELUSSI, L.; MORENO, L.; TRIPOLE, S.; DE OLIVEIRA, C.; NATALE, G.S. Effects of glyphosate on hepatic tissue evaluating melanomacrophages and erythrocytes responses in neotropical anuran *Leptodactylus latinasus*. **Environmental Science and Pollution Research International**, v.23, p.1-10, 2016.

SANTOS, L.R.S. et al. Effects of thermal stress on hepatic melanomacrophages of *Eupemphix nattereri* (Anura). **The Anatomical Record**, v. 297, p. 864-875, 2014.

VIEIRA JÚNIOR, N.S. et al. Associação de herbicidas aplicados em pós-emergência na cultura do milho. **Global Science Technology**, v. 8, n. 1, p. 1-8, jan/abr., 2015.

CAPÍTULO I

ESCURECIMENTO CORPÓREO COMO BIOMARCADOR PARA AVALIAR EFEITOS DE CONTAMINANTES AGRÍCOLAS EM DUAS ESPÉCIES DE ANUROS NEOTROPICAIS

ESCURECIMENTO CORPÓREO COMO BIOMARCADOR PARA AVALIAR EFEITOS DE CONTAMINANTES AGRÍCOLAS EM DUAS ESPÉCIES DE ANUROS NEOTROPICAIS

RESUMO

Vertebrados ectodérmicos possuem melanóforos na pele que são originados da crista neural e estão presentes em órgãos e membranas. Esse tipo de célula contém grânulos de melanina em seu interior promovendo a coloração marrom-preta nos animais, atualmente são utilizados como biomarcadores em biomonitoramento ambiental. Neste contexto propõe-se neste estudo a utilização de melanóforos cutâneos presentes nas larvas de anuros, para auxiliar na avaliação dos efeitos de contaminantes agrícolas sobre estes organismos, com três perguntas a serem respondidas: em qual ambiente os animais foram mais afetados em relação aos efeitos de contaminantes agrícolas? Qual espécie teve maior sensibilidade nas áreas amostradas? E, por fim, se a avaliação do escurecimento da cauda dos girinos pode ser proposta como biomarcador de efeito destes contaminantes, sobre a população de girinos. Foram avaliados um total de 60 girinos de duas espécies: *Dendropsophus minutus* e *Leptodactylus fuscus* coletados em 3 ambientes: dois antropizados (fazenda com cultivo de soja/milho e usina de cana de açúcar) e um ambiente preservado, o Parque Nacional das Emas. Imagens da pigmentação corpórea dos girinos foram avaliadas e resultou em uma média de transparência que é o complemento do escurecimento. Houve variação no padrão de pigmentação de animais de áreas agrícola, quando comparados aos animais de ambientes antropizados, sendo que o ambiente de cultivo de soja/milho foi o maior promotor do escurecimento corpóreo. Larvas de *D. minutus* apresentaram maior porcentagem de escurecimento caudal ($50,27\% \pm 11,68$) do que *L. fuscus* ($25,74\% \pm 11,73$), demonstrando maior sensibilidade. Concluindo, portanto, que a análise de escurecimento caudal pode ser utilizada como biomarcador dos efeitos de contaminantes agrícolas, porém mais trabalhos devem ser realizados com outras espécies e outros biomarcadores para que se possa correlacioná-los, obtendo um protocolo padronizado de biomarcador, como parâmetro para se avaliar toxicidade em larvas de anuros.

Palavras-chave: Pigmentação, melanóforos, girinos, áreas agrícolas.

BODY DARKENING AS A BIOMARKER TO EVALUATE EFFECTS OF AGRICULTURAL POLLUTANTS IN TWO SPECIES OF NEOTROPICAL ANURA

ABSTRACT

Ectodermal vertebrates have melanophores in the skin which have been originated from the neural crest and are present in organs and membranes. This type of cell contains melanin granules in its interior and promotes brown-black coloration in animals and is currently used as biomarkers in environmental biomonitoring. In this context, it is proposed the use of cutaneous melanophores present in the anuran larvae in order to evaluate the effects of agricultural contaminants on these organisms. In order to do that, we investigated the following questions: 1) in which environment were the animals most affected in relation to the effects of agricultural contaminants?; 2) which species had a higher sensitivity in the surveyed areas?; and 3) the evaluation of tadpole tail darkening can be proposed as a biomarker of effect of these contaminants on tadpole population? The sample consisted of 60 tadpoles of two species (*Dendropsophus minutus* and *Leptodactylus fuscus*). The tadpoles were collected in two agricultural anthropic areas (a corn/soybean farm and a sugar cane plant) and a preserved area (Emas National Park). Images of tadpoles body pigmentation were evaluated and resulted in a mean transparency that is the complement of the darkening. There was variation in the pigmentation pattern of animals from agricultural areas when compared to animals from anthropized environments. The corn/soybean farm environment was the major promoter of body darkening. Larvae of *D. minutus* presented a higher percentage of caudal darkening ($50.27\% \pm 11.68$) than *L. fuscus* ($25.74\% \pm 11.73$), showing greater sensitivity. We conclude that the analysis of caudal darkening can be used as a biomarker of the effects of agricultural contaminants. Nevertheless, further studies on this issue should be carried out with other species and biomarkers to obtain a standardized biomarker protocol as a parameter to evaluate toxicity in anuran larvae.

Key words: Pigmentation, melanophores, tadpoles, agricultural area.

INTRODUÇÃO

Cromatóforos são células pigmentadas encontradas na pele de invertebrados e vertebrados ectotérmicos, confere diferentes tonalidades de cor e são classificadas em vários tipos de acordo com o pigmento contido, como: xantóforos que contêm grânulos de pteridina e carotenoides que leva a coloração amarela, os eritróforos também com pteridina que confere a coloração vermelha, leucóforos que contêm grânulos de purina levando a coloração branca, os iridóforos de cor metálica que possuem grânulos de purina, mas não depositados em cristais e por fim os melanóforos que contêm grânulos de melanina e promovem a coloração marrom a preto (Oliveira et al., 2017; Scharl et al., 2015; Aspengren et al., 2009).

A cor é uma forma de identificação interespecífica entre os animais, pois através dela eles se comunicam entre si e se adaptam a seu ambiente, além disso, a cor é utilizada na camuflagem, no mimetismo e para afugentar predadores. Assim, a coloração externa dos animais é um importante instrumento de sobrevivência (Wallin, 2002). Mudanças na cor da pele podem ser fisiológicas ou morfológicas (Kindermann; Hero, 2016), a fisiológica é definida como uma mudança rápida na cor causada por um movimento intracelular de organelas que contêm pigmento, porém é transitória e o animal se recupera em minutos ou horas depois (Bagnara; Matsumoto, 2006). Já a mudança de cor morfológica ocorre em longo período de tempo (Kindermann; Hero, 2016) e é resultante de alterações na quantidade de pigmento, pois inclui a síntese e/ou a destruição de pigmento em resposta ao estímulo persistente (Bagnara; Matsumoto, 2006).

