

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

**ESTUDOS ECOTOXICOLÓGICOS ENVOLVENDO O
GÊNERO *RHINELLA*: UMA ABORDAGEM
CIENCIOMÉTRICA E ANÁLISES GENOTÓXICAS.**

Autora: Ellen Kristine Silva Costa Souza
Orientadora: Dra Lia Raquel de Souza Santos
Coorientador: Dra Maria Andréia Corrêa Mendonça

RIO VERDE – GO
Fevereiro de 2022

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

**ESTUDOS ECOTOXICOLÓGICOS ENVOLVENDO O
GÊNERO *RHINELLA*: UMA ABORDAGEM
CIENCIOMÉTRICA E ANÁLISES GENOTÓXICAS.**

Autora: Ellen Kristine Silva Costa Souza
Orientadora: Dra. Lia Raquel de Souza Santos
Coorientador: Dra Maria Andréia Corrêa Mendonça

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.

RIO VERDE – GO
Fevereiro de 2022

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

CES82e Costa, Ellen Kristine
ESTUDOS ECOTOXICOLÓGICOS ENVOLVENDO O GÊNERO
RHINELLA: UMA ABORDAGEM CIENCIOMÉTRICA E ANÁLISES
GENOTÓXICAS. / Ellen Kristine Costa; orientadora Lia
Raquel Santos; co-orientadora Maria Andréia Mendonça.
-- Rio Verde, 2022.
66 p.

Dissertação (Mestrado em Biodiversidade e
Conservação) -- Instituto Federal Goiano, Campus Rio
Verde, 2022.

1. Ecotoxicidade. 2. revisão. 3. pesticidas. 4.
dano genotóxico.. 5. girinos. I. Santos, Lia Raquel,
orient. II. Mendonça, Maria Andréia, co-orient. III.
Título.

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO

PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS

NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610, de 19 de fevereiro de 1998, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano a disponibilizar gratuitamente o documento em formato digital no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

IDENTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Tese (doutorado) | <input type="checkbox"/> Artigo científico |
| <input checked="" type="checkbox"/> Dissertação (mestrado) | <input type="checkbox"/> Capítulo de livro |
| <input type="checkbox"/> Monografia (especialização) | <input type="checkbox"/> Livro |
| <input type="checkbox"/> TCC (graduação) | <input type="checkbox"/> Trabalho apresentado em evento |

Produto técnico e educacional - Tipo:

Nome completo do autor:
Ellen Kristine Silva Costa Souza

Matrícula:
2020102310840063

Título do trabalho:
ESTUDOS ECOTOXICOLÓGICOS ENVOLVENDO O GÊNERO RHINELLA: UMA ABORDAGEM CIENCIOMÉTRICA E ANÁLISES GENOTÓXICAS.

RESTRIÇÕES DE ACESSO AO DOCUMENTO

Documento confidencial: Não Sim, justifique:

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIIF Goiano: 22 /04 /2022

O documento está sujeito a registro de patente? Sim Não

O documento pode vir a ser publicado como livro? Sim Não

DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O(a) referido(a) autor(a) declara:

- Que o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
- Que obteve autorização de quaisquer materiais inclusos no documento do qual não detém os direitos de autoria, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
- Que cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Rio Verde, GO
Local

21 /04 /2022
Data

Ellen Kristine Silva Costa Souza

Assinatura do autor/ê/ou detentor dos direitos autorais

Ciente e de acordo:

Lia Raquel de Souza Santos Borges

Assinatura do(a) orientador(a)



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO

Documentos 28/2022 - NREPG-RV/CPG-RV/DPGPI-RV/CMPRV/IFGOIANO

ESTUDOS ECOTOXICOLÓGICOS ENVOLVENDO O GÊNERO *RHINELLA*: UMA ABORDAGEM
CIENCIOMÉTRICA E ANÁLISES GENOTÓXICAS

Autora: Ellen Kristine Silva Costa Souza
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Lia Raquel de Souza Santos Borges

TITULAÇÃO: Mestre em Biodiversidade e Conservação - Área de Concentração Conservação dos
Recursos Naturais

APROVADA em 21 de fevereiro de 2022.

Prof. Dr. Vitor Hugo Mendonça do
Prado
Avaliador externo - UEG

Prof. Dr. Fábio Martins Vilar de
Carvalho
Avaliador externo - IF Goiano /
Rio Verde

Prof.^a Dr.^a Lia Raquel de Souza Santos Borges
Presidente da Banca - IF Goiano / Rio Verde

Documento assinado eletronicamente por:

- Vitor Hugo Mendonça do Prado, Vitor Hugo Mendonça do Prado - Professor Avaliador de Banca - Ueg (01112580000171), em 21/02/2022 16:29:23.
- Fabio Martins Vilar de Carvalho, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 21/02/2022 11:30:35.
- Lia Raquel de Souza Santos Borges, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 21/02/2022 11:22:32.

Este documento foi emitido pelo SUAP em 15/02/2022. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse <https://suap.ifgoiano.edu.br/autenticar-documento/> e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 358516
Código de Autenticação: 4fe1ab2fd3



INSTITUTO FEDERAL GOIANO
Campus Rio Verde
Rodovia Sul Goiana, Km 01, Zona Rural, None, RIO VERDE / GO, CEP 75901-970
(64) 3620-5600

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

**ESTUDOS ECOTOXICOLÓGICOS ENVOLVENDO O
GÊNERO *RHINELLA*: UMA ABORDAGEM
CIENCIOMÉTRICA E ANÁLISES GENOTÓXICAS.**

Autora: Ellen Kristine Silva Costa Souza
Orientadora: Dra. Lia Raquel de Souza Santos

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

APROVADA em 21 de fevereiro de 2022.

Prof. Dr. Vitor Hugo M. do Prado
Avaliador externo
Universidade Estadual de Goiás
UEG campus Anápolis

Prof. Dr. Fábio Martins V. de Carvalho
Avaliador interno
Instituto Federal Goiano
IF Goiano, campus Rio Verde

Prof.^a Dra. Lia Raquel de Souza Santos
Presidente da Banca
Instituto Federal Goiano
IF Goiano, campus Rio Verde

Dedicatória

A Deus, por Ele e para Ele são todas as coisas. A minha filha Liz fonte de inspiração diária. A meu esposo, companheiro de todas as horas. Meus pais e irmãos que sempre acreditaram nos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

A Deus que me permitiu estar onde estou, deu-me forças para não desistir, saber para executar esse trabalho e fé para ter certeza de que chegaria esse momento.

À minha filha Liz, minha companheira desde o meu ventre nessa empreitada, seu sorriso me faz sentir capaz de qualquer coisa e todos os meus planos são pensando em você. Ao meu esposo, Leonardo, pelo apoio, companheirismo e paciência.

Aos meus pais, Janilda e João Adécio, por acreditarem em mim e me apoiarem sempre que preciso. Aos meus irmãos, Weiner e Abner, que são os exemplos que procuro seguir e por sempre estarem dispostos a me ajudar.

À minha orientadora, professora Dra. Lia Raquel de Souza Santos, por me compreender, acreditar em mim, também por todo aprendizado e orientações. Uma mulher que inspira muitas outras mulheres! Agradeço imensamente por todo cuidado e carinho comigo e com minha família.

A minha coorientadora, professora Dra Maria Andréia Corrêa Mendonça, por aceitar o convite para me auxiliar durante toda trajetória do mestrado, passar seus conhecimentos científicos e ser compreensiva com os desafios que enfrentei durante minha trajetória do mestrado.

Ao Professor Rinneu Elias Borges e aos pesquisadores e doutorandos Me. Marcelino Benvindo-Souza, Me. Rhayane Alves Assis e Me. Cirley Gomes Araújo dos Santos pela contribuição na realização deste estudo, sendo participantes desde as coletas para realização do experimento até nas análises dos dados e na escrita. Vocês foram peças-chaves para tornar-me capaz de alcançar êxito neste trabalho.

Aos meus professores e colegas que fazem parte da comissão de divulgação do PPGBio, por apresentar uma nova função, pela qual vieram grandes aprendizados.

Ao Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde e ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação (PPGBIO), por me acolherem mesmo vindo de outra instituição e me proporcionarem a possibilidade de cursar o mestrado com fornecimento dos recursos necessários para a realização deste trabalho.

A Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse sonho.

DEUS ABENÇOE A TODOS!

BIOGRAFIA DA AUTORA

Ellen Kristine Silva Costa Souza, natural de Rio Verde, Goiás, nascida em 1994, filha de Janilda Aparecida Silva Costa e João Adélcio Alves Costa. Concluiu o ensino médio no Colégio Dom Cabral, na cidade de Campo Belo – MG, no ano de 2011. Sua graduação em Engenharia Ambiental foi realizada na Universidade Federal de Viçosa (UFV) em Viçosa - MG, com início em março de 2012. Durante a graduação foi voluntária no Laboratório de Celulose e Papel por um ano, bolsista de iniciação científica Probic/FapemigUFV e estagiária com remuneração no Laboratório de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFV, finalizando sua graduação em dezembro de 2016. Após sua formatura foi empreendedora no ramo de paisagismo, mas sempre pensando na possibilidade de dar continuidade nos estudos. Casou-se em abril de 2017 e no final do ano de 2019, mudou com seu esposo para cidade de Rio Verde – GO. Por meio da retificação do edital nº 16, veio a oportunidade de ingressar no Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação, no IFGoiano campus Rio Verde no ano de 2020. Após algumas semanas da aprovação, descobriu uma gestação inesperada, um motivo para desistência ou adiamento deste sonho. Mas, mesmo com esse desafio, resolveu insistir e tentar, sabendo que o esforço seria dobrado, pois aliar os estudos com a maternidade não seria fácil. Um mês após o resultado iniciou a pandemia do Covid 19, restringindo todas as atividades do campus e trazendo grandes preocupações sobre o que era desconhecido. Durante esses dois anos de mestrado grandes desafios foram enfrentados, mas, em fevereiro de 2022 finaliza esta grande empreitada.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE TABELAS	8
ÍNDICE DE FIGURAS	9
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIACÕES.....	11
RESUMO GERAL	11
GENERAL ABSTRACT.....	12
1. INTRODUÇÃO.....	14
REFERÊNCIAS	15
2. OBJETIVOS.....	17
Objetivo Geral:	187
Objetivos Específicos:	187
3. CAPÍTULO I.....	218
3.1 INTRODUÇÃO	20
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.3 RESULTADOS	21
3.4 DISCUSSÃO	21
3.5 CONCLUSÃO	26
3.6 REFERÊNCIAS	27
Material Suplementar	32
4. CAPÍTULO II.....	42
4.1 INTRODUÇÃO	44
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.3 RESULTADOS	48
4.4 DISCUSSÃO	51
4.5 CONCLUSÃO	54
4.6 REFERÊNCIAS	55
Material Suplementar	60
5. CONCLUSÃO GERAL	65

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO I - CONTRIBUIÇÃO CIENTÍFICA MUNDIAL DE ESTUDOS COM ECOTOXICOLOGIA ENVOLVENDO O GÊNERO *RHINELLA*

Página

Tabela 1. Espécies do gênero <i>Rhinella</i> investigadas em estudo ecotoxicológicos, distribuição geográfica e número de artigos publicados por espécie.....	22
Tabela 2: Síntese de artigos que avaliaram o gênero <i>Rhinella</i>	32

CAPÍTULO II - EFEITOS GENOTÓXICOS EM ANUROS DE *RHINELLA DIPTYCHA* DE ÁREA AGRÍCOLA E URBANA NO CERRADO.

Página

Tabela 1. Frequência média de micronúcleo e outras anormalidades nucleares eritrocitárias de animais coletados em ambiente agrícola e urbano.....	60
Tabela 2. Frequência média de dano genotóxico de animais de áreas agrícola e urbana estudadas para controle negativo.....	60
Tabela 3. Análise físico-química da água nas áreas amostradas.....	61
Tabela 4. Resultado da Análise de pesticidas em Área Agrícola.....	61
Tabela 5. Resultado da Análise Química da água de Área Urbana.....	62
Tabela 6. Análise físico-química da água controle negativo.....	64

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I - CONTRIBUIÇÃO CIENTÍFICA MUNDIAL DE ESTUDOS COM ECOTOXICOLOGIA ENVOLVENDO O GÊNERO *RHINELLA*

	Página
Figura 1. Quantidade de artigos encontrados e selecionados na base de dados <i>ISI Web of Science</i>	21
Figura 2. Porcentagem de xenobióticos testados nos estudos com <i>Rhinella</i> nos últimos 12 anos.....	23
Figura 3: Contribuição global de artigos com dados ecotoxicológicos com animais do gênero <i>Rhinella</i>	25
Figura 4. Variação temporal no número de artigos publicados entre 2009 a agosto de 2021 com estudos envolvendo <i>Rhinella</i> como indicador de poluição ambiental.....	25

CAPÍTULO II - EFEITOS GENOTÓXICOS EM ANUROS DE *RHINELLA DIPTYCHA* DE ÁREA AGRÍCOLA E URBANA NO CERRADO.

	Página
Figura 1. Área de amostragem em ambiente de área agrícola e urbana. O círculo preto ao centro de cada imagem representa o ponto de coleta dos espécimes.....	45
Figura 2. Processo de obtenção de amostra biológica para a realização do teste de micronúcleo.....	47
Figura 3. Média e erro padrão da frequência de micronúcleo e outras anormalidades eritrocitárias nucleares entre ambientes.....	49
Figura 4. Frequência da média de dano genotóxico em animais de área agrícola e seu respectivo controle negativo.....	50
Figura 5. Frequência média e erro padrão de micronúcleo e das anormalidades eritrocitárias nucleares em animais da área urbana e controle negativo.....	51

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIACÕES

AENs: Alterações eritrocitárias nucleares
AN: Célula Anucleada, μm : Micrômetros
BN: Célula Binucleada
BR: Broto Nuclear
CAA: Controle Área Agrícola
CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior
CAU: Controle Área Urbana
cel: células
CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais
CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente
CONICET: Conselho Nacional de Pesquisas Científicas e Técnicas
DNA: Ácido Desoxirribonucleico
E.A.: Em Análise.
Gly: Glifosato
H-E: Hematoxilina-Eosina
ICMBio: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
IFGoiano: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano
IUCN: União Internacional para Conservação da Natureza
LQ: Limite de Quantificação
MN: Micronúcleo
MNAA: Micronúcleo Área Agrícola
MNAU: Micronúcleo Área Urbana
N.A.: Não Aplicável
NE: Núcleo Entalhado
NL: Núcleo Lobado
NR: Não Há Recomendação
NR: Núcleo Reniforme
NS: Núcleo Segmentado
NTU: Unidades Nefelométricas de Turbidez
pH: Potencial Hidrogeniônico
TDS: Sólidos Totais Dissolvidos
UFC: Unidade formadora de colônia
uH: Unidade da cor pelo Hazen em mg/L Pt-Co
V.A.: Virtualmente ausente
VMP: Valor Máximo Permitido

RESUMO GERAL

COSTA, E. K. S. Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – fevereiro de 2022. **Estudos ecotoxicológicos envolvendo o gênero *Rhinella*: uma abordagem cienciométrica e análises genotóxicas.** Orientadora: Lia Raquel de Souza Santos. Coorientadora: Maria Andréia Corrêa Mendonça

A ação decorrente da expansão das áreas urbana e agrícola, podem causar desequilíbrio no ecossistema e atingir organismos não alvos, como os anfíbios. Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo investigar a contribuição científica dos estudos ecotoxicológicos envolvendo animais do gênero *Rhinella*. Como resultado desta investigação, tem-se que o primeiro estudo ecotoxicológico com anfíbios data de 1952, mas somente em 2009 foram publicados os primeiros trabalhos com este gênero. A espécie *R. arenarum* foi a mais encontrada na bibliografia, sendo localizada em mais de 64% do total de estudos. Os pesticidas foram os contaminantes mais testados nas pesquisas, seguidos dos metais pesados. O gênero *Rhinella* possui cerca de 90 espécies e apenas 8 foram encontradas nos trabalhos, refletindo o longo caminho a ser percorrido a fim de preencher lacunas de conhecimento sobre dados ecotoxicológicos para as espécies e proteger a biodiversidade dos impactos gerados pelas ações antrópicas. Associado a esse contexto, e de modo a diminuir as lacunas de conhecimento, foi realizado um estudo que investigou a susceptibilidade de dano genotóxico em girinos de *Rhinella diptycha* expostos em ambiente urbano e agrícola no município de Rio Verde, Goiás, Brasil. O experimento foi projetado para uma investigação *in situ* e em laboratório, com análise da capacidade de recuperação do dano. Os resultados mostraram que animais de área agrícola apresentaram maior frequência de dano genotóxico comparados aos de ambiente urbano. Também, os animais da área urbana, apresentaram células como binucleadas e entalhadas, anormalidades nucleares, com maior frequência quando comparados com os animais que estavam em área de lavouras. Quando comparado as amostras *in situ* com as do controle negativo, ou seja, aqueles que permaneceram em água limpa, foi observada diminuição na frequência de dano. Com isso, este estudo demonstra que anuros de área agrícola são susceptíveis a dano genotóxico e ainda, mais estudos devem ser realizados, especialmente utilizando múltiplos biomarcadores para *R. diptycha*.