Vertebrados ectotérmicos têm em contraste com os mamíferos a capacidade rápida de alterar sua coloração por regulação fisiológica dos cromatóforos cutâneos, e nos melanóforos essa mudança de cor é derivada do transporte intracelular dos melanossomos (Aspengren et al., 2009), os quais são organelas que sintetizam e armazenam a melanina (Marks; Seabra, 2001). Além disso, esses animais possuem também células contendo melanina além da pele, os melanócitos, que também são originados da crista neural ectodérmica (Oliveira et al., 2017; Salim; Ali, 2011; Sichel et al., 1997) e que estão presentes em órgãos e membranas (Oliveira et al., 2017). Estes tipos celulares possuem função de defesa imune particularmente contra fungos e

bactérias (Wallin, 2002). Também existe outro tipo de células contendo melanina, porém originadas de células tronco hematopoiéticas denominadas melanomacrófagos (MMCs) e estão presentes em órgãos hematopoiéticos como fígado e baço (Oliveira et al., 2017; Franco- Belussi et al., 2016; Nilsson Sköld et al., 2013; Oliveira et al., 2012; Galone et al., 2012; Zieri et al., 2007), constituindo um sistema extracutâneo de pigmentação (Bagnara; Matsumoto, 2006), e está relacionado não somente com funções fagocitárias como também a defesa imunológica do organismo e detoxificação de agentes xenobióticos (Kaur; Dua, 2015; Santos et al., 2014).

Assim, independente da origem, os três tipos celulares (MMCs, melanócitos e melanóforos) possuem em seu citoplasma melanina, um polímero que atua contra ação de radicais livres (Mcgraw, 2005) protegendo as células de danos oxidativos (Kaur; Dua, 2015; Santos et al., 2014; Agius; Roberts, 2003; Rozanowska et al., 1999). A biossíntese dessa substância é iniciada pela hidroxilação da L-tirosina em L-3,4 dihidroxifenilalanina (L-DOPA) pela ação da enzima tirosinase (Prota, 1992), os intermediários de melanina são sintetizados a partir de tirosina dentro do lúmen dos melanosomas e depois polimerizados para formar melaninas totalmente pigmentadas (Marks; Seabra, 2001).

Os melanóforos são o tipo de cromatóforo mais estudado, pois possuem um elevado mecanismo de movimentação dos grânulos de melanina dentro das células quando estimuladas (Salim; Ali, 2011). Herrick (1933) descreveu os melanóforos dérmicos de cinco espécies de anuros como sendo células alongadas de poucas ramificações com comprimentos variáveis de 150 μ a 200 μ e posteriormente Bagnara e Matsumoto (2006) relataram que essas células geralmente residem na parte superior da derme, abaixo da lamina basal, porém em vertebrados ectotérmicos os melanóforos estão localizados tanto na epiderme como na derme (Aspengren et al., 2009). O termo melanóforo ficou convencionado como a célula pigmentar que contém melanina presente em vertebrados ectotérmicos e o termo melanócito um sinônimo de melanóforo (Prota, 1992) porém, aplicado a vertebrados endotérmicos, e embora o uso de ambas nomenclaturas seja válido para anfíbios (Bagnara; Matsumoto, 2006), em nosso estudo seguimos a proposta de Oliveira et al. (2017) e utilizamos o termo melanóforo para as células contendo melanina presentes na pele dos anfíbios e melanócitos para células contendo melanina presentes nos órgãos internos.

No entanto, ambos os tipos de células pigmentares (internas ou externas) são utilizadas como biomarcadores em programas de biomonitoramento, pois servem de alerta para presença de poluentes antes que os danos sejam irreversíveis (Oliveira et al., 2017; Josende et al., 2015). Neste sentido, os marcadores biológicos também ajudam a avaliar o estado de saúde das populações de anfíbios (Jha et al., 2008; Venturino et al., 2003) e estudos já realizados com este grupo de organismos bem como com peixes demonstraram o aumento da densidade de células fagocitárias, os melanomacrófagos, como consequência da exposição desses animais a poluentes e/ou patologias (Perez-Iglesias et al., 2016; Allen et al., 2004).

Os anfíbios possuem características como permeabilidade cutânea, ovos sem casca calcária e ciclo de vida dependente do ambiente aquático, tornando-os sensíveis a contaminantes ambientais (Blaustein; Bancroft, 2007; Blaustein; Wake, 1995) e podem assim ser utilizados como bioindicadores de qualidade ambiental, avaliado pelos efeitos gerais do lançamento de agentes químicos sobre as populações de organismos (Hayes et al., 2010). Estes efeitos podem ser observados pela incidência de anomalias externas, diminuição do crescimento e taxas de desenvolvimento, prejuízo nas taxas reprodutivas e por fim morte (Sparling; Fellers 2009), especialmente pelos efeitos genotóxicos desses agentes (Gonçalves et al., 2015; Caraffa et al., 2013), sendo, portanto, organismos comumente usados em estudos na área de Ecotoxicologia (Caraffa et al., 2013).

O Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos do mundo e o segundo maior exportador e ainda se desconhece muito sobre o uso destes e sobre o consumo, tipos e volumes utilizados nas lavouras brasileiras além de sua toxicidade (Pignati et al., 2017). Todos os anos novos produtos químicos são sintetizados e afetam de forma direta ou indireta os ecossistemas, e a introdução destes compostos pode causar mudanças no ambiente e pode configurar eventos de contaminação (Martini et al., 2017).

Neste contexto e devido à escassez de trabalhos que utilizam biomarcadores morfológicos, e especialmente os de pigmentação externa, em estudos ecotoxicológicos envolvendo os anfíbios, propõe-se a utilização de melanóforos cutâneos presentes nas larvas de anuros (*Dendropsophus minutus* e *Leptodactylus fuscus*) para auxiliar na avaliação dos efeitos de contaminantes agrícolas sobre estes organismos, com três perguntas a serem respondidas: *i*) em qual ambiente os animais são mais afetados em relação aos efeitos de contaminantes agrícolas? *ii*) qual espécie teve maior sensibilidade nas áreas amostradas? E, por fim se a *iii*) avaliação do escurecimento corpóreo das

larvas pode ser proposta como um novo biomarcador morfológico de efeito destes contaminantes sobre a população de girinos em ambientes naturais e antropizados.

MATERIAL E MÉTODOS

Espécies do estudo:

Dendropsophus minutus (Peters, 1872) é uma espécie pertencente à família Hylidae não ameaçada de extinção e ocorre em toda a América do Sul (Gonçalves et al., 2017; Silvano et al., 2010). É considerada uma perereca pequena de 21-28 mm de comprimento amplamente generalizada com grande espectro de coloração (Gehara et al., 2014). Os girinos desta espécie são descritos por Rossa-Feres e Nomura (2006) e diagnosticados como animais com comprimento que chegam a $37,52 \pm 2,96$ mm, corpo comprimido e oval em vista dorsal e triangular em vista lateral, focinho arredondado em vista dorsal e inclinado em vista lateral, olhos grandes e lateralmente direcionados, narinas grandes, circular e posicionada lateralmente.

Leptodactylus fuscus (Schneider, 1799) é uma espécie pertencente à família Leptodactylidae e também não se encontra ameaçada de extinção. Ocorre em toda América do Sul (Silvano et al., 2010) e é conhecida por se abrigarem em câmaras durante o dia, bem como por possuir cuidado parental com suas larvas (Oliveira Filho; Giaretta, 2008). Outra característica da espécie é de não possuírem flanges entre os dedos e os machos não possuírem espinho no primeiro dedo (Langone et al., 2005). Os girinos desta espécie são descritos por (Rossa-Feres; Nomura, 2006) e diagnosticados como animais com comprimento que chegam a $27,76 \pm 2,30$ mm corpo deprimido, oval em vista dorsal e globular, deprimido em vista lateral, focinho oval em vista dorsal e inclinado em vista lateral, olhos pequenos, dorsais, dirigidos lateralmente, narinas pequenas, oval e posicionadas dorsalmente com abertura lateralmente dirigida.

Todos os animais após coletados, foram identificados com auxílio de uma chave de identificação para larvas de anuros (Rossa-Ferez e Nomura, 2006), através de microscópio óptico (modelo Lab 1001 PB) acoplado com câmara digital (modelo 3.0 megapixels).

Local de coleta dos animais:

As espécies *Dendropsophus minutus* e *Leptodactylus fuscus* foram coletadas em três ambientes com diferentes paisagens na região sudoeste do Estado de Goiás, Brasil.

O primeiro ambiente, o Parque nacional das Emas (PNE) (18°15'47.78''S; 52°53'23.90''W), Unidade de Conservação Federal e considerada uma área preservada, se localiza no município de Chapadão do Céu, possui uma área de conservação federal com 132.000 hectares e com paisagem constituída basicamente de formações campestres com áreas abertas (Giozza et al., 2017; Costa et al., 2009), porém a partir da década de 1970 expandiu-se no entorno do parque a cultura de soja, milho e cana de açúcar o que causou transformação na vegetação do entorno (Giozza et al., 2017). O segundo ambiente, denominado apenas de fazenda ou área de cultivo soja/milho, é uma área de cultura agrícola localizado no município de Rio Verde, Goiás. Compreende a área total de plantio de aproximadamente 1.029,33 hectares e caracterizada pelo plantio direto de soja (*Glycine max*) e milho (*Zea mays*) em revezamento, com uso extensivo de fertilizantes e demais agrotóxicos para controle de pragas. O último ambiente, Usina ou também cultivo cana-de-açúcar, está localizado no município de Paraúna-Goiás e se trata de uma indústria de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) para produção de álcool anidro e hidratado que produz cerca de 2.000.000 toneladas de cana por safra, segundo dados da própria indústria (Usinova, 2017). As coletas dos espécimes larvais (n=10 de cada espécie em cada ambiente, totalizando, portanto, n=30 animais da espécie *D. minutus* e n=30 animais da espécie *L. fuscus*) aconteceram na estação chuvosa entre os meses de novembro de 2016 a janeiro de 2017 em poças permanentes e temporárias com auxílio de um puçá (malha 3x3 mm) no interior e nas extremidades das mesmas conforme descrito por Morais et al. (2011).

Assim que coletados, todos os animais foram anestesiados com água gelada e sacrificados por excesso de benzocaína (5g/L) por 2 minutos (Campana et al., 2003). Posteriormente, foram conservados em solução de formaldeído a 10% e transportados para o Laboratório de Biologia Animal do Instituto Federal Goiano (LABAN).

Análise de Escurecimento Corpóreo:

Para a análise do escurecimento corpóreo as caudas dos girinos de *D. minutus* e *L. fuscus*, foram fotografadas sob condições de luz padronizada e plano fundo da imagem branco, com vista lateral dos espécimes utilizando uma câmera acoplada ao estereomicroscópio (Laborana modelo NSZ-405). Para a seleção da área a ser analisada, foram definidas seis regiões da cauda: três situadas a cima da musculatura e três situadas abaixo da musculatura. As regiões selecionadas não se sobrepunham umas as

outras, e desta forma, uma área maior foi analisada, obtendo maior representatividade da área da cauda como um todo. Os pontos de referência foram definidos para assegurar que a mesma área fosse analisada em todos os animais. As imagens após capturadas foram analisadas no Adobe Photoshop® versão Cc 2014 seguindo protocolo de Svensson et al. (2005) e adaptado para anuros por Franco-Belussi et al. (2016). Para isso, as imagens foram convertidas para o modo CIE $L^*a^*b^*$, em que L^* é o parâmetro de luminosidade de acordo com as recomendações do Comitê Internacional “l’Eclairage (CIE)”. CIE $L^*a^*b^*$ definindo a imagem preta total ($L^* = 0$) e a imagem branca total ($L^* = 255$). Analisou-se $3,10 \text{ mm}^2$ em cada região totalizando portanto $18,6 \text{ mm}^2$ de área analisada. Essa medida foi escolhida por representar a área mínima necessária evidenciada no menor espécime, para possibilitar a análise lateral usando a ferramenta de marcação retangular do programa Adobe Photoshop® (Figura 1). Os valores médios de transparência da área selecionada foram medidos usando a ferramenta histograma. Uma vez que as fotografias foram tiradas em uma mesa de luz e toda a luz permeava a pele, a L^* da biópsia da pele estava diretamente relacionada à sua transparência. Como o conceito de transparência da pele é relevante para a compreensão deste sinal de cor, converteu-se L^* em uma medida de transparência. Isso foi feito calculando a porcentagem de L^* na área selecionada em relação ao L^* do plano de fundo (transparência = $100 \times L^* / 255$) * O escurecimento foi calculado como o complemento da transparência, e os dados foram mostrados em porcentagem de escurecimento (preto = 100%).

Todos os 10 animais, representantes de cada área estudada e de cada espécie foram analisados. Para cada animal foram analisadas duas imagens e dessas obtidas o valor médio. Esta mesma análise, também foi reproduzida por Franco-Belussi et al. (2016) para avaliar efeitos de radiação UVB em adultos de *Physalaemus nattereri* para escurecimento corpóreo.

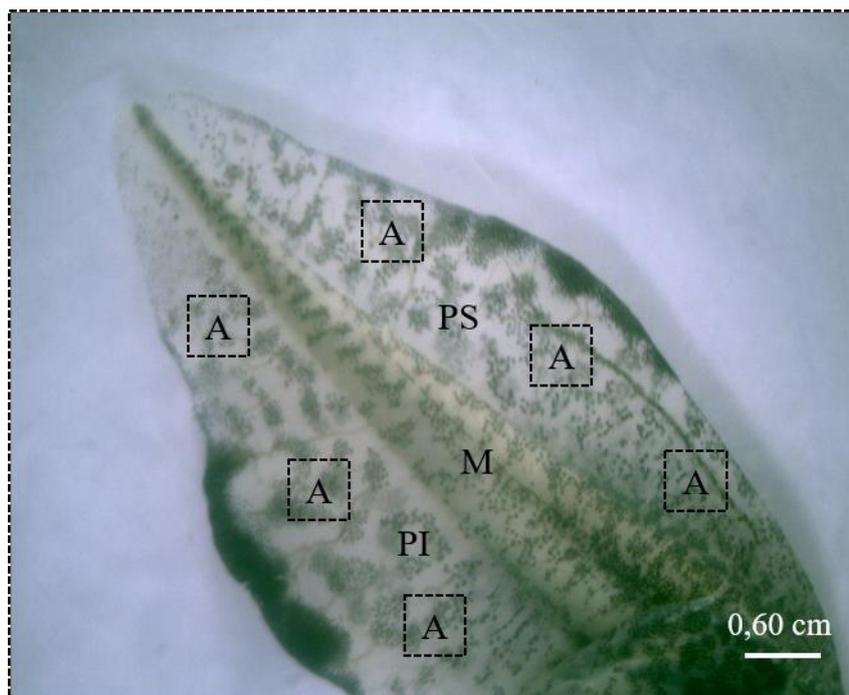


Figura 1: Cauda de um espécime de girino para demonstrar a metodologia da área analisada A: área delimitada para análise do escurecimento corpóreo; M: musculatura; PS: porção superior da cauda; PI: porção inferior da cauda.