PALAVRAS-CHAVE: Ecotoxicidade; revisão; pesticidas; dano genotóxico; girinos.

GENERAL ABSTRACT

COSTA, E. K. S. Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde- February 2022. **Ecotoxicological studies involving the genus *Rhinella*: a scientemetric approach and genotoxic analysis.** Advisor: Lia Raquel de Souza Santos. Co-supervisor: Maria Andréia Corrêa Mendonça

The action resulting from the expansion of urban and agricultural areas can cause an imbalance in the ecosystem and reach non-target organisms, such as amphibians. In this sense, this work aimed to investigate the scientific contribution of ecotoxicological studies involving animals of the genus *Rhinella*. As a result of this investigation, the first ecotoxicological study with amphibians dates from 1952, but only in 2009 the first works with this genus were published. The species *R. arenarum* was the most found in the bibliography, being found in more than 64% of the total of studies. Pesticides were the most tested contaminants in research, followed by heavy metals. The genus *Rhinella* has about 90 species and only 8 were found in the work, which reflects the long way to go to fill knowledge gaps on ecotoxicological data for the species and protect biodiversity from the impacts generated by human actions. Associated with this context, and to reduce the knowledge gaps, a study was carried out to investigate the susceptibility to genotoxic damage in *Rhinella diptycha* tadpoles exposed in urban and agricultural environments in the municipality of Rio Verde, Goiás, Brazil. The experiment was designed for one in situ and one laboratory investigation, with analysis of the damage recovery capacity. The results showed that animals from agricultural areas showed a higher frequency of genotoxic damage compared to those from urban environments. Also, the animals from the urban area, showed cells as binucleated and notched, nuclear abnormalities, more frequently when compared to the animals that were in crops area. When comparing the in situ samples with those of the negative control, that is, those that remained in clean water, a decrease in the frequency of damage was observed. Thus, this study demonstrates that anurans from agricultural areas are susceptible to genotoxic damage and further studies should be carried out, especially using multiple biomarkers for *R. diptycha*.

KEYWORDS: Ecotoxicity; revision; pesticides; genotoxic damage; tadpoles.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O exponencial crescimento da população humana tem demandado aumento na produção agrícola mundial e, conseqüentemente, uso intensificado de pesticidas (Köhler e Triebkorn, 2013). Concomitantemente, a substituição de paisagens naturais por edifícios, indústrias e áreas agrícolas, vem causando graves mudanças no meio ambiente (Wang et al., 2013), e gerando impacto direto nos ecossistemas (Lajmanovich et al. 2003; Widder e Bidwell 2006; Blaustein et al. 2011; Peltzer et al. 2011; Andrade e Castro 2012; Caraffa et al. 2013; Minambiente 2014). Dentre esses impactos citam-se a biodisponibilidade de pesticidas em corpos d'água de áreas agrícolas, seja por aplicação direta, deriva e / ou escoamento (Wagner et al. 2014), como também as emissões de metais pesados e outros contaminantes industriais, os quais alteram consideravelmente a estrutura dos ecossistemas e representam, portanto, risco potencial para organismos não alvo, como os anfíbios (Croteau et al., 2008).

Os anfíbios representam atualmente o grupo de animais vertebrados mais ameaçado mundialmente, com 41% das espécies em perigo de extinção (IUCN, 2021). Várias causas têm motivado esse declínio, como destruição de habitat, aumento da suscetibilidade a doenças, mudanças climáticas e contaminação por xenobióticos (Smalling et al. 2015). Esses animais são individualmente sensíveis à poluição, pois possuem um ciclo de vida bifásico e pele altamente permeável, permitindo a fácil absorção de contaminantes (Quaranta et al. 2009). Além disso, embriões e larvas são depositados em habitats aquáticos tornando-os mais expostos aos poluentes (Brühl et al. 2013).

A qualidade ambiental da água tem sido analisada através dos parâmetros físico-químicos com valores de referência e classificações de poluentes prioritários. Entretanto, tem sido insuficiente para resguardar o ambiente aquático a fim de preservá-lo. Com isso, atualmente, tem se empregado o uso de bioensaios e biomarcadores de toxicidade para o monitoramento da qualidade ambiental, que têm crescido globalmente e, vem representando importante avanço na avaliação ecotoxicológica de ambientes aquáticos (Roig et al. 2015; Castro-Català et al. 2016). Mais especificamente, o teste do micronúcleo (MN) aponta dano genotóxico através da presença de macrolesões de DNA (Lajmanovich et al., 2012; Cabagna et al., 2006;

Ossana e Salibián, 2013). Este teste é simples, sensível e confiável e seus resultados são obtidos em tempo recorde para examinar o dano genético (Fenech 2000).

Destarte, um dos objetivos deste estudo foi investigar os artigos publicados com dados ecotoxicológicos envolvendo animais do gênero *Rhinella* (com 89 espécies, Frost, 2022). E, com toda a problemática ambiental apresentada, o segundo capítulo objetivou analisar os efeitos da qualidade da água de áreas urbana e agrícola, do município de Rio Verde - GO, à organismos não alvos, por meio de análises físico-química e análises ecotoxicológicas. Assim, com o intuito de preencher lacunas de conhecimento sobre as espécies de anfíbios nativas que se utilizam desses ambientes, foram utilizados como organismo teste, girinos da espécie *Rhinella diptycha*. Esse anuro, conhecido popularmente como sapo cururu possui ampla distribuição na América do Sul, encontrado no Brasil, Paraguai, Bolívia, Argentina e Uruguai (Frost, 2021), inclusive no Cerrado Brasileiro (Colli et al., 2002), sendo comum ser encontrado em áreas abertas e urbanas do município de Rio Verde.

REFERÊNCIAS

Andrade G, Castro L (2012) Degradación, pérdida y transformación de la biodiversidad continental en Colombia, invitación a una interpretación socioecológica. *Ambiente y Desarrollo* 16:53-71

Blaustein AR, Han BA, Relyea RA, Johnson PJT, Buck JC, Gervasi SS, Kats LB (2011) The complexity of amphibian population declines: understanding the role of cofactors in driving amphibian losses. *Ann N Y Acad Sci* 1223:108-119

Brühl CA, Schmidt T, Pieper S, Alscher A (2013) Terrestrial pesticide exposure of amphibians: an underestimated cause of global decline? *Sci Rep* 3:1135. <https://doi.org/10.1038/srep01135>

Cabagna, M. C.; Lajmanovich, R. C.; Peltzer, P. M.; Attademo, A. M; Ale, E. Induction of Micronuclei in Tadpoles of *Odontophrynus americanus* (Amphibia: Leptodactylidae) by the Pyrethroid Insecticide Cypermethrin. *Toxicol. Environ. Chem.* 2006, 88, 729-737.

Caraffa E, Bionda C, Pollo F, Salas N, Martino A (2013) Determinación de la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos de *Bufo arenarum* que habitan ambientes urbanizados. *Acta Toxicol Argent* 21:78-84

Castro-Català, N.; Kuzmanovic, M.; Roig, N.; Sierra, J.; Ginebreda, A.; Barceló, D.; Pérez, S.; Petrovic, M.; Picó, Y.; Schuhmacher, M.; Muñoz, I. (2016) Ecotoxicity of sediments in rivers: Invertebrate community, toxicity bioassays and the toxic unit approach as complementary assessment tools. *Sci Total Environ* 540:297–306

Colli, G.R.; Bastos, R.P.; Araújo, A.F.B. The character and dynamics of the Cerrado Herpetofauna. In: OLIVEIRA, P.S., MARQUIS, R.J., (Eds.), *The Cerrados of*

Brazil: Ecology and Natural History of a Neotropical Savanna, New York, USA, Columbia University Press, p. 233–241, 2002.

Croteau, M.C., Hogan, N., Gibson, J.C., Lean, D., Trudeau, V.L., 2008. Toxicological threats to amphibians and reptiles in urban environments. *Urban herpetology. Herpetological Conservation* 3, 197–209.

Fenech M (2007) Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc* 2(5):1084-1104. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.77>

Frost, D.R. (2010): Amphibian Species of the World: an online reference. Version 5.4. Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. New York: American Museum of Natural History.

Frost, D.R. 2022. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Disponível em: <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/>. Acessado em 18/02/2022

International Union for Conservation of Nature (2021) The IUCN red list of threatened species. <https://www.iucnredlist.org/>. Accessed 15 Dec 2021.

Köhler HR, Triebkorn R (2013) Wildlife ecotoxicology of pesticides: can we track effects to the population level and beyond? *Science* 341(6147):759-765. <https://doi.org/10.1126/science.1237591>

Lajmanovich R, Lorenzatti E, de la Sierra P, Marino F, Stringhini G, Peltzer P (2003) Reduction in the mortality of tadpoles (*Physalaemus biligonigerus*, Amphibia: Leptodactylidae) exposed to cypermethrin: uptake by aquatic ferns. *Fresenius Environ Bull* 12:1558-1561

Lajmanovich, R. C.; Peltzer, P. M.; Attademo, A. M.; Cabagna-Zenklusen, M. C.; Junges, C. M. Los Agroquímicos y su Impacto Em Los Anfíbios: um Dilema de Difícil Solução. *Química Viva*, 2012, 11, 184-198.

Minambiente (2014) Quinto Informe Nacional de Biodiversidad de Colombia ante el Convenio de Diversidad Biológica. Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo, Bogotá, D.C 101 p

Ossana, N. A.; Salibián, A. Micronucleus Test for Monitoring the Genotoxic Potential of the Surface Water of Luján River (Argentina) Using Erythrocytes of *Lithobates catesbeianus* Tadpoles. *J. Braz. SOc. Ecotoxicol.* 2013, 8, 67-74.

Peltzer PM, Lajmanovich RC, Sanchez LC, Attademo AM, Junges CM, Bionda CL, Martino AL, Bassó A (2011) Morphological abnormalities in amphibian populations from the mid-eastern region of Argentina. *Herpetol Conserv Biol* 6:432-442

Quaranta A, Bellantuono V, Cassano G, Lippe C (2009) Why amphibians are more sensitive than mammals to xenobiotics. *PLoS One* 4(11): e7699. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007699>

Roig, N.; Sierra, J.; Nadal, M.; Moreno-Garrido, I.; Nieto, E.; Hampel, M.; Gallego, E.P.; Schuhmacher, M.; Blasco, J. (2015) Assessment of sediment ecotoxicological status as a complementary tool for the evaluation of

surfacewater quality: the Ebro river basin case study. *Sci Total Environ* 503–504:269–278

Smalling KL, Reeves R, Muths E, Vandever M, Battaglin WA, Hladik ML, Pierce CL (2015) Pesticide concentrations in frog tissue and wetland habitats in a landscape dominated by agriculture. *Sci Total Environ* 502:80-90. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.08.114>

Wagner N, Rödder D, Brühl CA, Veith M, Lenhardt PP, Lötters S (2014) Evaluating the risk of pesticide exposure for amphibian species listed in Annex II of the European Union Habitats Directive. *Biol Conserv* 176:64-70. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.05.014>

Wang, S., He, Q., Ai, H., Wang, Z., Zhang, Q., 2013. Pollutant concentrations and pollution loads in stormwater runoff from different land uses in Chongqing. *J. Environ. Sci.* 25, 502–510.

Widder PD, Bidwell JR (2006) Cholinesterase activity and behavior in chlorpyrifos-exposed *Rana sphenoccephala* tadpoles. *Environ Toxicol Chem* 25(9):2446-3454

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Investigar a contribuição científica mundial, com dados ecotoxicológicos envolvendo animais do gênero *Rhinella* e avaliar os possíveis impactos de áreas agrícola e urbana sobre larvas de *Rhinella diptycha*, através da aplicação do teste do micronúcleo (MN) e de outras alterações eritrocitárias nucleares (AENs).

Objetivos Específicos:

- Investigar as espécies do gênero *Rhinella* analisadas em estudos ecotoxicológicos desde o primeiro estudo até o final do ano de 2021 em uma escala mundial, sua distribuição geográfica, os estressores ambientais testados ou encontrados e a tendência de produção científica com esse gênero;
- Analisar a frequência de células micronucleadas e demais alterações eritrocitárias nucleares (AENs) que se apresentam no sangue periférico dos girinos coletados em ambientes urbanos e agrícolas;
- Analisar a frequência de células micronucleadas e demais alterações eritrocitárias nucleares (AENs) nos animais expostos ao controle negativo;

3. CAPÍTULO I

CONTRIBUIÇÃO CIENTÍFICA MUNDIAL DE ESTUDOS COM
ECOTOXICOLOGIA ENVOLVENDO O GÊNERO *RHINELLA*

Contribuição científica mundial de estudos com ecotoxicologia envolvendo o gênero *Rhinella*

Ellen Kristine Silva Costa¹, Marcelino Bem-vindo Souza^{1,2}, Cirley Gomes Araújo dos Santos^{1,3}, Rinneu Elias Borges^{1,4}, Lia Raquel de Souza Santos¹

¹ Laboratory of Ecotoxicology and Animal Systematics, Institute Federal Goiano, IF Goiano, campus Rio Verde, Rodovia Sul Goiana, Km 01, Zona Rural, Rio Verde, Goiás. CEP 75.901-970, Brazil

² Laboratory of Mutagenesis, Institute of Biological Sciences, ICB I - Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás. CEP 74690-900, Brazil

³ Departamento de Biologia, Universidade Estadual Paulista - Júlio de Mesquita Filho, UNESP, campus São José do Rio Preto, R. Cristóvão Colombo, 2265, Jardim Nazareth, São José do Rio Preto, SP. CEP 15.054-000, Brasil

⁴ Department of Biology, University of Rio Verde, UniRV, Fazenda Fontes do Saber, Rio Verde, GO. CEP 75.901-970, Brazil

*Corresponding autor:

Lia Raquel Souza Santos, lia.santos@ifgoiano.edu.br

Fone/Fax: +55 64 36205643

Resumo

Os anfíbios são organismos que estão sujeitos a um risco de declínio populacional pela exposição a diversos compostos químicos, como pesticidas, herbicidas e antibióticos disponíveis nos ambientes aquáticos. Esses poluentes têm efeitos letais e subletais em animais, especialmente em anfíbios, devido a suas características ecológicas e morfofisiológicas. Assim, esses animais são usados como modelos biológicos para monitorar a saúde ambiental de vários locais em todo mundo. Com isso, este trabalho teve como objetivo investigar a contribuição científica para estudos ecotoxicológicos envolvendo animais do gênero *Rhinella*. O primeiro estudo ecotoxicológico com anfíbios foi publicado em 1952, mas só em 2009 foram publicados os primeiros trabalhos dessa área com o gênero *Rhinella*. A espécie *R. arenarum* foi a mais encontrada na bibliografia, sendo localizada em mais de 64% do total de estudos. Os pesticidas foram os contaminantes mais testados e os metais pesados foram estudados em mais de 10% das pesquisas. O gênero avaliado neste trabalho possui cerca de 90 espécies, e apenas 8 foram encontradas nos trabalhos, refletindo o longo caminho a ser percorrido a fim de preencher lacunas de conhecimento sobre as espécies e proteger a biodiversidade dos impactos gerados pelas ações antrópicas. Os estudos ecotoxicológicos têm grande importância sobre a qualidade de vida e sobrevivência das espécies, no entanto, ainda são escassos, principalmente para uma avaliação de múltiplos estressores.

Palavras-chave: Toxicidade; Revisão; *Rhinella*; Contaminantes; Estudos.

3.1 INTRODUÇÃO

Os anfíbios são organismos modelo usados como sentinelas para monitorar a saúde ambiental do mundo (Liu et al., 2016). Com características relacionadas ao seu metabolismo, ciclo de vida e ecologia, esses indivíduos são mais vulneráveis à extinção do que outros grupos de vertebrados (Sparling et al., 2010). Esses animais são individualmente sensíveis a inúmeros contaminantes ambientais durante seus estágios embrionários, pela permeabilidade de sua pele às substâncias tóxicas e a vulnerabilidade que a metamorfose causa no desenvolvimento larval (Vitt et al., 1990). Além disso, perda de habitat, fragmentação e degradação, como resultado da urbanização são as principais ameaças às populações de anfíbios (Peltzer et al., 2003; McDaniel et al., 2004; Metts et al., 2012).