Análise Estatística:

Para avaliar se houve diferença no escurecimento da cauda (variável resposta) entre as espécies; e se houve variação do escurecimento entre os ambientes amostrados os dados foram transformados, utilizando a função raiz quadrada para atender as premissas de homogeneidade de variância e normalidade. Posteriormente, foi realizada uma análise de variância (ANOVA fatorial) seguida de um *post hoc* teste de Tukey utilizando o critério de significância a $p < 0,05$. O programa estatístico utilizado foi o Statistica® versão 7.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve maior porcentagem de escurecimento corpóreo em *D. minutus* em relação a *L. fuscus* ($F_{1,53} = 386,3$; $p = 0,0001$) independente do ambiente estudado (Fig. 2A). Os valores médios do escurecimento de *D. minutus* foi de $50,27\% \pm 11,68$ e *L. fuscus* foi de $25,74\% \pm 11,73$ (Tab. 1).

No entanto, quando se compara os dados das espécies nos diferentes ambientes, foi observada maior porcentagem de escurecimento da cauda em *D. minutus* coletados

em áreas de cultivos de soja/milho (Fazenda) e cana-de-açúcar (Usina) diferindo dos animais de ambientes preservados ($F_{2,53}=19,37$; $p < 0,01$). Contudo, para a espécie *L. fuscus* houve maior porcentagem de escurecimento caudal de animais coletados em áreas de cultivo de soja/milho (Fig. 2B, Tab.1, Fig. 3).

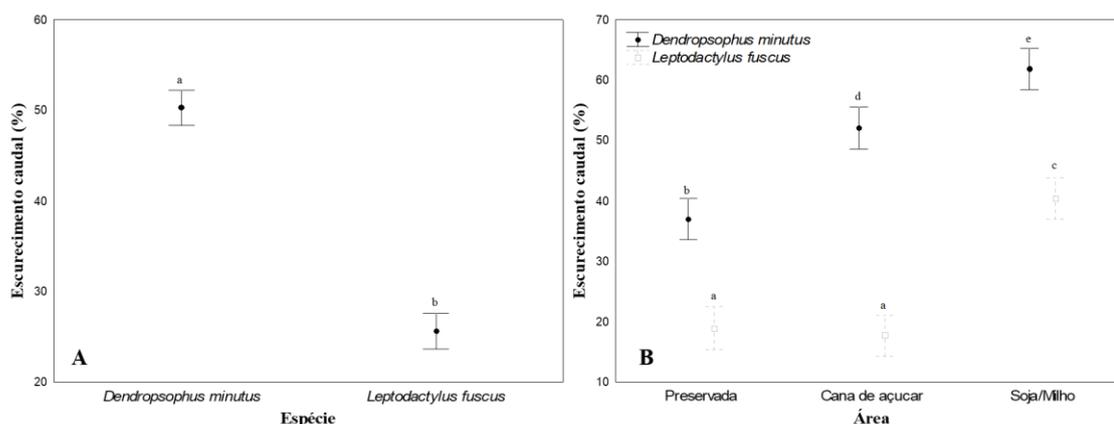


Figura 2. (A) Porcentagem de escurecimento corpóreo de *Dendropsophus minutus* e *Leptodactylus fuscus*, independentemente do local de coleta e (B) nos ambientes estudados: Preservada: Parque Nacional das Emas; Cana-de-açúcar: Usina; Soja/milho: Fazenda. Diferentes letras minúsculas indicam diferenças estatísticas de acordo com a ANOVA. Valores acompanhados da mesma letra representam semelhança estatística.

Tabela 1: Média e desvio padrão da porcentagem de escurecimento corpóreo de *Dendropsophus minutus* e *Leptodactylus fuscus* nos três ambientes estudados. Preservado: Parque Nacional das Emas; Cana: Usina de cana-de-açúcar; Soja/milho: Fazenda com cultivo de milho/soja.

Espécie	Ambiente			Média Total ± DP
	Preservado Média±DP	Cana Média±DP	Soja/milho Média±DP	
<i>D. minutus</i>	36,89±4,74 ^b	51,99±3,07 ^d	61,93±7,38 ^e	50,27± 11,68
<i>L. fuscus</i>	19,16±2,53 ^a	17,65±2,40 ^a	40,40±8,49 ^c	25,74± 11,73

Diferentes letras minúsculas indicam diferenças estatísticas, mas valores acompanhados da mesma letra são semelhantes entre si.

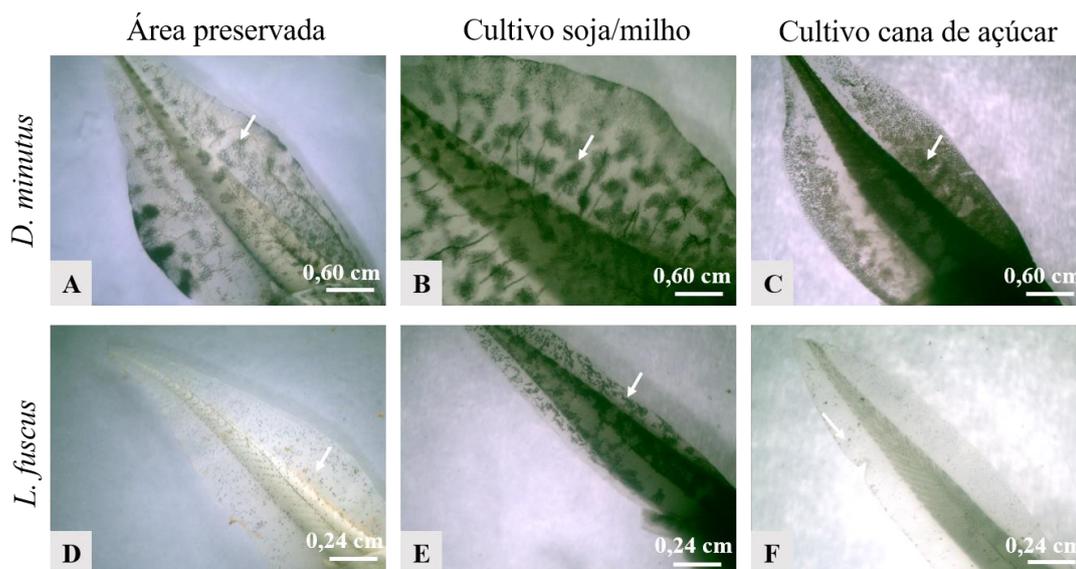


Figura 3. Fotodocumentação da cauda dos girinos de *Dendropsophus minutus* e de *Leptodactylus fuscus* coletados nos três ambientes. Setas: indicação dos melanóforos cutâneos.