Não obstante, o aumento da produção agrícola global e consequente uso extensivo de agroquímicos, particularmente de pesticidas nas lavouras, expõe populações de anfíbios a diversos produtos químicos em ambientes aquáticos dentro de agroecossistemas (Sparling and Fellers, 2009), portanto, podem promover efeitos letais e subletais em animais (McDaniel et al., 2004; Metts et al., 2012). Diante disto, torna necessário um conhecimento completo do impacto desses compostos em espécies e populações de animais selvagens, especialmente a fim de estabelecer ligações com amplos declínios de biodiversidade (Bustamante et al., 2005; Noyes et al., 2009; Kohler e Tribskom, 2013). Vários pesquisadores mostraram recentemente que um número significativo de contaminantes de preocupação emergente (CPEs), como produtos farmacêuticos (hormônios, betabloqueadores, esteróides e antibióticos) resultam na poluição dos ambientes aquáticos, assim como pesticidas (Rodríguez-Mozaz et al., 2020; Alvarez-Ruiz et al., 2020).

Dentre os efeitos desses compostos químicos no ambiente, citam-se alterações genéticas promovidas por agentes genotóxicos, cujas implicações biológicas na saúde das populações de anfíbios impactam em consequências ecológicas em ecossistemas terrestres e aquáticos. Uma forma de verificar esses danos, é através da técnica do micronúcleo, desenvolvida por Jaylet et al. (1986) para anfíbios, e que está sendo amplamente empregada no monitoramento ecotoxicológico e indicador de danos ao DNA (Machado da Rocha, 2011).

Além do teste de micronúcleo, há também o uso de análise do sistema de defesa antioxidante presente em organismos aeróbicos, que é complexo e inclui defesas enzimáticas e não enzimáticas para neutralizar ações de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Halliwell e Gutteridge, 2007). O desenvolvimento desse sistema antioxidante em embriões de anfíbios é que os protege contra ambientes pró-oxidantes (Ferrari et al., 2011). As poliaminas, também, são moléculas-chave envolvidas no controle da vida e da morte celular. Os baixos níveis intracelulares dessas poliaminas podem causar inibição da proliferação e diferenciação celular e até na morte celular (Bensaad et al., 2001).

Assim, dada a importância da avaliação dos vários fatores de risco para as populações expostas, o uso de bioensaios e biomarcadores de toxicidade para o monitoramento da qualidade ambiental, vêm ganhando atenção globalmente. Neste contexto, este estudo teve como objetivo analisar a contribuição científica mundial com dados de ecotoxicologia envolvendo anuros, em especial, o gênero *Rhinella* (Fitzinger, 1826) por ensejar que espécies comuns, embora frequentemente negligenciadas, são importantes em termos de conservação (Gaston e Fuller, 2007). Neste contexto, este estudo investigou as espécies mais estudadas, sua distribuição geográfica, os estressores

ambientais testados ou encontrados e a tendência de produção científica com o gênero *Rhinella* ligado a estudos de ecotoxicidade.

3.2 MATERIAL E MÉTODO

Neste estudo foram rastreados artigos sobre o gênero *Rhinella* e poluição utilizando-se da base de dados, *ISI Web of Science* (www.isiknowledge.com), com as seguintes palavras-chave: TS = (*Rhinella** AND Pollution) OR TS = (*Rhinella** AND Contamination) OR TS = (*Rinella** AND Pesticides). Os dados foram compilados do período mais remoto disponível na base de dados (2009) até dezembro de 2021, a fim de garantir a identificação do maior número possível de estudos. Foram excluídos os artigos nos quais os organismos testes não pertenciam ao gênero escolhido e, também artigos que não investigavam danos genotóxicos (Figura 1). Esta revisão da literatura científica foi baseada nos estudos de Nabout et al. (2012, 2014) e Benvindo et. al. (2017). Para cada artigo encontrado foram examinados, (a) ano de publicação, (b) aspecto geográfico das pesquisas (países), (c) espécies de *Rhinella*, (d) tipo de contaminante, e (e) tipo de dano observado nos animais. Os dados foram apresentados por meio de frequência absoluta e relativa. O *software* livre QGIS foi utilizado para apresentar os estudos no aspecto geográfico.

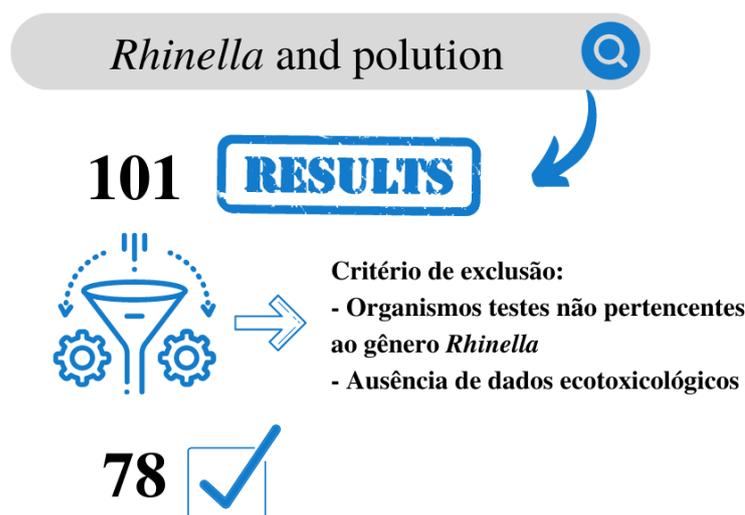


Figura 1. Quantidade de artigos encontrados e selecionados na base de dados *ISI Web of Science*.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Artigos científicos publicados e Distribuição geográfica das espécies mais estudadas

De um total de 101 artigos encontrados na literatura, apenas 78 atenderam os critérios de avaliação, conforme metodologia. Destes, foram registradas oito espécies de *Rhinella*, cuja espécie *R. arenarum* foi a mais documentada na literatura, sendo localizada em mais de 64% (n=50 artigos) do total de estudos (Tabela 1).

Tabela 1. Espécies do gênero *Rhinella* investigadas em estudo ecotoxicológicos, distribuição geográfica e número de artigos publicados por espécie.

Espécies	Distribuição geográfica	Artigos
<i>Rhinella arenarum</i>	Bolívia central ao leste dos Andes, para o sul até a província de Chubut, Argentina, sul do Brasil, leste e sul do Uruguai e provavelmente no Paraguai	50
<i>Rhinella ictérica</i>	Centro, sudeste e sul do Brasil; Misiones e Corrientes, nordeste da Argentina; e leste do Paraguai	9
<i>Rhinella fernandezae</i>	Nordeste da Argentina (Buenos Aires, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, La Pampa, Santa Fe), sul do Paraguai, Uruguai (Canelones, Colônia, Montevideu, Río Negro, San José) e sul do Brasil (Rio Grande do Sul)	7
<i>Rhinella diptycha</i>	Nativa da Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai e Uruguai.	5
<i>Rhinella marina</i>	Belize; Bolívia, Estados Plurinacionais da; Brasil; Colômbia; Costa Rica; Equador; El Salvador; Guiana Francesa; Guatemala; Guiana; Honduras; México; Nicarágua; Panamá; Peru; Suriname; Trinidad e Tobago; Estados Unidos (Texas); Venezuela, República Bolivariana, Antígua e Barbuda; Aruba; Austrália; Barbados; República Dominicana; Grenada; Guadalupe; Guam; Haiti; Jamaica; Japão; Martinica; Montserrat; Ilhas Marianas do Norte; Papua Nova Guiné; Filipinas; Porto Rico; São Cristóvão e Neves; Santa Lúcia; São Vicente e Granadinas; Ilhas Salomão; Taiwan, província da China; Estados Unidos (Ilhas Havaianas, Flórida); Ilhas Virgens, EUA	3
<i>Rhinella ornata</i>	Brazil (Rio de Janeiro, São Paulo, Espírito Santo, Paraná), Argentina	2
<i>Rhinella granulosa</i>	Argentina; Bolívia, Plurinational States of; Brazil; Colômbia; French Guiana; Guyana; Panama; Paraguay; Suriname; Venezuela, República Bolivariana	1
<i>Rhinella horribilis</i>	Mesoamérica e noroeste da América do Sul	1

Essa grande quantidade de trabalhos com *R. arenarum* pode ser explicada por diversos fatores, dentre eles sua extensa distribuição Neotropical (IUCN, 2021), e em especial na América do Sul com grande adaptação a ambientes antropizados, sendo facilmente encontrada em florestas, pântanos, terras agrícolas e territórios urbanos (Peltzer et al., 2006), com deposição de ovos em lagoas rasas efêmeras com vegetação esparsa (Sanabria et al., 2007). Além disso, *R. arenarum* consta na lista da IUCN (2021) como uma espécie “Pouco Preocupante”, e, é considerada uma espécie sentinela, nativa e tem sido muito utilizada como modelo biológico em muitas pesquisas na área da

ecotoxicologia, incluindo estudos laboratoriais fisiológicos e anatômicos (Bionda et al., 2011; Brodeur et al., 2008; Lajmanovich et al., 2019).

Alguns trabalhos relataram que seu desenvolvimento embrionário-larval é altamente sensível a poluentes ambientais (Herkovits et al., 2002; Venturino et al., 2003; Aronzon et al., 2014), e por isto têm sido muito utilizado em trabalhos para avaliação da toxicidade de pesticidas (Pérez-Coll e Herkovits, 2006; Svartz et al., 2012, 2014), efluentes industriais (Svartz e Pérez-Coll, 2013; Hutler Wolkowicz et al., 2016), contaminantes emergentes (Pérez-Coll e Herkovits, 2004; Hutler Wolkowicz et al., 2013), e misturas complexas (Aronzon et al., 2016; Svartz et al., 2016).

Cerca de 23 estudos, com essa espécie, foram realizados por membros do Conselho Nacional de Pesquisas Científicas e Técnicas (CONICET), o principal órgão dedicado à promoção da ciência e da tecnologia na Argentina. Esta quantidade de estudos (46%) pode ser justificada pelo fato de ser uma espécie de ampla ocorrência no norte e centro da Argentina e um habitante típico de regiões de cultivo (Sotomayor et al., 2012, Sánchez et al., 2014).

Estressores ambientais e substâncias encontradas

Em sua grande maioria, os estudos testaram pesticidas (Figura 2), fato este possivelmente vinculado à expansão da agricultura a qual vem fazendo uso desses compostos químicos no combate de pragas (Köhler e Triebkorn, 2013; Bernabò et al., 2016)



Figura 2. Porcentagem de xenobióticos testados nos estudos com *Rhinella* nos últimos 12 anos.

O pesticida mais testado, encontrado em 13% dos artigos (n=10), foi o glifosato (Gly), o qual é o ingrediente ativo declarado em cerca de 750 marcas usualmente aplicadas para controlar ervas daninhas (Guyton et al., 2015). Podendo poluir o ambiente aquático por diversas rotas, principalmente por deriva ou escoamento superficial após sua aplicação (Lupi et al., 2019). As concentrações de Gly em sistemas aquáticos variam de 0,1 a 80 mg/L (Sobrero et al., 2007) e, em habitats de água doce (pequenos lagos ou poças), uma concentração ambiental média esperada de 3,49 mg/L foi estimada (Wagner et al., 2013). Essa presença de Gly em ambientes aquáticos pode levar ao aumento de danos em espécies não alvo, como anfíbios (Cauble e Wagner, 2005; Relyea e Jones, 2009; Lajmanovich et al., 2011; Navarro- Martín et al., 2014; Berger et al., 2018; Bolis et al., 2020; Herek et al., 2020). Estudos apontam que o glifosato produz ampla gama de efeitos tóxicos, incluindo danos neurotóxicos, estresse oxidativo, depressão imunológica e inibição significativa de diversas atividades enzimáticas em girinos expostos a este herbicida (Lajmanovich et al., 2011, 2013 e

2015). Foram observadas também alterações morfológicas, e biométricas (peso e comprimento) em girinos (Almeida et al., 2019, Borges et al., 2019a).

Outro pesticida entre os mais estudados (encontrado em 7,7%, n = 6 artigos) foi o Azinfós metil, que é frequentemente usado para controle de pragas em pomares de frutas (Anguiano e Pechen de D'Angelo, 2007). Os estudos demonstraram que este pesticida promove alterações enzimáticas (estresse oxidativo) interferindo no desenvolvimento embrionário dos girinos. Quando comparado com outro inseticida, o carbamato carbaril, o estresse oxidativo causado por azinfós metil pareceu ser maior, e, também relacionado as alterações no desenvolvimento (Ferrari et al., 2009). Lascano et. al. (2011) demonstraram também que a exposição de embriões de anfíbios à concentrações subletais de azinfos-metil em seus habitats naturais é uma ameaça pelas alterações bioquímicas e morfológicas que podem prejudicar a capacidade de lidar com estresses ambientais.

Em um estudo *in situ*, foi constatado que biomarcadores tradicionais de exposição à organofosforados, como a acetilcolinesterase (AChE) e carboxilesterase, foram inibidos em girinos após uma semana de exposição em canais de água que possivelmente recebem um aporte de agrotóxicos (Rosenbaum et al., 2012).

Para além dos estressores citados acima, os metais também são fonte de contaminação e, entre eles o Cobre (Cu) foi apresentado em número maior de trabalhos. Estes estudos relataram que a concentração letal (LC50) às 96 h foi de 23,48 µg Cu/L (Franco-de-Sá e Val, 2014). Para outros metais como o cádmio (Cd) sua dose subletal apresentou indicativos de lesão hepática e marcadores de disfunção renal (nitrogênio ureico no sangue, creatinina sérica, cálcio e glicose) apresentaram variação em comparação com os controles. O arsênio apresentou valores de LC50 na faixa de 46 a 50 mg/L entre 4 e 17 dias de exposição, no entanto, o crescimento dos girinos foi completamente inibido com 30 mg/L, demonstrando, dessa forma, os efeitos subletais ecologicamente relevantes em concentrações menores do que aquelas que resultam em mortalidade. Para o zinco os valores de LC50 diminuíram gradualmente com o aumento da duração da exposição, de 2,49 mg/L em 96 h para 1,30 mg/L após 21 dias (Brodeur et al., 2009). Por fim, para o níquel os principais efeitos teratogênicos foram retardo de crescimento e desenvolvimento, curvaturas do eixo bem graves, tampão de gema firme, assimetria, microcefalia e agenesia de boca e brânquias e atividade neuromuscular limitada (Sztrum et al., 2011).

Padrões e tendências da produção científica sobre Rhinella e a contaminação ambiental

Na figura 3 está apresentada a contribuição científica dos artigos produzidos com *Rhinella*, por diversos países.

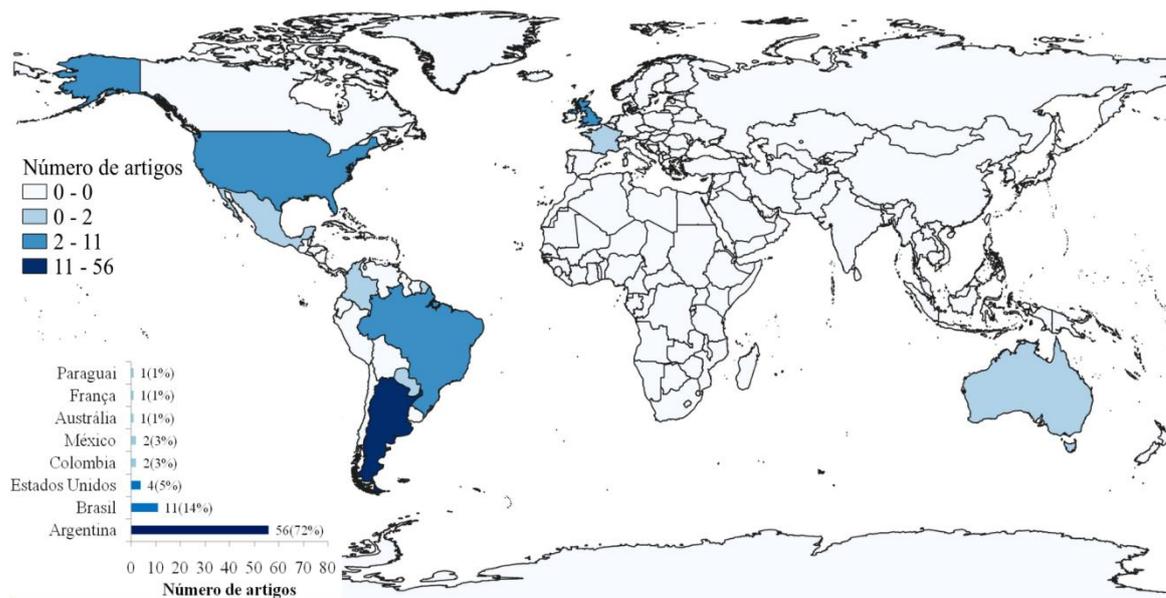


Figura 3: Contribuição global de artigos com dados ecotoxicológicos com animais do gênero *Rhinella*.

A Argentina lidera com mais de 70% ($n=56$) dos artigos publicados, sendo as Américas detentoras de 98% ($n=76$) de toda produção encontrada. Estes dados podem ser justificados em parte pela ocorrência comum deste gênero nessas regiões (Tabela 1), como também pelos centros de pesquisas que trabalham com a temática de ecotoxicologia com o grupo abordado. Como citado anteriormente os membros do CONICET têm grande participação nas pesquisas relacionadas à área de interesse deste estudo, e no total de pesquisas realizadas na Argentina eles são responsáveis pela maior parte dos trabalhos publicados (84%, $n=47$). No Brasil, cerca de 45% ($n=5$) dos estudos foram realizadas por membros da Universidade de São Paulo, e 18% ($n=2$) por pesquisadores do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA). As demais pesquisas (47%, $n=4$) foram de trabalhos publicados por outras Instituições sediadas no país.

A tendência da publicação de artigos dentro do tema estudado apresentada na figura 4, mostra que não houve crescimento uniforme dos trabalhos realizados, mas, sim oscilações durante os últimos anos.

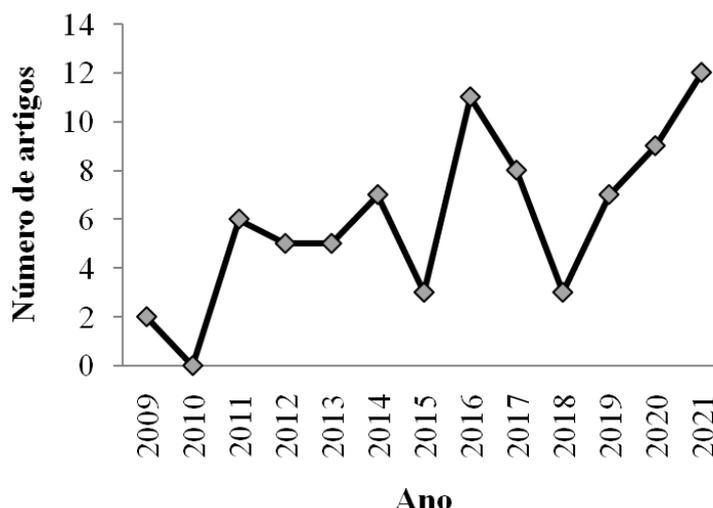


Figura 4. Variação temporal no número de artigos publicados entre 2009 e agosto de 2021 com estudos envolvendo *Rhinella* como indicador de poluição ambiental.

A produção de estudos ecotoxicológicos com animais do gênero *Rhinella* teve início em 2009, tendo suas maiores produções em 2016 e nesse último ano, 2021. O total de estudos encontrados foi de 78 artigos, sendo que 76 deles foram publicados nos últimos dez anos. Segundo um estudo cienciométrico realizado por Egusquiza (2016), o primeiro estudo de ecotoxicologia com anfíbios foi publicado em 1952, e até 1975 o crescimento foi lento nos estudos ligados a essa área, houve crescimento exponencial nos anos 90, mesmo assim ainda não havia sido publicados trabalhos com o gênero *Rhinella*. Neste mesmo estudo, foi apresentado esse gênero como um dos mais investigados, sendo a espécie *Rhinella arenarum* uma das mais frequentes nos estudos, corroborando com o resultado apresentado nessa revisão.

3.4 CONCLUSÃO E NOVOS CAMINHOS

Os estudos na área da ecotoxicologia com organismos teste pertencentes à classe dos anfíbios têm apresentado crescimento. Especificamente com o gênero *Rhinella*, nos últimos 10 anos houve uma média de sete artigos publicados por ano. Ainda assim são incipientes os estudos com diferentes espécies dessa importante classe, os anfíbios. O gênero estudado neste trabalho possui cerca de 90 espécies, e apenas 8 foram encontradas nas pesquisas, isso reflete o grande trabalho que se tem pela frente, a fim de conhecer melhor sobre as espécies e proteger a biodiversidade dos impactos gerados pelas ações antrópicas. Os estudos ecotoxicológicos têm grande importância sobre a qualidade de vida e sobrevivência das espécies, visto que pelas espécies relatadas nesse trabalho, é possível perceber os impactos gerados pelos contaminantes. Com isso, a ecotoxicologia tem importante papel na busca pela vigilância das espécies, a fim de conter possíveis declínios populacionais.

Agradecimentos: Embora o estudo não tenha sido financiado, alguns autores agradecem suas bolsas de pesquisa. Tais como: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) e Fundo Brasileiro para a Biodiversidade.

Authors' contributions

Financiamento: Não aplicável

Disponibilidade de dados: Não aplicável

Conformidade com os padrões éticos

Conflito de interesse: Os autores declaram não haver conflito de interesse

Aprovação ética: Não aplicável

Consentimento para participar: Todos os autores participaram deste trabalho

Consentimento para publicar: Todos os autores concordam em publicar

3.5 REFERÊNCIAS

Almeida, P. R.; Rodrigues, M. V.; Imperador, A. M. 2019. Acute Toxicity (CL50) and behavioral and morphological effects of a commercial formulation with glyphosate active ingredient in tadpoles of *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leptodactylidae) and *Rhinella icterica* (Anura, Bufonidae). *Art Tec, Eng. Sanit. Ambient.* 24 (6). <https://doi.org/10.1590/S1413-41522019166886>

Alvarez-Ruiz, R., Pic o, Y., Alfarhan, A.H., El-Sheikh, M.A., Alshahrani, H.O., Barcel o, D., 2020. Dataset of pesticides, pharmaceuticals and personal care products occurrence in wetlands of Saudi Arabia. *Data Brief* 31, 105776. <https://doi:10.1016/j.dib.2020.105776>.

Anguiano, O.L., Pechen de D'Angelo, A.M., 2007. Provincia de Río Negro y Provincia de Neuquén, in: *La problemática de los agroquímicos y sus envases, la incidencia en la salud de los trabajadores, la población expuesta y el ambiente*. Ministerio de Salud de la Nación, OPS/OMS, Buenos Aires, pp. 181–201.

Aronzon CM, Babay PA, Pérez Coll CS (2014) Developmental toxicity and risk assessment of nonylphenol to the South American toad, *Rhinella arenarum*. *Environ Toxicol Pharm* 38(2):634–642

Aronzon CM, Svartz GV, Coll CSP (2016) Synergy Between diazinon and nonylphenol in toxicity during the early development of the *Rhinella arenarum* Toad Water. *Air Soil Poll* 227(5):139

Bensaad K, Rouillard D, Soussi T. 2001. Regulation of the cell cycle by p53 after DNA damage in an amphibian cell line. *Oncogene* 20: 3766– 3775.

Benvindo-Souza, M., Assis, R.A., Oliveira, E.A.S., Borges, R.E., Santos, L.R.S., 2017. The micronucleus test for the oral mucosa: global trends and new questions. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 36, 27724e27730.

Berger, G., Graef, F., Pallut, B., Hoffmann, J., Brühl, C.A., Wagner, N., 2018. How does changing pesticide usage over time affect migrating amphibians: a case study on the use of Glyphosate-Based Herbicides in German agriculture over 20 years. *Front. Environ. Sci.* 6, 6. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2018.00006>

Bernabò, I.; Guardia, A.; Macirella, R.; Sesti, S.; Crescente, A.; Brunelli, E. 2016. Effects of long-term exposure to two fungicides, pyrimethanil and tebuconazole, on survival and life history traits of Italian tree frog (*Hyla intermedia*). *Aquatic Toxicology*, 172:56–66.

Bionda, C., Lajmanovich, R., Salas, N., Martino, A., di Tada, I., 2011. Reproductive ecology of the common South American toad *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae): reproductive effort, clutch size, fecundity and mate selection. *J. Herpetol.* 45, 661e664. <https://doi.org/10.1670/09-238.1>.

Bolis, A., Gazzola, A., Pellitteri-Rosa, D., Colombo, A., Bonfanti, P., Bellati, A., 2020. Exposure during embryonic development to Roundup® Power 2.0 affects lateralization, level of activity and growth, but not defensive behaviour of marsh frog tadpoles. *Environ. Pollut. (Part B)* 263, 114395. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114395>

Brodeur, J. C.; Asorey, C.M.; Sztrum, A; Herkovits, J. (2009) Acute and Subchronic Toxicity of Arsenite and Zinc to Tadpoles of *Rhinella arenarum* Both Alone and in Combination, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 72:14, 884-890, DOI: 10.1080/15287390902959524

Brodeur, J.C., Svartz, G., Perez-Coll, C.S., Marino, D.J.G., Herkovits, J., 2008. Comparative susceptibility to atrazine of three developmental stages of *Rhinella arenarum* and influence on metamorphosis: non-monotonous acceleration of the time to climax and delayed tail resorption. *Aquat. Toxicol.* 91, 161e170. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.07.003>.

Bustamante, M.R., Ron, S.R., Coloma, L.A., 2005. Cambios en la Diversidad en Siete Comunidades de Anuros en los Andes de Ecuador. *Biotropica* 37, 180e189

Cauble, K., Wagner, R.S., 2005. Sublethal effects of the herbicide glyphosate on amphibian metamorphosis and development. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 75, 429e435. <https://doi.org/10.1007/s00128-005-0771-3>.

Egusquiza, G. M. M. Ecotoxicología en anfibios: un análisis cuantitativo. 2016. 73 p. Trabajo de Conclusión de Curso (Graduación en Ciencias Biológicas) – Universidad Federal de la Integración Latinoamericana, Foz de Iguazú, Paraná, 2016.

Ferrari, A.; Lascano, C. I.; Anguiano, O. L.; D'Angelo, A. M. P.; Venturino, A. 2009. Antioxidant responses to azinphos methyl and carbaryl during the embryonic development of the toad *Rhinella* (*Bufo*) *arenarum* Hensel, *Aquatic Toxicology*, Volume 93, Issue 1, Pages 37-44, ISSN 0166-445X, <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.03.003>.

Ferrari, A.; Lascano, C.; D'Angelo, A. M. P.; Venturino, A. 2011. Effects of azinphos methyl and carbaryl on *Rhinella arenarum* larvae esterases and antioxidant enzymes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, Volume 153, Issue 1, Pages 34-39. ISSN 1532-0456. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.08.003>.

Fitzinger, L. J. (1826): *Neue Classification der Reptilien nach ihren natürlichen Verwandtschaften*. 66 pp, Vienna.

Franco-de-Sá, J. F. O.; Val, A. L. Copper toxicity for *Scinax ruber* and *Rhinella granulosa* (Amphibia: Anura) of the Amazon: Potential of Biotic Ligand Model to predict toxicity in urban streams. *Acta Amazonica* [online]. 2014, v. 44, n. 4

[Accessed 1 January 2022] , pp. 491-498. Available from: <<https://doi.org/10.1590/1809-4392201400383>>. Epub 17 July 2014. ISSN 1809-4392. <https://doi.org/10.1590/1809-4392201400383>.

Frost, D.R. 2018. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Disponível em.: <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/>.

Gaston KJ, Fuller RA. Biodiversity and extinction: losing the common and the widespread. *Progress in Physical Geography: Earth and Environment*. 2007;31(2):213-225. doi:10.1177/0309133307076488

Guyton, K. Z., Loomis, D., Grosse, Y., El Ghissassi, F., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Scoccianti, C., Mattock, H., & Straif, K. (2015). Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. *The Lancet Oncology*, 16, 490–491. doi:10.1016/S1470-2045(15)70134-8.

Halliwell, B. and Gutteridge, J. M.C. 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4, New York: Oxford University Press.

Herek, J.S., Vargas, L., Trindade, S.A.R., Rutkoski, C.F., Macagnan, N., Hartmann, P.A., Hartmann, M.T., 2020. Can environmental concentrations of glyphosate affect survival and cause malformation in amphibians? Effects from a glyphosatebased herbicide on *Physalaemus cuvieri* and *P. gracilis* (Anura: Leptodactylidae). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27, 22619e22630. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08869-z>

Herkovits J, Perez-Coll CS, Herkovits FD (2002) Ecotoxicological studies of environmental samples from Buenos Aires area using a standardized amphibian embryo toxicity test (AMPHITOX). *Environ Pollut* 116(1):177–183

Hutler Wolkowicz I, Svartz GV, Aronzon CM, Pérez Coll C (2016) Developmental toxicity of bisphenol A diglycidyl ether (epoxide resin badge) during the early life cycle of a native amphibian species. *Environ Toxicol Chem* 35(12):3031–3038

Hutler Wolkowicz IR, Aronzon CM, Pérez Coll CS (2013) Lethal and sublethal toxicity of the industrial chemical epichlorohydrin on *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) embryos and larvae. *J Hazard Mater* 263:784–791

IUCN. The International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. 2021-3. IUCN RedList. www.iucnredlist.org ISSN 2307-8235. Acessado em 31/01/2022.

Jaylet A, Deparis P, Ferrier V, Grinfeld S, Siboulet R (1986) A new micronucleus test using peripheral blood erythrocytes of the newt *Pleurodeles walt* to detect mutagens in fresh-water. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 164:245–257

Kohler, H.R., Triebkorn, R., 2013. Wildlife ecotoxicology of pesticides: can we track € effects to the population level and beyond? *Science* 341, 759e765. <https://doi.org/10.1126/science.1237591>.

Lajmanovich, R.C., Peltzer, P.M., Attademo, A.M., Martinuzzi, C.S., Simonillo, M.F., Colussi, C.L., Cuzziol Boccioni, A.P., Sigrist, M., 2019. First evaluation of novel potential synergistic effects of glyphosate and arsenic mixture on *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) tadpoles. *Heliyon* 5 (10), e02601. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02601>.

Lajmanovich, R.C.; Attademo, A.M.; Peltzer, P.M. et al. Toxicity of Four Herbicide Formulations with Glyphosate on *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) Tadpoles: B-esterases and Glutathione S-transferase Inhibitors. *Arch Environ Contam Toxicol* 60, 681–689 (2011). <https://doi-org.ez369.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s00244-010-9578-2>

Lajmanovich, R.C.; Attademo, A.M.; Simoniello, M.F. et al. Harmful Effects of the Dermal Intake of Commercial Formulations Containing Chlorpyrifos, 2,4-D, and Glyphosate on the Common Toad *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae). *Water Air Soil Pollut* 226, 427 (2015). <https://doi-org.ez369.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s11270-015-2695-9>

Lajmanovich, R.C.; Junges, C.M.; Attademo, A.M. et al. Individual and Mixture Toxicity of Commercial Formulations Containing Glyphosate, Metsulfuron-Methyl, Bispyribac-Sodium, and Picloram on *Rhinella arenarum* Tadpoles. *Water Air Soil Pollut* 224, 1404 (2013). <https://doi-org.ez369.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s11270-012-1404-1>

Lascano, C. I.; Ferrari, A.; Venturino, A. (2011) Sublethal concentrations of azinphos-methyl induce biochemical and morphological alterations in *Rhinella arenarum* embryos, *Chemistry and Ecology*, 27:6, 557-568, DOI: 10.1080/02757540.2011.602971

Liu, L.S., Zhao, L.Y., Wang, S.H., Jiang, J.P., 2016. Research proceedings on amphibian model organisms. *Zool. Res.* 37 (4), 237e245. <https://doi.org/10.13918/j.issn.2095-8137.2016.4.237>.

Lupi, L., Bedmar, F., Puricelli, M.M., Marino, D., Aparicio, V.C., Wunderlin, D., Miglioranza, K.S.B., 2019. Glyphosate runoff and its occurrence in rainwater and subsurface soil in the nearby area of agricultural fields in Argentina. *Chemosphere* 225, 906e914. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.03.090>. Machado da Rocha C (2011) The micronucleus test in erythrocytes of amphibian larvae as tool for xenobiotic exposure risk assessment: a brief review and an example using *Lithobates catesbeianus* exposed to copper sulphate. *Middle East J Sci Res* 8:23–29

McDaniel, T. V.; Harris, M. L.; Bishop, C. A.; Struger, J. (2004) Development and survivorship of northern leopard frogs (*Rana pipiens*) and green frogs (*Rana clamitans*) exposed to contaminants in the water and sediments of the St. Lawrence River near Cornwall. *Water Qual Res J Can* 39:160–174

Medina, M. F.; González, M. E. ; Klyver, S. M. R.; Odstreil, I. M. A. Histopathological and biochemical changes in the liver, kidney, and blood of amphibians intoxicated with cádmium. Institute of Biology, Faculty of Biochemistry, Chemistry, and Pharmacy, National University of Tucumán, San Miguel de Tucumán, Argentina 2 Faculty of Medicine, National University of Tucumán, San Miguel de Tucumán, Argentina, 2016.