Constatou-se que a espécie *D. minutus* teve maior porcentagem de escurecimento corpóreo comparado a *L. fuscus* e o ambiente em que os animais obtiveram maior escurecimento caudal foi na área de plantação de milho/soja. Animais ectotérmicos apresentam melanina dentro de células denominadas de melanóforos que possuem a capacidade de agregar ou dispersar os grânulos de pigmento dentro de seu citoplasma. A mudança de cor está relacionada a esta movimentação intracelular da melanina que pode persistir ou ser efêmera dependendo do agente causador dessas mudanças. Segundo Oliveira et al. (2017) em estudos experimentais, larvas de anuros expostas a diferentes concentrações de atrazina, apresentaram maior área de ocupação da melanina dentro dos MMCs, em relação a animais controle. Neste sentido, os animais coletados em áreas com extensiva monocultura podem ter apresentado maior porcentagem de escurecimento da cauda em função da exposição aos contaminantes, uma vez que foram encontrados maiores valores no ambiente antropizado em relação ao ambiente preservado. Ainda de acordo com Oliveira et al. (2017) em estudos de pigmentação visceral de adultos e cutânea com larvas do gênero *Rhinella*, os anuros adultos demonstraram respostas semelhantes as registradas pelas larvas deste estudo, e para ambas as situações (adultos e larvas) houve aumento de pigmentação. Porém, cabe salientar que adultos de *L. fuscus* tiveram acréscimo mais expressivo de melanina dentro dos MMCs, quando comparados aos indivíduos de *D. minutus* (Oliveira et al. 2017), já

para as larvas analisadas neste trabalho, *D. minutus* apresentou maior escurecimento que *L. fuscus*. Mesmo se tratando de células diferentes, tanto os MMCs quanto os melanóforos contêm melanina em seu citoplasma e então uma analogia pode ser feita para pigmentação cutânea, em que os efeitos de agentes externos podem, assim como para os MMCs, ter promovido a dispersão ou o aumento da melanina dentro dos melanóforos cutâneos presentes na pele dos girinos, promovendo, portanto, maior escurecimento corpóreo. Estudos com melanóforos de peixes da espécie *Oreochromis mossambicus*, mas conhecido como tilápia, mostrou prontamente mudanças de resposta para estressores ambientais (Daiwile et al., 2015). Os estímulos ambientais dentre eles os estressores como os pesticidas, podem realocar os melanossomas presentes nos melanóforos, resultando num clareamento quando há agregação do pigmento ou no escurecimento quando há dispersão dos grânulos de melanina, dentro desses corpúsculos celulares (Polo-Cavia; Gomez-Mestre, 2017; Kindermann; Hero, 2016).

Além disso, o menor escurecimento caudal observado na larva de *L. fuscus* pode estar relacionado ao modo reprodutivo apresentado pelos indivíduos adultos, e a espécie constrói ninhos de espuma em câmaras subterrâneas em corpos d'água temporários (Grosso et al., 2017; Bardier et al., 2014; Camargo et al., 2006; Langone; De Sá, 2005). Sendo assim, as larvas podem permanecer por maior tempo neste ninho e, portanto, tornam-se menos expostas ao ambiente aquático; diferentemente da desova observada em *D. minutus*, nos quais seus ovos e girinos são exotróficos (Pombal Jr; Haddad, 2005) e as fêmeas depositam os ovos em folhas que rapidamente eclodem e caem dentro d'água para completar o desenvolvimento (Silvano et al., 2010), passando, portanto, boa parte deste ciclo dentro da água (Thibaudeau; Alting, 2012). *D. minutus* possui o modo reprodutivo mais generalizado e ancestral dos anfíbios, e, no entanto, essa característica reprodutiva pode ser uma resposta do porquê esta espécie de larva demonstrou mais sensível do que *L. fuscus*. Trabalhos com diferentes categorias de poluentes relatam que os efeitos destes podem variar de espécie para espécie (Perez-Iglesias et al, 2015; Brühl et al., 2013; Relyea, 2009) e até mesmo dentro da própria espécie em diferentes populações (Harris et al., 2000; Johansson et al., 2001; Smith; Burgett, 2005), corroborando com os resultados aqui demonstrados.

Outro resultado encontrado é que houve maior porcentagem de escurecimento caudal em larvas de anuros encontradas em ambiente de plantação de soja/ milho (fazenda), tanto para *D. minutus* como para *L. fuscus*. Contaminantes agrícolas como

atrazina um potente desregulador endócrino em baixas concentrações demonstram poucos efeitos em anuros adultos, porém a interferência é muito maior em larvas, visto que podem interferir na metamorfose e na diferenciação sexual, mesmo em baixas dosagens (Hayes et al., 2006). Vários trabalhos com larvas de anuros demonstram efeitos nocivos de agrotóxicos sobre essas populações (Silva et al., 2013). Segundo Kohr e McCoy (2010), a metamorfose é controlada por hormônios da tireoide, assim, animais que vivem em ambientes estressantes podem ter seu sistema endócrino desregulado e conseqüentemente uma metamorfose inapropriada. Pesticidas em geral, podem afetar negativamente as taxas de crescimento de populações de anfíbios, alterando o desenvolvimento das larvas, crescimento, morfologia, fisiologia e comportamento e acontece, provavelmente por indução ao dano no DNA, conseqüentemente diminuindo a reprodução (Pérez-Iglesias et al., 2016; Gonçalves et al. 2014; Sparling et al. 2010). Franco-Belussi et al. (2016) também observaram o aumento no escurecimento corpóreo por incidência de radiação UV em adultos de *Physalaemus nattereri* em diferentes tecidos como resposta da dispersão da melanina frente a proteção de células e órgãos. Mudanças na coloração de girinos de *Rhinella marina* por indução da luz também foram constatadas, e os animais se tornavam mais escuros na presença de luz e mais claros na ausência dela, para este fenômeno foi dado o nome de fotossensibilidade, (Beaty et al., 2015).

Assim, com relação as funções do sistema pigmentar, e especificamente da melanina, o aumento do escurecimento corpóreo observado em ambas as espécies inseridas em ambiente agrícola, pode estar relacionado as funções de defesa imunológica do organismo e detoxificação de agentes xenobióticos (Kaur; Dua, 2015; Santos et al., 2014), uma vez que alguns estudos já demonstraram que contaminantes de origem agrícola tem papel sobre sistema imune dos anfíbios, diminuindo a resistência dos mesmos, conseqüentemente deixando-os propensos a infecções por trematódeos, nematódeos, infecções virais e bacterianas (Kohr; McCoy, 2010). Martin et al. (2010), em sua revisão cita que girinos expostos a água de escoamento agrícola se tornam mais propensos a infecções por trematódeos causando deformidades. A poluição afeta a susceptibilidade dos anuros alterando os traços de vida do parasita e do hospedeiro, porém os efeitos das formulações comerciais se testadas em girinos isoladamente podem não surtir efeitos, mas juntamente com outros surfactantes sim (Rohr et al.,

2008), sendo que estudos com efeitos sinérgicos entre a dinâmica das doenças e as mudanças ambientais devem ser melhor avaliadas (Thibaudeau; Alting, 2012).

Além disso, o ambiente de cultivo de soja/milho foi o que mais promoveu escurecimento para ambas as espécies. Neste sentido, os resultados aqui encontrados podem ser explicados pelo motivo que a soja foi a cultura que mais utilizou agrotóxicos no Brasil 63%, seguida de milho 13% e cana-de-açúcar 5%, sendo o Estado de Goiás o 5º consumidor de pesticidas em 2015 e mais especificamente o município de Rio Verde estando entre os 10 mais consumidores (7,3 milhões de litros) de agroquímicos no Brasil em 2015 (Pignati et al., 2017). Outro fator preponderante para a interpretação dos resultados desse estudo é que há rotação anual entre culturas de milho e soja, por causa das extensas áreas de cultivo (Cruz et al., 2009). Esta rotação consiste em alternar o cultivo de espécies com sistemas radiculares diferentes como leguminosas e gramíneas, por exemplo, e ao longo do tempo, torna o solo mais produtivo e é uma maneira mais sustentável de utilização do mesmo (Gonçalves et al., 2007) é o que se chama safrinha de milho, aumentando o período de tempo que a cultura permanece no campo durante o ano (Cruz et al., 2009), não ocorrendo com a cana-de-açúcar por se tratar de uma cultura perene (Townsend, 2000).

Com relação ao ambiente de cultivo de cana-de-açúcar, o primeiro ano de estabelecimento das mudas é um período essencial para o desenvolvimento da planta, mais especificamente nos primeiros 90 dias, ficando mais susceptíveis ao ataque de pragas e doenças (Townsend, 2000), sendo a praga de maior destaque a broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis*, que durante sua fase de lagarta, abre galerias no colmo da cana, sendo exatamente por este motivo o controle químico inútil e o controle biológico com parasitoide mais utilizado (Oliveira et al., 2012), diminuindo assim a quantidade de inseticidas no combate a pragas. Contudo, não há aqui a intenção de associar um único composto químico em específico como promotor do escurecimento caudal, no entanto, os dados sugerem que animais inseridos em ambientes antropizados demonstram alterações morfológicas em seu padrão de pigmentação externa.

Os organismos podem muitas vezes enfrentar heterogeneidade ambiental de modo que um único padrão de coloração pode não estar sempre presente em todas as condições ambientais (Polo-Cavia; Gomez-Mestre, 2017). No entanto, o uso de químicos agrícolas causa tantos prejuízos e desvantagens a qualidade de vida desses animais como já citadas, e sugerindo que o escurecimento corpóreo seria mais uma

manifestação, de que algo não está de acordo com os padrões, que aquelas espécies já possuíam. Em muitos animais, a coloração do corpo é usada principalmente para defesa contra predadores, estes muitas vezes não conseguem detectar ou reconhecer a presa camuflada (Kang et al., 2016). A literatura sobre a coloração e padrões de cores é muito incompleta para os girinos, provavelmente porque as colorações usadas nas interações agressivas, manutenção territorial e reconhecimento de espécies e sexo são ausentes nessa fase (Thibaudeau; Alting, 2012). Então, se a coloração é alterada pela exposição a estes xenobióticos, e as larvas ficam expostas muitas vezes em poças rasas, vulneráveis a predação, as modificações nos padrões de cor podem estar relacionadas com a sobrevivência do espécime, interferindo, portanto, na camuflagem e consequentemente alteraria a ecologia das espécies de anfíbios, que estão inseridas em paisagens agrícolas, sendo, portanto, outro motivo para declínio populacional dentro do grupo dos anuros.

Portanto, concluindo que a análise de escurecimento corpóreo pode ser utilizada como um biomarcador dos efeitos de contaminantes agrícolas, já que os resultados mostraram que houve diferença na coloração de larvas de *D. minutus* e *L. fuscus* de ambientes antropizados em relação ao ambiente preservado. Porém, mais trabalhos devem ser realizados com outras espécies para obter um protocolo padronizado de biomarcador como parâmetro para se avaliar toxicidade em larvas de anuros.

Declaração de conflito de interesse

Os autores declaram que não houve conflitos de interesse.

Agradecimentos

Agradecemos ao Instituto Chico Mendes, por liberar a coleta no Parque Nacional das Emas (Licença SISBIO nº 53799-1), a Usina e a Fazenda, onde foram realizadas as coletas. Agradecemos também a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG- nº processo: 201610267000542 chamada nº 03/2016), pela concessão de bolsa de pesquisa a Oliveira, E.A.S.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGIUS, C.; ROBERTS, R.J. Review: Melano- macrophage centres and their role in fish pathology. **Journal of Fish Biology**, v 26, p 499-509, 2003.

ALLEN, T. Fish chromatophores as biomarkers of arsenic exposure. **Environmental Biology of Fishes**, v. 71, p. 7-11, 2004.

ASPENGREN, S.; HEDBERG, D.; SKÖLD, H.N.; WALLIN, M. New insights into melanosome transport in vertebrate pigment cells. *International Review of Cell and Molecular Biology*, v. 272, p. 245-302, 2009.

BAGNARA, J.T.; MATSUMOTO, J. 2006. Comparative anatomy and physiology of pigment cells in nonmammalian tissues. p. 11-59. **In The Pigmentary System: Physiology and Pathophysiology**. New York, Oxford: University Press, 2^a ed., 2006.

BARDIER, C., CANAVERO, A., MANEYRO, R. Temporal and Spatial Activity Patterns of Three Species in the *Leptodactylus fuscus* Group (Amphibia, Leptodactylidae). **South American Journal of Herpetology**, v.9, n.2, p.106–113, 2014.

BEATY, L.E.; NYARKO, K.; BERNAL, X. E. Light- induced changes in pigmentation through ontogeny in cane toad tadpoles (*Rhinella marina*). **Herpetological Journal**, v. 25, n.3, p.191-195, 2015.

BLAUSTEIN, A.R.; BANCROFT, B.A. Amphibian population declines: evolutionary considerations. **BioScience**, v. 57, p.437- 444, 2007.

BLAUSTEIN, A.R.; WAKE, D.B. The puzzle of declining amphibian populations. **Scientific American**, v.272, p.52-58, 1995.

BRÜHL, C.A., SCHMIDT, T., PIEPER, S., ALSCHER, A. Terrestrial pesticide exposure of amphibians: An underestimated cause of global decline? **Scientific Reports**, v.3, p.1-4. 2013.

CAMARGO, A.; DE SÁ R.O.; HEYER, W.R. Phylogenetic analyses of mtDNA sequences reveal three cryptic lineages in the widespread neotropical frog *Leptodactylus*

fuscus (Schneider,1799) (Anura: Leptodactylidae). **Biological Journal of the Linnean Society**, v.87, p.325–341, 2006.

CAMPANA, M.A. et al. Micronuclei induction in *Rana catesbeiana* tadpoles by the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. **Genetics and Molecular Biology**, v.26, n. 1, p. 99-103, 2003.

CARAFFA, E. et al. Determinación de la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos de *Bufo arenarum* que habitan ambientes urbanizados. **Acta Toxicológica Argentina**, v. 21, n. 2, p. 78-84, 2013.

COSTA, D.A. et al. Inquilines and Invertebrate Fauna Associated With Termite Nests of *Cornitermes cumulans* (Isoptera, Termitidae) in the Emas National Park, Mineiros, Goiás, Brazil. **Sociobiology**, v.53, n.2B, p.443-453, 2009.

CRUZ, J.C.; GARCIA, J.C.; PEREIRA FILHO, I.A.; PINTO, L.B.B.; QUEIROZ, L.R. **Embrapa Milho e Sorgo Circular Técnica, 124: Caracterização dos sistemas de produção de milho para altas produtividades**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2009.

DAIWILE, A.P.; NAOGHARE, P.K.; GIRIPUNJE, M.D.; RAO, P.P.; GHOSH, T.K.; KRISHNAMURTHI, K.; SIVANESAN, S. Correlation of melanophore index with a battery of functional genomic stress indicators for measurement of environmental stress in aquatic ecosystem. **Environmental Toxicology Pharmacology**, v.39, n.2, 486-495, 2015.

FRANCO-BELUSSI L, SKÖLD HN, OLIVEIRA C. Internal pigment cells respond to external UV radiation in frogs. **Journal of Experimental Biology**, v.219, p.1378-1383. doi:10.1242/jeb.134973, 2016.

FRANCO-BELUSSI, L.; LEITE, G. B; FREITAS, J S; OLIVEIRA, C. Morphological effects of bacterial compounds on the testes of *Eupemphix nattereri* (Anura). **Animal Biology (Print)**, v. 64, p. 261-275, 2014.