Metts, B. S.; Kurt, A.; Scott, D. E.; Tuberville, T. D.; Hopkins, W. A. (2012) Interactive effects of maternal and environmental exposure to coal combustion wastes decrease survival of larval southern toads (*Bufo terrestris*). *Environ Pollut* 164:211–218

Nabout JC, Parreira MR, Teresa FB, Carneiro FM, Cunha HF, Ondei LS, Caramori SS, Soares TN (2014) Publish (in a group) or perish (alone): the trend from single- to multi-authorship in biological papers. *Scientometrics* 102:357–364

Nabout, J.C., Carvalhalho P, Prado, M.U.; Borges PP, Machado KB, Haddad KB, Michelin TS, Cunha HF, Soares TN (2012) Trends and biases in global climate change literature. *Natureza Conservação* 10:45–51

Navarro-Martín, L., Lanctot, C., Jackman, P., Park, B.J., Doe, K., Pauli, B.D., ^ Trudeau, V.L., 2014. Effects of glyphosate-based herbicides on survival, development, growth and sex ratios of wood frogs (*Lithobates sylvaticus*) tadpoles. I Chronic laboratory exposures to VisionMax®. *Aquat. Toxicol.* 154, 278e290. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.05.017>.

Noyes, P.D., Mc Elwee, M.K., Miller, H., Clark, B.W., Van Tiem, L.A., Walcott, K.C., Erwin, K.N., Levin, E.D., 2009. The toxicology of climate change: environmental contaminants in a warming world. *Environ. Int.* 35, 971e986. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.02.006>.

Ossana, N.A., Salibian, A., 2013. Micronucleus test for monitoring the genotoxic potential of the surface water of Luján River (Argentina) using erythrocytes of *Lithobates catesbeianus* tadpoles. *Ecotoxicol. Environ. Contam.* 8, 67–74.

Pegg AE. 2006. Regulation of ornithine decarboxylase. *J Biol Chem* 281: 14529– 14532.)

Peltzer PM, Lajmanovich RC, Attademo AM, Beltzer AH (2006) Anuran diversity across agricultural pond in Argentina. *Biodivers Conserv* 15:3499–3513

Peltzer, P. M.; Lajmanovich, R. C.; Beltzer, A. H. (2003) The effects of habitat fragmentation on amphibian species richness in the floodplain of the middle Parana river, Argentina. *Herpetol J* 13:95–98

Pérez-Coll CS, Herkovits J (2006) Synergistic effects of copper and butyric ester of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (Esternon Ultra) on amphibian embryos. *Int J Environ Res Pub Health* 3(4):343–347

Pérez-Coll, C.S.; Herkovits, J. 2004. Lethal and teratogenic effects of naringenin evaluated by means of an amphibian embryo toxicity test (AMPHITOX). *Food and Chemical Toxicology*. Volume 42, Issue 2, Pages 299-306. ISSN 0278-6915. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2003.09.004>.

Rodríguez-Mozaz, S., Serra-Compte, A., Gil-Solsona, R., Alvarez-Muñoz, D., 2020. ~ Environmental metabolomics and xenometabolomics for the assessment of exposure to contaminant mixtures. *Environmental Metabolomic*. Elsevier, pp. 283e310. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818196-6.00010-8>

Rosenbaum, E.A.; Duboscq, L.; Soleño, J.; Montagna, C.M.; Ferrari, A.; Venturino, A. (2012), Response of biomarkers in amphibian larvae to in situ exposures in a fruit-producing region in North Patagonia, Argentina. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31: 2311-2317. [https://doi-org.ez369.periodicos.capes.gov.br/10.1002/etc.1950](https://doi.org.ez369.periodicos.capes.gov.br/10.1002/etc.1950)

Sanabria, E.A., Quiroga, L.B., Acosta, J.C., 2007. Sitios de oviposición y esfuerzo reproductivo de *Chaunus arenarum* (Anura: bufonidae) en el desierto del Monte, Argentina. *Rev. Esp. Herp.* 21, 49e53.

Sánchez, L.C.; Lajmanovich, R.C.; Peltzer, P.M.; Manzano, A.S.; Junges, C.M.; Attademo, A.M. First evidence of the effects of agricultural activities on gonadal form and function in *Rhinella fernandezae* and *Dendropsophus sanborni* (Amphibia: Anura) from Entre Ríos Province, Argentina *Acta Herpetol.*, 9 (2014), pp. 75-88

Sobrero, M.C., Rimoldi, F., Ronco, A.E., 2007. Effects of the glyphosate active ingredient and a formulation on *Lemna gibba* L. at different exposure levels and assessment end-points. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 79, 537e543. <https://doi.org/10.1007/s00128-007-9277-5>.

Sotomayor, V.; Lascano, C.; Pechen de D'Angelo, A.M.; Venturino, A. Developmental and polyamine metabolism alterations in *Rhinella arenarum* embryos exposed to the organophosphate chlorpyrifos *Environ. Toxicol. Chem.*, 31 (2012), pp. 2052-2058

Sparling, D. W.; Linder, G.; Bishop, C. A. (2010) *Ecotoxicology of amphibians and reptiles*, 2nd edn. Soc Environ Toxicol Chem (SETAC), Pensacola, FL 944 pp

Sparling, D.W.; Fellers, G.M. 2009. Toxicity of two insecticides to California, USA, anurans and its relevance to declining amphibian populations. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 1696–1703.

Svartz GV, Herkovits J, Pérez-Coll CS (2012) Sublethal effects of atrazine on embryo-larval development of *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae). *Ecotoxicology* 21(4):1251–1259 Svartz GV, Pérez-Coll CS (2013) Comparative toxicity of cypermethrin and a commercial formulation on *Rhinella arenarum* larval development (Anura: Bufonidae). *Int J Environ Health* 6(4):320–329

Svartz GV, Wolkowicz IRH, Coll CS (2014) Toxicity of endosulfan on embryo-larval development of the South American toad, *Rhinella arenarum*. *Environ Toxicol Chem* 33(4):875–881

Svartz, G., Meijide, F., Perez Coll, C., 2016. Effects of a fungicide formulation on embryo-larval development, metamorphosis, and gonadogenesis of the South American toad *Rhinella arenarum*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 45, 1e7. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.05.008>. Relyea RA, Jones DK (2009) The toxicity of Roundup Original MAX® to 13 species of larval amphibians. *Environ Toxicol Chem* 28:2004–2008

Svartz, G. V., and Pérez-Coll, C. S. 2013. Comparative toxicity of cypermethrin and a commercial formulation on *Rhinella arenarum* larval development (Anura: Bufonidae). *Int. J. Environ. Health* 6: 320–329.

Sztrum, A.A.; D'Eramo, J.L.; Herkovits, J. (2011), Nickel toxicity in embryos and larvae of the South American toad: Effects on cell differentiation, morphogenesis, and oxygen consumption. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30: 1146-1152. <https://doi-org.ez369.periodicos.capes.gov.br/10.1002/etc.484>

Venturino A, Rosenbaum E, Caballero de Castro A, Anguiano OL, Gauna L, Fonovich de Schroeder T, Pechen de D'Angelo AM (2003) Biomarkers of effect in toads and frogs. *Biomarkers* 8(3–4):167–186

Vitt, L. J.; Caldwell, J. P.; Wilbur, H. M.; Smit, C. D. 1990. Amphibians as harbingers of decay. *Bioscience* 40, 418. <https://doi.org/10.1093/bioscience/40.6.418>.

Wagner, N., Reichenbecher, W., Teichmann, H., Tappeser, B., & Lötters, S. (2013). Questions concerning the potential impact of glyphosate based herbicides on amphibians. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(8), 1688–1700. [doi:10.1002/etc.2268](https://doi.org/10.1002/etc.2268).

Material Suplementar

Tabela 2: Síntese de artigos que avaliaram o gênero *Rhinella*.

Espécie	Estudo	Estressor	Fase de vida	Biomarcadores	Referências
<i>Rhinella arenarum</i>	Laboratório	glyphosate, chlorpyrifos and antibiotics	Girinos	Morfologia, desenvolvimento e tireoide (T4), níveis de acetilcolinesterase (AChE) e glutationa S-transferase (GST) Peroxidação lipídica, glutationa reduzida, atividade da glutationa S-transferase, atividade da catalase, atividade da superóxido dismutase	Boccioni et al. 2021
<i>Rhinella fernandezae</i>	<i>In Situ</i>	Cu, atrazina inseticida	Girinos	Estresse oxidativo e a genotoxicidade	Peluso et al. 2021
<i>Rhinella arenarum</i>	Laboratório	dimetoato	Girinos	Desenvolvimento de anfíbios e aclimatação dos girinos sob uma exposição subletal	Acquaroni et al. 2021
<i>Rhinella marina</i>	Laboratório	butacloro	Girinos	Atividade de enzimas, peroxidação lipídica e presença de morte celular	Shuman-Goodier et al. 2021
<i>Rhinella marina</i>	<i>In Situ</i>		Adultos	Fígado e rins, massas de testículos, contagens de eosinófilos, relação neutrófilos / linfócitos	Cruz-Santiago et al. 2021
<i>Rhinella ornata</i>	<i>In Situ</i>		Adultos	Mortalidade, capacidade de nadar e comprimento total	Santana et al. 2021
<i>Rhinella horribilis</i>	Laboratório	inseticidas organofosforados e radiação uvb	Girinos		Henao et al. 2021
<i>Rhinella arenarum</i>	Laboratório	glifosato e o 2,4-D	Girinos	Toxicidade letal	Peluso et al. 2021
<i>Rhinella marina</i>	<i>In Situ</i>	herbicidas	Adultos	Anomalias	Ferrante &

				morfológicas e mortalidade	Fearnside 2020
<i>Rhinella fernandezae</i>	<i>In Situ</i>	Metais e pesticidas	Adultos	Sexo e condição corporal e frequência de micronúcleos	Peluso et al. 2020
<i>Rhinella arenarum</i>	Laboratório	fungicida clorotalonil	Embriões e Girinos	Efeitos letais e subletais agudos e crônicos e estágio-sensibilidade dependente.	Acquaroni et al. 2020
<i>Rhinella arenarum</i>	Laboratório	glifosato (GLY) - dicamba (DIC) e o GLY-fluorocloridona (FLC)	Girinos	Efeitos tóxicos agudos e as interações prevalentes	de Arcaute et al. 2020
<i>Rhinella arenarum</i>	Laboratório	organofosforados azinfos-metil e clorpirifos	Embriões	Metabolismo oxidativo da poliamina ao longo do desenvolvimento embrionário	Pires et al. 2020
<i>Rhinella marina</i>	<i>In Situ</i>		Adultos		Anzaldúa & Goldberg 2020
<i>Rhinella arenarum</i>	Laboratório	fungicida comercial de mancozeb	Embriões e Girinos	Todos os órgãos	Efeitos letais e subletais
<i>Rhinella icterica</i>	Laboratório	glifosato	Girinos	Efeitos comportamentais e morfológicos	Almeida et al. 2019
<i>Rhinella arenarum</i>	Laboratório	clorpirifós	Girinos	Desempenho locomotor de natação e limites de tolerância térmica	Quiroga et al. 2019
<i>Rhinella arenarum</i>	Laboratório	catalisador nanocerâmico Ni / gama-Al ₂ O ₃ (NC) e NPs	Embriões e Girinos	Subdesenvolvimento geral, flexões axiais e alterações comportamentais. Alterações do epitélio faríngeo e intestinal ao nível da superfície celular como dissociação, apoptose e numerosos lisossomas	Svartz et al. 2019

<i>Rhinella arenarum</i>	Laboratório		Embriões e Girinos	Efeitos letais, subletais e genotóxicos	Peluso et al. 2019 Reboucas et al. 2019
<i>Rhinella ornata</i>	<i>In Situ</i>		Adultos	Malformações	
<i>Rhinella arenarum</i>	Laboratório	Glifosato (GLY) e imazethapyr (IMZT) MaximA (R) XL (2,5% fludioxonil + 1% metalaxil-M)	Girinos	Toxicidade aguda, efeitos letais e subletais, danos genéticos	Carvalho et al. 2019
<i>Rhinella arenarum</i>	Laboratório		Embriões e Girinos	Efeito letal progressivo	Svartz et al. 2019 Cruz-Esquivel & Marrugo-Negrete 2017
<i>Rhinella marina</i>	<i>In Situ</i>		Adultos	Danos genéticos	McCoy et al. 2017
<i>Rhinella marina</i>	<i>In Situ</i>	desreguladores endócrinos	Adultos	Alteração na espermatogênese	Shuman-Goodier et al. 2017
<i>Rhinella marina</i>	Laboratório	butacloro	Girinos	Interações competitivas	
<i>Rhinella arenarum</i>	<i>In Situ</i>		Adultos	Capacidade de citomorfologia e citomorfometria de células sanguíneas	Salinas et al. 2017
<i>Rhinella schneideri</i>	Laboratório	clomazone (Gamic)	Girinos	Respostas bioquímicas ao estresse e atividades de esterase	Freitas et al. 2017
<i>Rhinella schneideri</i>	Laboratório	sulfentrazone (Boral (R) SC)	Girinos	Análise de biomarcadores de estresse oxidativo	Freitas et al. 2017
<i>Rhinella arenarum</i>	Laboratório	clorpirifós	Girinos	Atividades da acetilcolinesterase (AChE) e da carboxilesterase	Attademo et al. 2017
<i>Rhinella arenarum</i>	Laboratório	metaldeído moluscicida (MET)	Girinos	Mortalidade e / ou outros efeitos por meio de: ensaios de toxicidade aguda; Atividades da B-esterase (acetilcolinesterase (AChE) e carboxilesterase (CbE)) e respostas	Attademo et al. 2016

<i>Rhinella arenarum</i>	Laboratório	cobre (Cu) e o diazinon Banvel (A (R)) à base de dicamba (DIC) 57,71% e o Crédito à base de glifosato (GLY) 48% (A (R))	Girinos	oxidativas (glutathiona-S-transferase (GST) e catalase (CAT)) Desenvolvimento inicial	Aronzon et al. 2016
<i>Rhinella arenarum</i>	Laboratório	Maxim XL formulado	Girinos	Mortalidade, efeitos letais agudos Desenvolvimento embrionário, larval e juvenil	Soloneski et al. 2016
<i>Rhinella arenarum</i>	Laboratório	flutamida	embriões e Girinos	Testículos, células germinativas dos órgãos de Bidder, pigmentação do fígado e níveis de hormônios sexuais	Svartz et al. 2016
<i>Rhinella schneideri</i>	Laboratório	diazinon	Adultos embriões e Girinos	Toxicidade Sobrevivência do desenvolvimento embrionário larval	de Gregorio et al. 2016 Aronzon et al. 2016
<i>Rhinella arenarum</i>	Laboratório	endosulfan e cipermetrina	embriões e Girinos	Anormalidades morfológicas como subdesenvolvimento geral, edema, malformações branquiais e alterações comportamentais como hipercinesia	Svartz et al. 2016
<i>Rhinella arenarum</i>	Laboratório	cipermetrina	embriões e Girinos	e contrações espasmódicas. Padrões de infecção em vários tanques de áreas cultivadas (CA) e não cultivadas (UCA) e o efeito do fungo Batrachochytrium dendrobatidis	Svartz et al. 2016
<i>Rhinella fernandezae</i>	<i>In Situ</i>	clorpirifós, 2,4-D	Adultos	Níveis de butirilcolinesterase	Agostini & Burrowes 2015
<i>Rhinella arenarum</i>	Laboratório	e glifosato	Adultos		Lajmanovich et al.