GALLONE, A.; GUIDA, G.; MAIDA, I.; CÍCERO, R. Spleen and liver pigmented macrophages of *Rana esculenta* L. A new melanogenic system? **Pigment Cell Research**, v 15, p 32-40, 2002.

GEHARA M, CRAWFORD AJ, ORRICO VGD, RODRÍGUEZ A, LÖTTERS S, et al. High Levels of Diversity Uncovered in a Widespread Nominal Taxon: Continental Phylogeography of the Neotropical Tree Frog *Dendropsophus minutus*. **Plos One**, v.9, n.9, e103958. doi:10.1371/journal.pone.0103958, 2014.

GIOZZA, T.P. et al. Riqueza e abundância relativa de mamíferos de médio e grande porte na região do Parque Nacional das Emas-GO. **Revista Brasileira de Zoociências**, v.18, n.3, p.71-87, 2017.

GONÇALVES, M.W. et al. Detecting genomic damages in the anuran *Dendropsophus minutus*: preserved versus perturbed areas. **Environmental Science Pollution Research**, v. 22, p.3947-3954, 2014.

GONÇALVES, M.W. et al. Detecting genomic damages in the frog *Dendropsophus minutus*: preserved versus perturbed areas. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 5, p. 3947-3954, 2015.

GONÇALVES, M.W., GAMBALE, P.G., GODOY, F.R., ALVES, A.A., REZENDE, P.H.A., CRUZ, A. D., MACIEL, N.M., NOMURA, F., BASTOS, R.P., MARCO-JR, P., SILVA, D.M. The agricultural impact of pesticides on *Physalaemus cuvieri* tadpoles (*Amphibia: Anura*) ascertained by comet assay. **Zoologia**, v.34, 2017. e19865 | doi: 10.3897/zoologia.34.e19865.

GONÇALVES, S.L. et al. **Rotação de Culturas. Circular Técnica, 45**. Londrina: Embrapa Soja, 2007.

GROSSO, J.R., BALDO, D. CANDIOTI, F.V. Heterochronic changes during embryonic development of neotropical foam nesting frogs (genus *Leptodactylus*). **Zoologischer Anzeiger**, v. 266, p.35-49, 2017.

HADDAD, C.F.B; PRADO, C. P.A. Reproductive Modes in Frogs and Their Unexpected Diversity in the Atlantic Forest of Brazil. **BioScience**, v.55, n.3, p.207, 2005.

HARRIS, M.L., CHORA, L., BISHOP, C.A. AND BOGART, J.P. Species- and age-related differences in susceptibility to pesticide-exposure for two amphibians, *Rana pipiens*, and *Bufo americanus*. **Bulletin of Environmental Contamination Toxicology**, v.64, p.263–70, 2000.

HAYES, T. B. et al. Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: Are we underestimating the impact? **Environmental Health Perspectives**, v.114, p.40-50, 2006.

HAYES, T.B. et al. The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's perspective. **The Journal of Experimental Biology**, v. 213, p. 921-933, 2010.

HERRICK, E.H. The structure of epidermal melanophores in frog tadpoles. **The Biological Bulletin**, v.64, n.3, p.304-308, 1933.

JHA, A.N. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. **Mutagenesis**, v. 23, n.3, p.207–221, 2008.

JOHANSSON, M., RÄSÄNEN, K. AND MERILÄ, J. Comparison of nitrate tolerances between different populations of the common frog, *Rana temporaria*. **Aquatic Toxicology**, v.54, p.1-14, 2001.

JOSENDE, M.E.; TOZETTI, A.M.; ALALAN, M.T.; FILHO, V.M.; DA SILVA XIMENEZ, S. Genotoxic evaluation in two amphibian species from Brazilian subtropical wetlands. **Ecological Indicators**, v.49, 83-87, 2015.

KANG, C. *et al.* Mudança de cor e padrão contra fundos visuais heterogêneos na rã de árvore *Hyla japonica*. **Scientific Reports**, n.6, 2016. 22601; doi: 10.1038 / srep22601.

KAUR, R.; DUA, A. Colour changes in *Labeo rohita* (Ham.) due topigment translocation in melanophores, on exposure to municipal wastewater of Tung Dhabdrain, Amritsar, India. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 39, p. 747-757, 2015.

KINDERMANN, C.; HERO, J.C. Pigment cell distribution in a rapid colour changing amphibian (*Litoria wilcoxii*). **Zoomorphology**, v.135, p.197–203, 2016. doi 10.1007/s00435-016-0303-1.

LANGONE, J.A., DE SÁ, R.O. Redescrición de la morfología larval externa de dos especies del grupo de *Leptodactylus fuscus* (Anura, leptodactilidae). **Phyllomedusa**, v.4, n.1, p.49-59, 2005.

MARKS, M.S.; SEABRA, M.C. The melanosome: membrane dynamics in black and white. **Nature Reviews Molecular and Cell Biology**, v.2, p.1-11, 2001.

MARTIN, L.B.; HOPKINS, W.A.; MYDLARS, L.D.; ROHR, J.R. The effects of anthropogenic global changes on immune functions and disease resistance. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1195, p.129–148, 2010. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05454.x.

MARTINI, G.A.; ROGERO, S.O.; ROGERO, J.R. Cytotoxic effects caused by N,N-diethyl-meta-toluamide and radiation in *Perna perna* mussels. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 12, n. 1, 2017, 33-37 doi: 10.5132/eec.2017.01.05.

MCGRAW, K.J. The antioxidant function of many animal pigments: are there consistent health benefits of sexually selected colourants? **Animal Behaviour**, v.69, 757-764, 2005.

MONTALVÃO, M.F. MALAFAIA, G. Effects of abamectin on bullfrog tadpoles: insights on cytotoxicity. **Environment Science and Pollution Research**, v.24, p. 23411–23416, 2017. doi 10.1007/s11356-017-0124-x.

MORAIS, A.R. et al. Anfíbios anuros associados a corpos d'água do sudoeste do estado de Goiás, Brasil. **Biota Neotropical**, v. 11, n. 3, p. 1-10, 2011.

NILSSON SKÖLD, H.; ASPENGREN, S.; WALLIN, M. Rapid color change in fish and amphibians - Function, regulation, and emerging applications. **Pigment Cell Melanoma Research**, v.26, p.29-38, 2013.

OLIVEIRA FILHO, J.C.; GIARETTA, A.A. Reproductive behavior of *Leptodactylus mystacinus* (Anura, Leptodactylidae) with notes on courtship call of other *Leptodactylus* species. **Iheringia**, v.98, n.4, p.508-515, 2008.

OLIVEIRA, C.; FRANCO-BELUSSI, L.; FANALI, L. Z.; SANTOS, L.R.S. Use of melanina- pigmented cells as a new tool to evaluate effects of agrochemicals and other emerging contaminants in Brazilian anurans. *Ecotoxicology and Genotoxicology: Non-traditional terrestrial models. Section II: Terrestrial Vertebrates as Experimental Models Chapter 6. Issues in Toxicology* n° 32, 2017.

OLIVEIRA, C.; FRANCO-BELUSSI, L. **Melanic pigmentation in ectothermic vertebrates: occurrence and function. In Melanin: Biosynthesis, Functions and Health Effects (ed. X.-P. Ma and X.-X. Sun)**, p. 213-226. Hauppauge, NY: Nova Publishers, 2012.