				(BChE), carboxilesterase (CbE), glutationa S-transferases (GST), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), ensaio de cometa alcalino modificado (ACA) para detecção de bases oxidadas (Sítios FPG e Endo III), bem como a proporção de heterófilos e linfócitos (H / L) Absorção de concentrações e sensibilidade diferencial nos estágios iniciais	2015 Svartz et al. 2015 Brodeur et al. 2014
<i>Rhinella arenarum</i>	Laboratório	Endosulfan glifosato e cipermetrina	embriões e Girinos		
<i>Rhinella arenarum</i>	Laboratório		Girinos	Toxicidade LC50s Efeitos letais e subletais agudos e crônicos e estágio- sensibilidade dependente	al. 2014 Svartz et al. 2014
<i>Rhinella arenarum</i>	Laboratório	clorotalonil	embriões e Girinos		Mariel et al. 2014
<i>Rhinella arenarum</i>	Laboratório	Endosulfan	embriões e Girinos	Toxicidade aguda e crônica Efeitos letais e subletais do Diazinon e sua comparação com a absorção por embriões e Girinos	Svartz et al. 2014 Aronzon et al. 2014
<i>Rhinella arenarum</i>	Laboratório	diazinon	embriões e Girinos	Anomalias gonadais masculinas	Sanchez et al. 2014
<i>Rhinella fernandezae</i>	<i>In Situ</i>		Adultos	Frações de LC50, sobrevivência, tempo à metamorfose e ao tamanho das metamorfoses	
<i>Rhinella marina</i>	Laboratório	glifosato, 2,4-D, picloram e uma mistura de picloram e 2,4-D	Girinos	Estágios avaliados foram (de acordo com Del Conte e Sirlin): blástula	Figueiredo & Rodrigues 2014
<i>Rhinella arenarum</i>	Laboratório	epicloridrina	embriões e Girinos		Wolkowicz et al. 2013

<i>Rhinella arenarum</i>	Laboratório	atrazina	embriões e Girinos	precoce (S.3-S.4), gástrula (S.10-S.12), rotação (S.15), botão da cauda (S.17), resposta muscular (S.18), circulação branquial (S.20), boca aberta (S.21), dobras operculares (S.23) Tempos de metamorfose e no tamanho do corpo na metamorfose	Brodeur et al. 2013
<i>Rhinella fernandezae</i>	<i>In Situ</i>		Adultos	Tipo e a prevalência de anormalidades Parâmetros enzimáticos como glutathione S-transferase (GST), butirilcolinesterase (BChE) e atividades da acetilcolinesterase (AChE), além de anormalidades nucleares eritrocitárias (ENA) Biomarcadores tradicionais de exposição a organofosforados, acetilcolinesterase (AChE) e carboxilesterase	Agostini et al. 2013
<i>Rhinella arenarum</i>	Laboratório	glifosato [GLY], metsulfuron-metil [MET], bispiribac-sódio [BIS] e picloram [PIC]	Girinos	Alterações de desenvolvimento e estudar o metabolismo da poliamina Efeitos letais (mortalidade) e subletais (comportamento, crescimento e anormalidades) agudos e crônicos	Lajmanovich et al. 2013
<i>Rhinella arenarum</i>	<i>In situ</i>	azinfos metilo	Girinos		Rosenbaum et al. 2012
<i>Rhinella arenarum</i>	Laboratório	clorpirifós	embriões		Sotomayor et al. 2012
<i>Rhinella fernandezae</i>	Laboratório	clorpirifós	embriões e Girinos		de Arcaute et al. 2012

<i>Rhinella arenarum</i>	<i>In Situ</i>		Girinos	condição corporal e a dieta alimentar	Bionda et al. 2012
<i>Rhinella arenarum</i>	Laboratório	trifloxistrobina	Girinos	Taxa de predação do <i>Synbranchus marmoratus</i>	Junges et al. 2012
<i>Rhinella arenarum</i>	Laboratório	carbamato carbaril (CB) e do OP azinphos metil (AM)	Girinos	Níveis reduzidos de glutathione (GSH) e as atividades de esterases e enzimas antioxidantes	Ferrari, A
<i>Rhinella arenarum</i>	Laboratório	organofosforados malatião e azinfos-metila	embriões	Efeitos dependentes da concentração e do tempo dos inseticidas no metabolismo da poliamina e relacioná-los ao desenvolvimento embrionário normal e alterado do sapo	Lascano et al. 2011
<i>Rhinella fernandezae</i>	<i>In Situ</i>		Adultos	Parâmetros indicativos de estado geral e de saúde	Brodeur et al. 2011
<i>Rhinella arenarum</i>	Laboratório	Roundup Ultra-Max (ULT), Infosato (INF), Glifoglex e C-K YUYOS FAV	Girinos	Atividades da acetilcolinesterase (AChE), butirilcolinesterase (BChE), carboxilesterase (CbE) e glutathione S-transferase (GST)	Lajmanovich et al. 2011
<i>Rhinella arenarum</i>	Laboratório	azinfos-metil carbamato carbaril e o organofosforado	embriões	Ações anticolinesterásicas ou pró-oxidantes e possível relação com o aparecimento de alterações morfológicas	Lascano et al. 2011
<i>Rhinella arenarum</i>	Laboratório	azinfos metílico	embriões	Defesas antioxidantes de embriões em desenvolvimento	Ferrari et al. 2009
<i>Rhinella arenarum</i>	Laboratório	arsenito e zinco	Girinos	Toxicidade aguda	Brodeur et

				e subcrônica	al. 2009 Vasconcelos-Teixeira et al. 2021
<i>Rhinella diptycha</i>	<i>In Situ</i>	Ca, Zn,	Adultos	Biomarcadores de estresse oxidativo (Catalase -CAT-, Glutathione S-Transferase -GST-, Glutathione Reduzida -GSH- e peroxidação	
<i>Rhinella arenarum</i>	<i>In Situ</i>	OD baixo e Cu	Embriões e Girinos	lipídica -TBARS-, micronúcleos	Peluso et al. 2020
<i>Rhinella arenarum</i>	Laboratório	cobre e o nonilfenol	Embriões e Girinos	Toxicidade letal	Aronzon et al. 2020
<i>Rhinella arenarum</i>	Laboratório	níquel	embriões	Toxicidade aguda, crônica de curto prazo e crônica	Sztrum et al 2011
<i>Rhinella arenarum</i>	Laboratório	cádmio	Adultos	Doses subletais de cádmio (Cd) no fígado, rim e sangue	Medina et al. 2016
<i>Rhinella granulosa</i>	Laboratório	Cobre	Girinos	Sensibilidade ao cobre	Franco-De-Sa & Val 2014
<i>Rhinella diptycha</i>	<i>In Situ</i>	microplásticos	Adultos	Conteúdo do estômago ou análise fecal	Mackenzie & Vladimirova 2021
<i>Rhinella marina</i>	Laboratório	luz artificial noturna	Adultos	Atividade locomotora, redução da atividade e regulação da massa corpórea	Secondi et al. 2021
<i>Rhinella arenarum</i>	Laboratório	fenol	Embriões	Toxicidade após fitorremediação	Paisio et al. 2019
<i>Rhinella marina</i>	Laboratório	cafeína, ácido benzoico e ibuprofeno	Adultos	Cinética de absorção	Llewelyn et al. 2019
<i>Rhinella arenarum</i>	<i>In Situ</i>	fosfato, nitrato	Adultos, ovos e embriões	Amplexo e oviposições	Babini et al. 2018
<i>Rhinella arenarum</i>	Laboratório	SiO ₂ -NPs coloidais	Girinos	Concentração de efeito não observado (NOEC), a concentração de efeito observado	Lajmanovich et al. 2018

<i>Rhinella arenarum</i>	<i>In Situ</i>	fosfato	Girinos	mais baixo (LOEC), Unidades tóxicas (TU), atividade enzimática do estresse oxidativo (glutathione S-transferase-GST) e genotoxicidade (frequência de micronúcleos e outras anormalidades nucleares de eritrócitos-ENAs)	Babini et al. 2017
<i>Rhinella arenarum</i>	Laboratório	éter diglicídico de bisfenol A (BADGE)	Embriões e Girinos	Dieta de girinos e o tamanho das Girinos e metamorfos Taxas de letalidade, concentrações letais, efeitos subletais	Wolkowicz et al. 2016
<i>Rhinella arenarum</i>	Laboratório	PANI-Nps Poluentes orgânicos persistentes	Girinos	Efeitos crônicos	Ibarra et al. 2016
<i>Rhinella marina</i>	<i>In Situ</i>		Adultos	Exposição a POPs e danos ao DNA	Gonzalez-Mille et al. 2013

4. CAPÍTULO II

EFEITOS GENOTÓXICOS EM ANUROS DE *RHINELLA* *DIPTYCHA* DE ÁREA AGRÍCOLA E URBANA NO CERRADO.

Efeitos genotóxicos em anuros de *Rhinella diptycha* de área agrícola e urbana no Cerrado

Ellen Kristine Silva Costa¹, Cirley Gomes Araújo dos Santos¹, Rhayane Alves Assis^{1,2}, Marcelino Benvindo-Souza^{1,3}, Rinneu Elias Borges^{1,4}, Lia Raquel de Souza Santos¹

¹Laboratório de Ecotoxicologia e Sistemática Animal, Instituto Federal Goiano, IF Goiano, campus Rio Verde, Rodovia Sul Goiana, Km 01, Zona Rural, Rio Verde, Goiás. CEP 75.901-970, Brasil

²Departamento de Biologia, Universidade Estadual Paulista - Júlio de Mesquita Filho, UNESP, campus São José do Rio Preto, R. Cristóvão Colombo, 2265, Jardim Nazareth, São José do Rio Preto, SP. CEP 15.054-000, Brasil

³Laboratório de Mutagênese, Instituto de Ciências Biológicas, ICB I - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás. CEP 74690-900, Brasil

⁴Departamento de Biologia, Universidade de Rio Verde, UniRV, Fazenda Fontes do Saber, Rio Verde, GO. CEP 75.901-970, Brasil

*Autor correspondente:

Lia Raquel Souza Santos, lia.santos@ifgoiano.edu.br

Fone/Fax: +55 64 36205600

Resumo

O crescimento populacional humano tem contribuído para a expansão das áreas urbana e agrícola. Esse cenário favorece o aumento de xenobióticos gerando impacto para a biodiversidade. Neste estudo, girinos de *Rhinella diptycha* foram utilizados como espécies indicadoras para susceptibilidade de dano genotóxico em área urbana e agrícola no município de Rio Verde, Goiás, Brasil. O estudo foi desenhado para uma investigação *in situ* e em laboratório para análise da capacidade de recuperação do dano. O teste do micronúcleo e outras alterações eritrocitárias nucleares foi utilizado para verificação da genotoxicidade. Os resultados indicaram que animais de área agrícola apresentam maior frequência de dano genotóxico comparados aos de ambiente urbano. Entretanto, na área urbana, células como binucleadas e entalhadas, anormalidades nucleares, foram encontradas com frequência mais elevadas em relação ao ambiente de lavouras. Após uma comparação das amostras *in situ*, com aqueles que permaneceram em água limpa, para recuperação (controle negativo), observou-se, no geral, diminuição de dano. Em conclusão, este estudo reforça que anfíbios anuros de ambiente agrícola são susceptíveis a dano genotóxico, mesmo em subdosagens biodisponíveis de xenobióticos. Entretanto, mais estudos ainda são necessários, sobretudo utilizando múltiplos biomarcadores para *R. diptycha*.

Palavras-chave: Anuros; Agricultura; Micronúcleo; Toxicidade; Urbanização

4.1 INTRODUÇÃO

O crescimento populacional humano e das práticas agrícolas tem promovido aumento no consumo de agroquímicos (Köhler e Triebkorn, 2013; Bernabò et al., 2016), e conseqüentemente, a geração de resíduos torna-se disponível nos ambientes naturais. Essas ações podem causar desequilíbrio no ecossistema e atingir organismos não alvos, como os anfíbios, que vivem associados aos ambientes aquáticos. Misturas de pesticidas globalmente comuns podem causar mortalidade em até 99% dos girinos e esse efeito não foi totalmente explicado pelas ações individuais desses agroquímicos (Relyea, 2009). Um estudo recente, realizado por Santos et al. (2021) associou os efeitos citotóxicos e mutagênicos em larvas de *Lithobates catesbeianus* à presença de efluentes urbanos, industriais e domésticos. Além disso, outros trabalhos relataram a ocorrência de malformações em girinos, os quais por suas características morfofisiológicas são especialmente suscetíveis a pesticidas e outros compostos químicos (Borges et al., 2019a). Citam-se também as alterações genotóxicas detectadas através da formação de células micronucleadas como consequência da exposição a compostos químicos (Pérez-Iglesias et al., 2018; Borges et al., 2019b). Esse conjunto de alterações, aliado à fragmentação de habitat (Babiniet al., 2016) e mudanças climáticas são fatores que colaboram para o declínio das populações de anuros (Lannoo, 2008; Borges et al., 2019a).

Os anfíbios anuros desempenham papel importante nos ecossistemas, atuando como indicadores da sensibilidade da população a estresses causados por atividades antrópicas (Böllet al., 2013; Green et al., 2019). Aliado a isto, o uso de biomarcadores é ferramenta útil para a avaliação desses impactos, e pode demonstrar as alterações induzidas por agentes xenobióticos em diversos grupos animais. O teste de micronúcleo (MN) e outras alterações eritrocitárias nucleares (AENs), por exemplo, vem sendo utilizado há mais de 30 anos para verificar a existência de danos ao DNA em anfíbios resultantes de impactos ambientais (Benvindo-Souza et al., 2020). Micronúcleos podem surgir em frequência elevada em células cujo animal esteve exposto a algum agente tóxico capaz de causar fragmentação cromossômica (Pollo et al., 2017). Juntamente com a análise de MN, é apontada a existência de outras AENs como núcleos lobados, células binucleadas e núcleos entalhados que também foram relacionados à genotoxicidade e mutagenicidade de xenobióticos (Pollo et al., 2015). No entanto, embora seja crescente os estudos que avaliam os efeitos dos agroquímicos sobre os anfíbios (Gonçalves et al., 2019; Nascimento et al., 2020), há ainda escassez de trabalhos voltados para os efeitos celulares das atividades antrópicas pela contaminação dos recursos hídricos, em particular, das águas dos rios usados para consumo humano.

Várias espécies de anfíbios já foram estudadas para o alerta precoce de qualidade ambiental. Em recente revisão sobre teste de micronúcleo em eritrócitos de girinos, Benvindo-Souza et al. (2020) relataram que a maior parte das pesquisas na América do Sul foram feitas com rãs-touro (*Lithobates catesbeianus*), e poucos experimentos com espécies nativas e principalmente estudos *in situ*. Assim, considerando a importância dos anfíbios para os ecossistemas e de modo diminuir lacunas de conhecimento sobre o grupo, este trabalho teve como finalidade verificar a genotoxicidade em larvas de *Rhinella diptycha* (Anura, Bufonidae) que habitam áreas agrícola e urbana no município de Rio Verde, Goiás, Brasil. Esse anfíbio quando adulto, é um animal de grande porte comumente encontrado em áreas abertas e urbanas, ampla distribuição na América do Sul, encontrado no Brasil, Paraguai, Bolívia, Argentina e Uruguai (Frost, 2021), inclusive no Cerrado Brasileiro (Colli et al., 2002).

Neste contexto, a hipótese é que girinos de ambientes antropizados apresentem dano genotóxico em função da exposição aos contaminantes ambientais, e que os animais de ambiente agrícola apresentem maior frequência de danos em relação aos de

ambiente urbano. Além disso, avaliando se as populações conseguem se recuperar dos danos quando permanecerem longe dos ambientes contaminados.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo e coleta de animais

O presente estudo foi realizado no município de Rio Verde, situado no sudoeste do estado de Goiás, sendo o quarto município mais populoso dessa unidade federativa. Um total de 40 girinos de *R. diptycha* foram coletados, sendo 20 de ambiente agrícola ($17^{\circ}45'34.9''\text{S } 51^{\circ}03'39.7''\text{ W}$) e 20 em ambiente urbano ($17^{\circ}47'40''\text{S } 50^{\circ}56'18''\text{ W}$). Um *buffer* de uso e cobertura do solo foi gerado no QGIS com malhas do MapBiomas para um raio de 1 km ao redor dos locais estudados (Figura 1). Os animais foram retirados do ambiente natural, e apresentaram-se entre os estágios 32 e 35 G (Gosner, 1960).

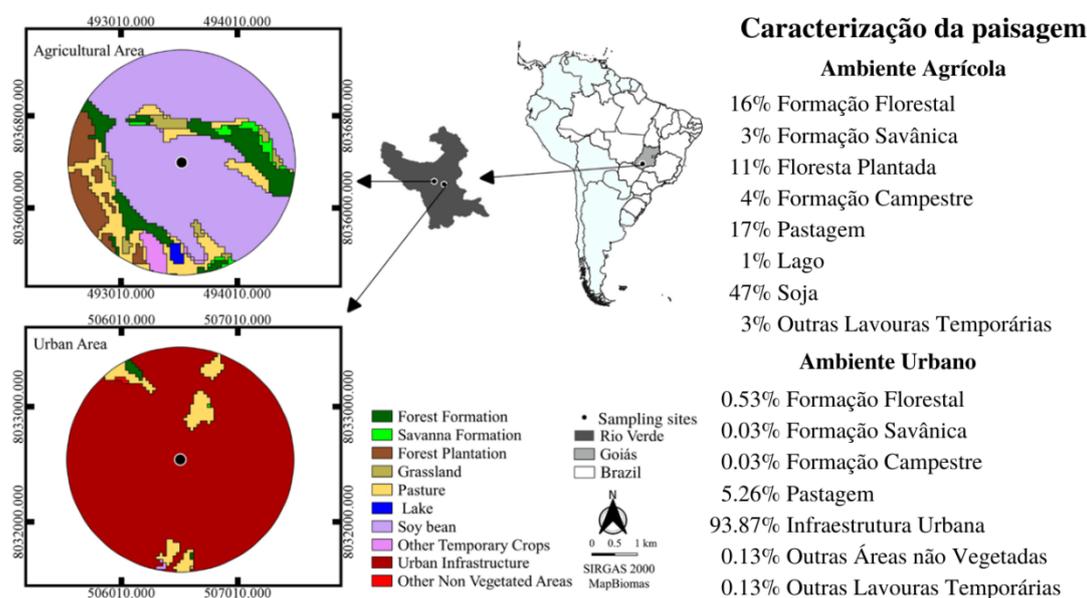


Figura 1. Áreas de amostragens em ambiente de área agrícola e urbana. O círculo preto ao centro de cada imagem representa o ponto de coleta dos espécimes.