OLIVEIRA, H.N.; GLAESER, D.F.; BELLON, P.P. **Recomendações para obter um controle biológico mais eficaz da broca da cana de açúcar**. Dourados: Embrapa agropecuária oeste. Comunicado técnico, 181, 2012.

PÉREZ-IGLESIAS, J.M.; FRANCO-BELUSSI, L.; MORENO, L.; TRIPOLE, S.; OLIVEIRA, C.; NATALE, G.S. Effects of glyphosate on hepatic tissue evaluating melanomacrophages and erythrocytes responses in neotropical anuran *Leptodactylus latinasus*. **Environmental Science and Pollution Research International**, v.23, p.9852–9861, 2016. doi 10.1007/s11356-016-6153-z

PÉREZ-IGLESIAS, J.M.; SOLONESKI, S.; NIKOLOFF, N.; NATALE, G.S.; LARRAMENDY, M. L. Toxic and genotoxic effects of the imazethapyr- based herbicide formulation Pivot H® on Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.119, 15-24, 2015.

PIGNATI, W.A., SOUZA LIMA, F.A.N., LARA, S.S., CORREA, M.L.M., BARBOSA, J.R., LEÃO, L.H.C., PIGNATTI, M.G. Spatial distribution of pesticide use in Brazil: a strategy for Health Surveillance. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.22, n.10, p.3281-3293, 2017. doi: 10.1590/1413-812320172210.1774.

POLO-CAVIA, N.; GOMEZ-MESTRE, I. Pigmentation plasticity enhances crypsis in larval newts: associated metabolic cost and background choice behaviour. **Scientific Reports**, v.7, 39739, 2017. | DOI: 10.1038/srep39739, 2017.

POMBAL JR., J.P.; HADDAD, C.F.B. Estratégias e modos reprodutivos de anuros (*Amphibia*) em uma poça permanente na Serra de Paranapiacaba, Sudeste do Brasil. **Papéis Avulsos de Zoologia**, v. 45, n. 15, p. 215-229, 2005.

PROTA, G. **Melanins and melanogenesis**. Academic Press, New York, 1992.

RELYEA, R.A. A cocktail of contaminants: how mixtures of pesticides at low concentrations affect aquatic communities. **Oecologia**, v.159, p.363-376.2009.

ROHR, J.R.; McCOY, K.A. A Qualitative Meta-Analysis Reveals Consistent Effects of Atrazine on Freshwater Fish and Amphibians. **Environmental Health Perspectives**, v.118, n.1, p.20-32, 2010.

ROHR, J.R.; RAFFEL, T.R.; SESSIONS, S.K.; HUDSON, P.J. Understanding the net effects of pesticides on amphibian trematode infections. **Ecological Applications**, v.18, n.7, p. 1743–1753, 2008.

ROSSA-FERES, D.C AND NOMURA, F. Characterization and taxonomic key for tadpoles (*Amphibia: Anura*) from the northwestern region of São Paulo State, Brazil. **Biota Neotropical**, v.5, n.2, 2006. doi.org/10.1590/S1676-06032006000100014.

ROZANOWSKA, M.; SARNA, T.; LAND E.J. et al. Propriedades de eliminação de radicais livres da interação melanina de modelos eu e pheo-melanina com radicais redutores e oxidantes. **Free Radical Biology and Medicine**, v.26, p. 518-525, 1999.

SALIM, S.; ALI, S.A. Vertebrate melanophores as potential model for drug discovery and development: a review. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v.16, p. 162-200, 2011. doi: 10.2478/s11658-010-0044-y.

SANTOS, L.R.S. et al. Effects of thermal stress on hepatic melanomacrophages of *Eupemphix nattereri* (Anura). **The Anatomical Record**, v. 297, p. 864-875, 2014.

SCHARTL, M.; LARUE, L.; GODA, M.; BOSENBERG, M.W.; HASHIMOTO, H.; KELSH, R.N. What is a vertebrate pigment cell? **Pigment Cell and Melanoma Research**, v.29, n.1, p.8-14, 2015.

SICHEL, G.; SCALIA, M.; MONDIO, F.; CORSARO, C. 1997. The amphibian Kupffer cells build and demolish melanosomes: an ultrastructural point of view. **Pigment Cell and Melanoma Research**, v.10, p 271-287, 1997.

SILVA, H.S.V.P.; LOIOLA, C.; PEREIRA, S.R.F.; SANTOS, R.L.; ANDRADE, G.V.; NUNES, G.S. Toxicidade aguda e genotoxicidade do agrotóxico comercial folisuper 600br a girinos de *Physalaemus cuvieri* (Anura: *Leiuperidae*). **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 23, p. 1-10, 2013.

SILVANO D, AZEVEDO-RAMOS C, MARCA EL et al. *Dendropsophus minutus*. In: **IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species**. 2010. Accessed 22 out 2017.

SMITH, G.R., BURGETT, A. A. Effects of Three Organic Wastewater Contaminants on American Toad, *Bufo americanus*, Tadpoles. **Ecotoxicology**, v.14, p.477–482, 2005.

SPARLING, D.W.; LINDER, G.; BISHOP, C.A.; KREST, S.K. **Ecotoxicology of amphibians and reptiles**. Boca Raton, Florida: CRC Press/ SETAC Books, 2010.

SPARLING, D.W.; FELLERS, G.M. Toxicity of two insecticides to California, USA, anurans and its relevance to declining amphibian populations. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v 28, p 1696–1703, 2009.

SVENSSON, P.A., FORSGREN, E., AMUNDSEN, T. and SKÖLD, H.N. Chromatic interaction between egg pigmentation and skin chromatophores in the nuptial coloration of female two-spotted gobies. **Journal of Experimental Biology**, n. 208, p. 4391-4397, 2005.

THIBAudeau, G; ALTING, R. Coloration of Anuran Tadpoles (*Amphibia*): Development, Dynamics, Function, and Hypotheses. **International Scholarly Research Network ISRN Zoology**. doi:10.5402/2012/725203, 2012.

TOWNSEND, C. R. Recomendações técnicas para o cultivo da cana-de-açúcar forrageira em Rondônia. **Embrapa Rondônia**, n.21, p. 1-5, 2000.

USINOVA. **Usina Nova Gália Ltda. 2017**. Disponível em: <<http://novagalia.webnode.com/>>. Acesso em 10 janeiro de 2018.

VENTURINO, A.; ROSENBAUM, E.; CABALLERO DE CASTRO, A.; ANGUIANO, O. L.; GAUNA, L.; FONOVICH DE SCHROEDER, T.; D'ANGELO, A.M.P. Biomarkers of effect in toads and frogs. **Journal Biomarkers**. v 8 167-86, 2003.

WALLIN, M. Nature's palette: How animals, including humans, produce colours. **Bioscience Explained**, v.1, n.2, p.1-12, 2002.

ZIERI R, TABOG A SR, OLIVEIRA C. Melanocytes in the testes of *Eupemphix nattereri* (Anura, Leiupe ridae): histological, estereo-logical and ultrastructural aspects. **The Anatomical Record**, v. 290, p.795–800, 2007.

CONCLUSÃO GERAL

Conclui-se que a análise de escurecimento corpóreo pode ser utilizada como um biomarcador dos efeitos de contaminantes agrícolas, visto que os resultados mostraram que houve diferença na coloração de larvas de *D. minutus* e *L. fuscus* de ambientes antropizados, em relação ao ambiente preservado.