Na área agrícola que fica a 15km da cidade de Rio Verde, há dominância do plantio de soja (47%), enquanto remanescentes do cerrado perfazem 23% do local. Os animais foram retirados de ambiente lântico, formado por uma depressão do terreno usada como reservatório de água, com pouca vegetação da família das gramíneas próxima ao local. No momento da coleta, o local possuía pouca água, pois estava no final da estação de estiagem. A ocupação do solo se dá por rotação de culturas de milho e soja, mas no momento da coleta compreendia o período de repouso, entre a colheita e o plantio, por isso, o solo estava coberto por palhada, matéria orgânica resultante dos restos da plantação colhida.

Para a área urbana, o ponto de coleta ocorreu no Córrego do Sapo, estando circundado por 94% de infraestrutura urbana. Esse local é considerado um ambiente lótico, sendo um dos principais corpos d'água que atravessam a cidade de Rio Verde, modificado por gabiões e recebe rejeitos gerados no município, como efluentes domésticos e industriais (Amorim, 2020). A coleta dos animais aconteceu no final da estação seca (setembro/2020), e por isso, o córrego apresentava baixo nível de água. Os animais foram recolhidos em um ponto do córrego que fica próximo a uma avenida de

área residencial, com pouca movimentação de automóveis. O local apresenta forração de plantas rasteiras bem próximas ao córrego, sendo que a área de preservação permanente do córrego está sendo invadida pela ocupação urbana sem planejamento (Bolpato, 2012).

Dos 40 animais coletados nas áreas antropizadas, 10 de cada ambiente tiveram amostras sanguíneas obtidas para o teste de micronúcleo ainda *in situ*. Os demais animais foram transportados para o Laboratório de Ecotoxicologia e Sistemática Animal no Instituto Federal Goiano (EcotoxSA), campus Rio Verde para exposição em água limpa (controle negativo), a fim de avaliar a possibilidade de recuperação de possíveis danos ocasionados pela exposição do ambiente de origem. No laboratório, os animais foram mantidos em aquários com capacidade de 5 litros, com 5 animais cada, e permaneceram em ambiente com fotoperíodo natural, por 96 horas. Parâmetros como salinidade, pH, temperatura, condutividade e oxigênio dissolvido da água foram coletados através do analisador multiparâmetro de análises de água (Bante900P).

Análise de água

Amostras de água foram coletadas em ambos os locais de estudo para análises físico-químicas. As amostras foram coletadas em Rio Verde, sendo encaminhadas ao laboratório para análise em até 24h após a coleta. Um litro de água foi coletado aproximadamente 5 cm abaixo da superfície do tanque no mesmo dia em que os animais foram coletados em cada local. As amostras foram armazenadas em frascos individuais de vidro borossilicato âmbar com temperatura <4°C e enviadas a um laboratório privado em Rio Verde, Goiás, Brasil, para quantificação dos pesticidas carbamato, organoclorado e organofosforado. Todos esses compostos podem ser encontrados em áreas agrícolas, seja após sua aplicação recente ou na forma residual de aplicações anteriores. As análises foram conduzidas de acordo com os procedimentos descritos em Métodos Padrão para o Exame de Água e Águas Residuais, 23ª edição (Greenberg, 1992). Os parâmetros foram avaliados com base nos padrões definidos pela Resolução CONAMA nº 357/2005 - Classe II e decreto 1.745/1979.

A temperatura, pH, oxigênio dissolvido, condutividade, resistividade, salinidade e sólidos totais dissolvidos da água de cada local de estudo foram medidos *in situ* usando um aparelho multiparâmetro portátil Bante900P. Essas medições foram realizadas no dia da coleta das larvas de *R. dipytcha* em cada local, aproximadamente às 12h.

Teste de micronúcleo

Para o teste de micronúcleo, os animais foram inicialmente anestesiados por imersão em água gelada (Borges et al., 2019b). Amostras de sangue foram obtidas através de secção caudal e dois esfregaços sanguíneos foram confeccionados em lâminas para cada animal. As amostras foram secas ao ar livre, fixadas com metanol 100% a 4°C, por 20 minutos, e posteriormente corados com Giemsa a 10% por 12 minutos (Pérez-Iglesias et al., 2016, Borges et al., 2019b). Foram analisadas 1000 células para cada animal, para determinar a frequência de MN e outras AENs, usando ampliação de 1000x em microscópio. Os MNs foram determinados por possuírem diâmetro menor que o núcleo principal; o material não reflexivo, com mesma ou menor intensidade de coloração em comparação ao núcleo principal e a estrutura não estando ligada ou sobreposta ao núcleo principal (Fenech, 2000; Pollo et al., 2017). Além da frequência dos MNs, também foram investigadas a presença de outras AENs, conforme sugerido na revisão recente de Benvindo-Souza et al. (2020), tais como: brotos

nucleares (BR), núcleos reniformes (NR), células binucleadas (BN), anucleadas (AN), núcleos entalhados (NE), núcleos segmentados (NS) e núcleos lobados (NL) (Cruz-Esquivel et al., 2017; Borges et al., 2019b). A frequência de AENs está apresentada por cada tipo e pela junção de todas elas, segundo abordagem padrão (Pollo et al., 2015; Borges et al., 2019b).



Figura 2. Processo de obtenção de amostra biológica para a realização do teste de micronúcleo.

Análise de dados

Os dados de MN e AENs são apresentados como média \pm erro padrão. Após a análise da normalidade dos dados (Shapiro Wilk), o teste T de Student para dados paramétricos ou o teste U de Mann Whitney para dados não paramétricos foi executado para comparações entre os ambientes, área agrícola e urbana, e para comparações de amostras de mesmo sítio de coleta com os indivíduos que passaram pela recuperação em laboratório. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo em todas as análises.

4.3 RESULTADOS

Parâmetros físico-químico das águas

Na análise química da água não foram identificados pesticidas acima do limite estabelecido pela legislação brasileira para área agrícola ou urbana (Material Suplementar, Tabelas 3, 4 e 5). No entanto, vários agrotóxicos foram identificados, porém alguns sem informação da regulamentação e limite mínimo aceitável em

legislação. Na área urbana foram observados elementos como, Nitrogênio Amoniacal Total, Alumínio Dissolvido, Zinco Total e Bário Total, com valores acima do seu limite de quantificação, mas dentro do estabelecido em resolução brasileira. Concomitantemente, os Surfactantes Aniônicos apresentam valores acima do limite de quantificação, entretanto não há recomendação mínima na legislação. Já os metais Cobre Total, Ferro Dissolvido e Níquel Total, apresentam os valores de quantificação acima do permitido pela legislação brasileira (Resolução CONAMA 357/2005).

Genotoxicidade entre populações nos ambientes agrícola e urbano

Na comparação entre ambientes, girinos da área agrícola apresentaram frequência de 8,5 vezes maior de micronúcleo em relação ao ambiente urbano (Figura 3). Já para outras anormalidades nucleares, em contraste, as células binucleadas e células com núcleo entalhado estavam com frequência significativamente mais elevada nos animais de ambiente urbano comparados aos de área agrícola.

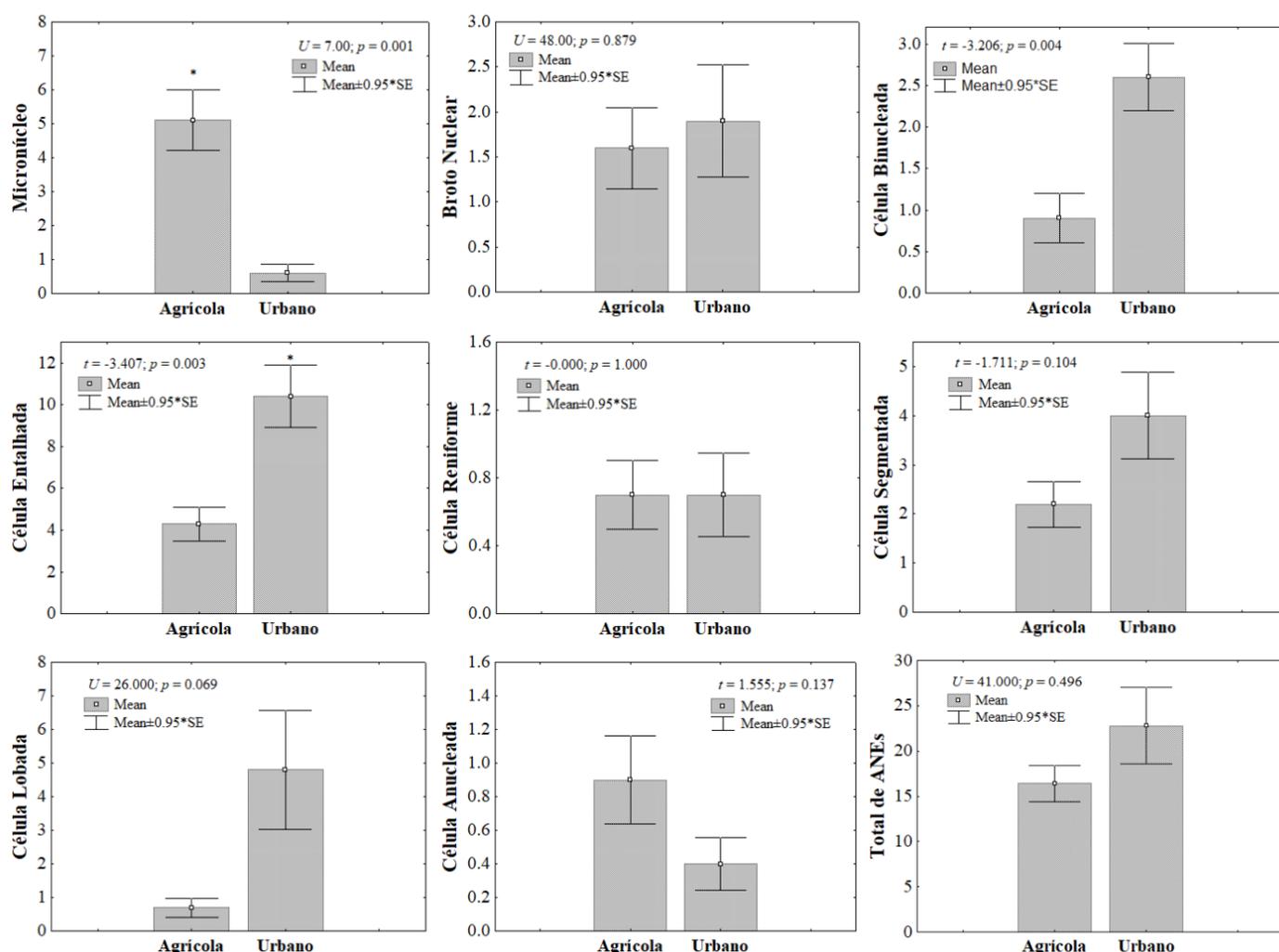


Figura 3. Média e erro padrão da frequência de micronúcleo e outras anormalidades eritrocitárias nucleares entre ambientes.

Genotoxicidade entre as populações in situ e controle negativo

Para área agrícola, as células micronucleadas foram muito mais frequentes em comparação aos animais em recuperação, controle negativo. E, as células entalhadas foram encontradas em maior quantidade nos animais do controle negativo (Figura 4).

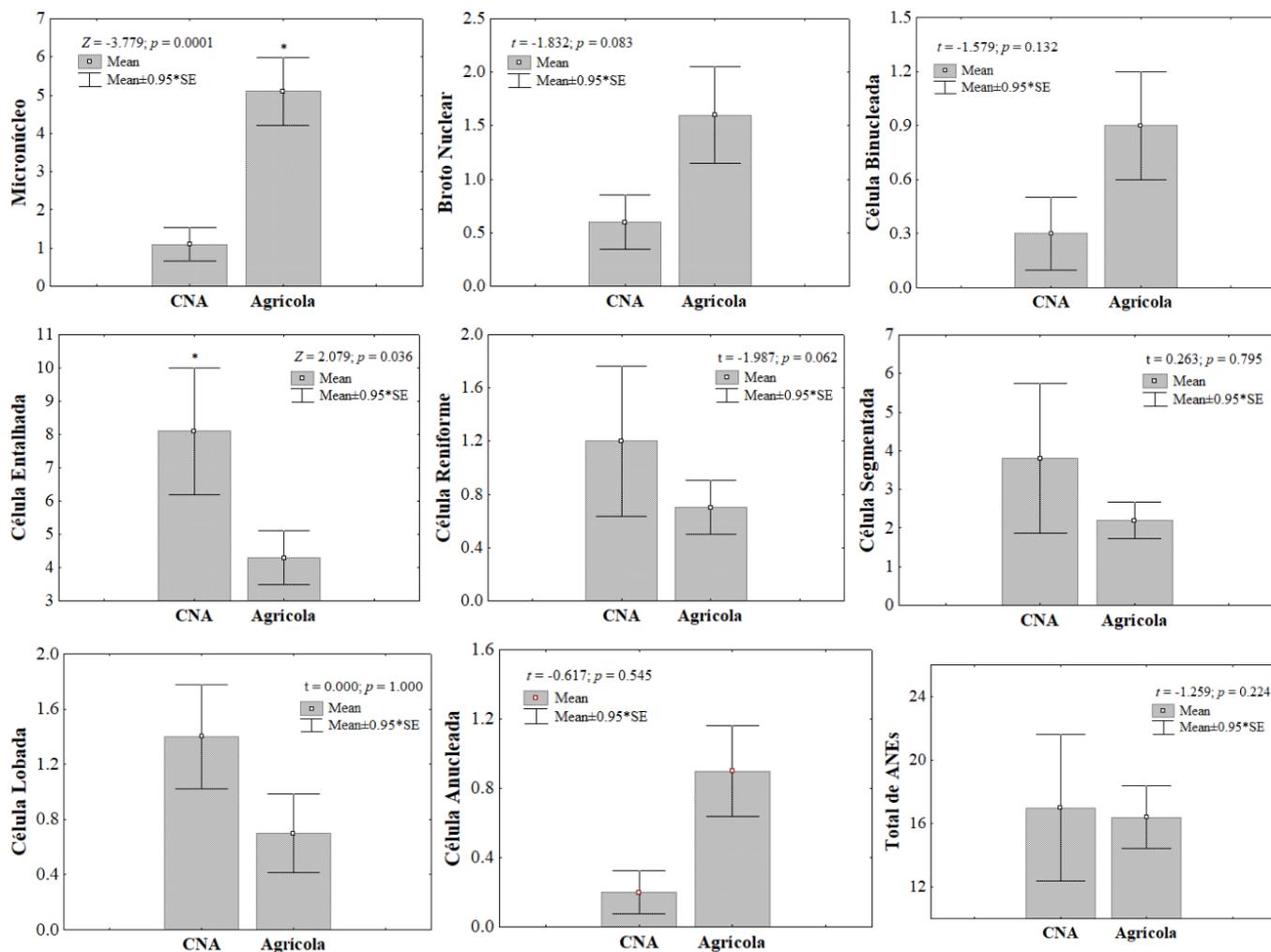


Figura 4. Frequência da média de dano genotóxico em animais de área agrícola e seu respectivo controle negativo. CNA = Controle Negativo Agrícola.

Com relação a área urbana (Figura 5), houve diferença significativa para células binucleadas e núcleo entalhado sendo encontradas com maior frequência na análise *in situ*. Para as demais alterações eritrocitárias não houve diferença na comparação entre os animais *in situ* e o controle, respectivamente.

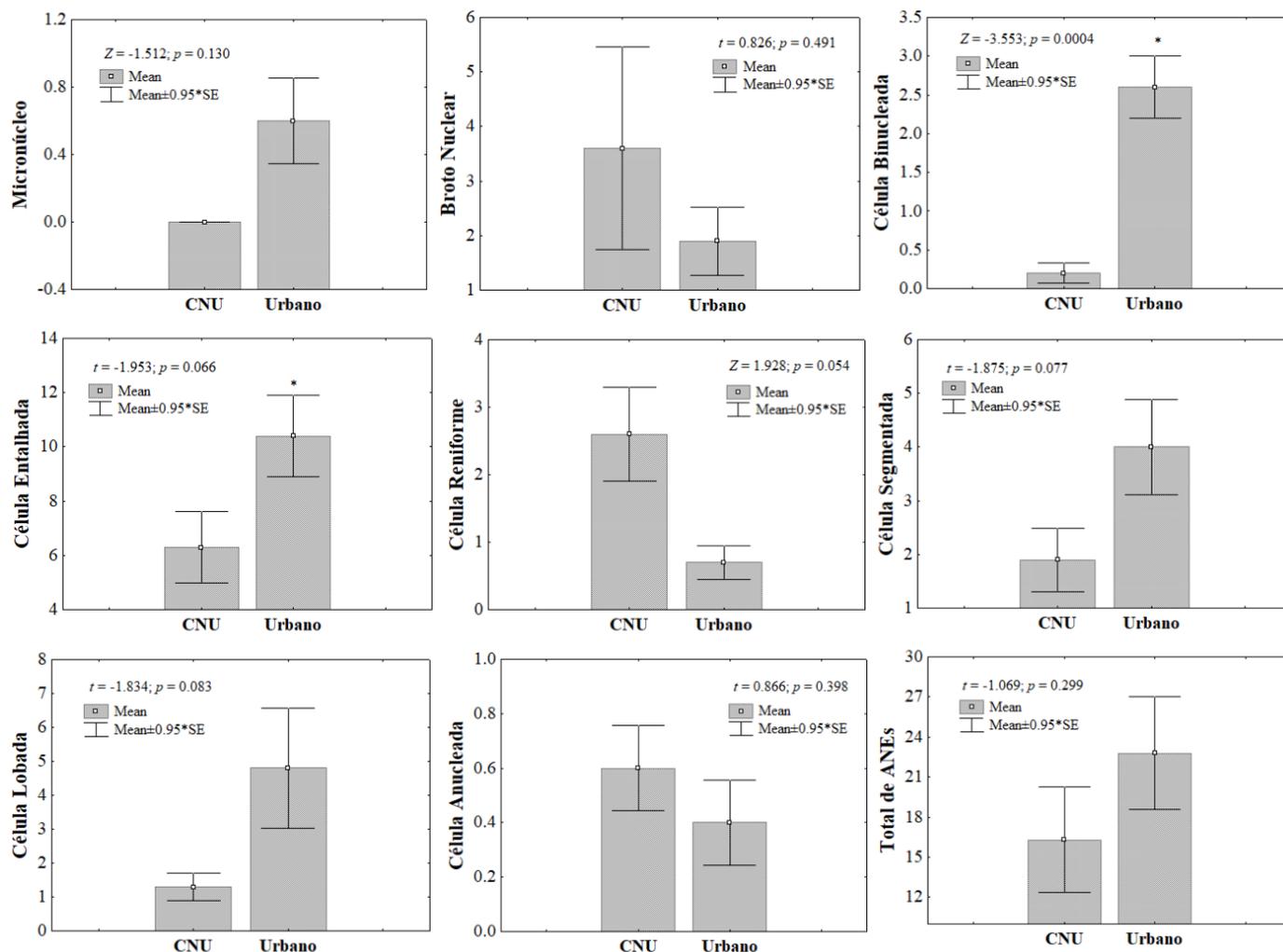


Figura 5. Frequência média e erro padrão de micronúcleo e das anormalidades eritrocitárias nucleares em animais da área urbana e controle negativo. CNU = Controle Negativo Urbano.

4.4 DISCUSSÃO

No presente estudo, identificaram que os animais de ambiente agrícola e urbano são impactados e apresentam alterações genotóxicas, pois micronúcleo e várias anormalidades nucleares foram observadas em larvas de *R. diptycha* coletados nos ambientes antropizados. Entre os ambientes, foi observado que na área urbana os animais têm maior susceptibilidade ao desenvolvimento de células binucleadas e entalhadas. Segundo Lajmanovich et al. (2014) e Arcaute et al. (2014) essas anormalidades nucleares podem ocorrer pelo contato com contaminantes ambientais que possuem atividade citotóxica, genotóxica ou mutagênica. Em estudos *in situ*, essas AENs foram observadas em anuros em áreas urbanas (Pollo et al. 2015), plantações de soja (Pollo et al. 2015; Borges et al. 2019b), áreas de silvicultura e pecuária (Cruz-Esquivel et al. 2017) e áreas associadas às operações de mineração (Pollo et al. 2017).

É sabido que corpos d'água contaminados por poluentes tóxicos, como pesticidas, provocam alterações morfológicas (Lajmanovich et al. 2003; Carezzano e Cabrera 2011; Babini et al. 2016; Perez-Iglesias et al. 2016; Borges et. al 2019a) e formação de células micronucleadas que causam danos citogenéticos em anuros (Rudek

e Rozek 1992; Candiotti et al. 2010; Pérez-Iglesias et al. 2014; Borges et al. 2019b). Mesmo que não tenham sido identificados pesticidas acima do limite estabelecido pelo CONAMA, reforça-se o alerta para duas situações, nas quais (i) foram identificados outros elementos que não possuem recomendação pela legislação e que possivelmente podem interagir com os compostos presentes e detectados na água, bem como (ii) não há informações sobre os efeitos para as subdosagens desses pesticidas no ambiente para organismos não alvos. Nesse sentido este trabalho traz informações importantes acerca da potencialidade das subdosagens desses compostos para anuros. No ambiente agrícola, embora tenha sido evidenciada a dominância da cultura da lavoura de soja, a matriz é complexa sendo constituída também por pastagem e outras culturas. Assim, o aumento da presença de micronúcleos é um indicativo de possível descaracterização dessa paisagem (Fig.1). Os resultados do presente estudo mostram mais evidências de que os ambientes agrícolas contribuem para o aumento da frequência de AENs, e em especial chama a atenção para esses efeitos em espécies nativas.

Além disso, estudos *in situ* são potencialmente influenciados pela interação de múltiplos estressores (Pollo et al. 2017, Carrasco et al., 2021), assim, observar outros componentes tais como pH e a temperatura da água, faz-se necessário, pois esses podem influenciar na toxicidade de muitos poluentes (Hoffman et al. 2010; Pollo et al. 2017). Para anfíbios, o pH ideal para um desenvolvimento saudável varia entre 6,3 e 7,7 (García e Fontúrbel 2003; Babini et al. 2015; Pollo et al. 2017), nesse caso, o pH dos dois pontos de coleta e do controle negativo estão dentro de faixa, não sendo fator preocupante no estresse dos animais. No entanto, foi verificada temperatura mais alta da água no ponto de coleta do ambiente agrícola, (diferença de 5°C para ambiente urbano), isso aliado a presença de substâncias químicas na água, pode ter contribuído para maior frequência de micronúcleos nas células. No trabalho realizado por Assis et al. (2021), foi demonstrado que a temperatura mais alta dos corpos d'água de ambiente agrícola quando comparada à temperatura da água do ambiente referência (Parque Nacional das Emas) também foi relacionada a frequência maior de anormalidades nucleares.

Na avaliação da qualidade da água, com a finalidade de prever o risco ambiental, é recomendado não somente utilizar análises químicas, mas também ecológicas e toxicológicas, pois só a verificação das concentrações de substâncias não é suficiente para demonstrar efeitos ambientais adversos (Roig et al. 2015; Castro-Català et al. 2016). Nesse contexto, o trabalho realizado por Santos et al. (2021) destaca a importância da relação entre o uso do solo e qualidade das águas dos rios e, assim, com base nessas análises ecotoxicológicas é possível perceber que está ocorrendo danos nas células dos animais. Outro trabalho realizado por Perez-Iglesias et al. (2016), constatou-se que diferentes níveis de Atrazina, um dos herbicidas mais utilizados nos últimos anos podem retardar o crescimento e desenvolvimento das larvas de anuros. Babini et al. (2016) afirmaram que ambientes agrícolas favorecem aumento de anormalidades nucleares, conforme também constatado neste estudo *in situ*. No entanto, mesmo que vários estudos em ambiente natural tenham demonstrado maior frequência de micronúcleos em ambientes agrícolas quando comparados com áreas controle (Gonçalves et al. 2015; Pollo et al. 2016; Cruz-Esquivel et al. 2017), como por exemplo para *Dendropsophus minutus*, *Physalaemus cuvieri* e *Scinax fuscovarius*, o conhecimento sobre a vulnerabilidade *in situ* de anuros do cerrado brasileiro aos efeitos genotóxicos em ambientes agrícolas, em especial na região sudoeste do estado de Goiás, ainda é incipiente (Borges et al., 2019b).

Quanto à análise da água do ambiente urbano, as concentrações de metais como Cobre total, Níquel total e Ferro dissolvido estavam acima dos valores estabelecidos pela legislação brasileira, sendo uma preocupação, portanto, quanto ao uso, por parte da

população, para as atividades de pesca. A presença de metais em córregos urbanos é devido ao despejo de esgotos domésticos (Gagnon et al., 2006), bem quanto ao despejo de agrotóxicos, os quais são conhecidos como potencial fonte de metais, como, o Cobre (Cu), Zinco (Zn), Cádmio (Cd) e Chumbo (Pb) (Lopes et al., 2011; Silva et al., 2017; Simonato et al., 2016). Cobre e zinco são metais essenciais para seres vivos, em pequenas concentrações desempenham papel importante no metabolismo dos organismos aquáticos, e participam de processos fisiológicos, mas, em altas concentrações, esses metais podem ser tóxicos (Heath, 1995). Os metais, Pb e Ni ocorrem de forma natural no meio ambiente, podendo apresentar efeitos tóxicos em peixes, como estresse oxidativo, genotoxicidade e alterações de parâmetros fisiológicos, mesmo em baixas concentrações (Martinez et al., 2004; AlAttar, 2007; Chahid et al., 2014; Palermo et al., 2015). Assim, esses compostos podem ter contribuído para o aparecimento de alterações eritrocitárias nucleares nos animais de área urbana.

Mesmo que neste estudo não tenha sido detectado frequência significativa de MN nos animais da área urbana, as alterações eritrocitárias nucleares (AENs) apresentaram-se evidentes, e devem ser consideradas na avaliação e interpretação dos resultados, conforme recomendado por Thomas et al. (2009a), Bolognesi et al. (2013) e Gomez-Meda et al. (2017). A presença de micronúcleos e botões nucleares está relacionado a efeitos genotóxicos (Gomez-Meda et al., 2017), ou seja, instabilidade cromossômica ou danos ao DNA. No entanto, a presença de células binucleadas está relacionada com danos ao fuso mitótico e resulta em um efeito aneugênico (Gomez-Meda et al., 2017). Portanto, podem ser consideradas indicativas de dano genético (Çavas e Ergene-Gözükara 2005; GökalpMuranli e Güner 2011), e que podem levar a efeitos carcinogênicos (Çavas et al., 2005). Essa contaminação de corpos d'água por poluentes como os metais pode causar efeitos tóxicos em diferentes níveis tróficos, ameaçando a saúde das populações de organismos aquáticos (Lima et al., 2018). Especialmente o córrego em que foram retirados os animais, é usado para pesca e consumo de peixes, por isso, a população local precisa ter cautela sobre a qualidade da fauna, uma vez que é relatado o grande potencial que os metais pesados têm de serem repassados através da cadeia trófica, pelo processo de bioacumulação e biomagnificação (Amorim, 2020).

Além de células binucleadas, outra alteração com frequência significativa encontradas nas duas áreas analisadas foi o núcleo entalhado, uma fenda que penetra ao centro do núcleo (Ghislet al., 2014). Segundo Fernandes et al. (2007), estas anormalidades podem acontecer pela adição ou perda de um cromossomo, que ocorre por causa da ligação de compostos químicos às moléculas de tubulina, que formam o fuso e a citocinese, podendo levar à formação de células com núcleos irregulares, botões nucleares, micronúcleos e minicélulas.

Ressalta-se que os animais coletados em área agrícola apresentaram cerca de 8,5 vezes (média MNAA)/média MNAU) mais danos genotóxicos, evidenciados pela quantidade maior de micronúcleos, quando comparados com os animais de área urbana. Desta forma, sugere-se que no primeiro ambiente a interação entre agentes estressores, quando existir, mesmo em dosagens inferiores ao limite de quantificação, é promotora de alterações genotóxicas nas larvas de *R. diptycha*. No caso da área urbana, o córrego do Sapo, recebe um aporte de efluentes diariamente, e muitas vezes os compostos químicos estão diluídos, e por serem populações que convivem com a poluição diariamente podem estar mais resistentes à contaminação. No entanto, não se pode excluir os danos também observados nas larvas deste ambiente, pois a frequência de outras anormalidades, como núcleo entalhado e binucleado, foi maior que nos animais de área agrícola. Como visto nos resultados, não houve diferença significativa na

análise total das AENs nos animais *in situ* quando comparados com os animais que passaram pelo período de recuperação, provando que essas anormalidades celulares podem ser irreversíveis e aparecerem nas gerações futuras, podendo prejudicar a sobrevivência das espécies nos ambientes impactados (Obiakor, 2012). O uso de amostras desses animais na fase adulta e uma avaliação mais sistemática, por meio do emprego de outros biomarcadores, poderão acrescentar conhecimentos importantes sobre as perturbações sofridas por essa espécie, principalmente quando envolvem estudos *in situ*.

4.5 CONCLUSÃO

Este estudo indica a presença de dano genotóxico em girinos de *R. diptycha* em paisagem modificada pela agricultura e urbanização no cerrado central, Brasil. A frequência de dano ao DNA, possivelmente foi originada de pesticidas e efluentes industriais e domésticos. Esses resultados são de extrema relevância para gerar alerta precoce para espécies de anuros, bem quanto para outros organismos não alvos que habitam ambientes transformados. Além disso, chamando atenção para a área urbana, cujo córrego é utilizado para pesca e consumo de peixes, e que a população precisa ter cautela sobre a qualidade da fauna local, haja vista que as concentrações de Cobre, Níquel e Ferro estavam acima dos valores estabelecidos pela legislação brasileira. Novos estudos ainda são necessários com essa espécie, sobretudo avaliando número maior de sítios de amostragens ao longo dos gradientes urbano e agrícola, além de aplicação de outros biomarcadores.

Agradecimentos: Ao Instituto Federal Goiano, pela disponibilidade de infraestrutura e apoio financeira para publicação do artigo, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) e Fundo Brasileiro para a Biodiversidade.

Authors' contributions

Financiamento: Não aplicável

Disponibilidade de dados: Não aplicável

Conformidade com os padrões éticos

Conflito de interesse: Os autores declaram não haver conflito de interesse

Aprovação ética: Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto Federal Goiano (n. 4023200121) e pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (SISBIO/ICMBio, n. 34485).

Consentimento para participar: Todos os autores participaram deste trabalho

Consentimento para publicar: Todos os autores concordam em publicar

4.6 REFERÊNCIAS

Al-Attar, A.M. 2007. The influences of nickel exposure on selected physiological parameters and gill structure in the Teleost fish, *Oreochromis Niloticus*. *J. Biol. Sci.* 7 (1), 77e85.

Amorim, N. P. L. 2020. Avaliação Ecotoxicológica de Contaminantes Ambientais em Populações de Peixes de Área Urbana. Dissertação (Mestrado) – Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde.

Antunes, S.C.; Castro, B.B.; Nunes, B.; Pereira, R.; Gonçalves, F. 2008. In situ bioassay with *Eisenia andrei* to assess soil toxicity in an abandoned uranium mine. *Ecotoxicol Environ Saf* 71:620–631

Arcaute, C.R.; Pérez-Inglesis, J.M.; Nikoloff, N.; Natale, G.S.; Soloneski, S.; Larramendy, M.L. 2014. Genotoxicity evaluation of the insecticide imidacloprid on circulating blood cells of Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae) by comet and micronucleus bioassays. *Ecol Indic* 45:632–639

Assis, R.A., Rezende, W.R., Dos Santos, C.G.A. et al. 2021. Habitat differences affect the nuclear morphology of the erythrocytes and the hepatic melanin in *Leptodactylus fuscus* (Anura) in the Brazilian Cerrado savanna. *Environ Sci Pollut Res.*

Babini, M.S.; Bionda, C.L.; Salas, N.E.; Martino, A.L. 2016. Adverse effect of agroecosystem pond water on biological endpoints of common toad (*Rhinella arenarum*) tadpoles. *Environmental Monitoring and Assessment*, 188: 459.

Benvindo-Souza, M.; Oliveira, E.A.S.; Assis, R.A.; Santos, C.G.A.; Borges, R.E.; Silva, D.M.; Santos, L.R.S. 2020. Micronucleus test in tadpole erythrocytes: Trends in studies and new paths. *Chemosphere*, 240. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.124910.

Bernabò, I.; Guardia, A.; Macirella, R.; Sesti, S.; Crescente, A.; Brunelli, E. 2016. Effects of long-term exposure to two fungicides, pyrimethanil and tebuconazole, on survival and life history traits of Italian tree frog (*Hyla intermedia*). *Aquatic Toxicology*, 172:56–66.

Böll, S.; Schmidt, B.; Veith, M.; Wagner, N.; Rödder, D.; Weinmann, C.; Kirschev, T.; Loetters, S. 2013. Amphibians as indicators of changes in aquatic and terrestrial ecosystems following GM crop cultivation: a monitoring guideline. *BioRisk*, 8: 39-51.

Bolognesi, C.; Knasmueller, S.; Nersesyan, A.; Thomas, P.; Fenech, M. 2013. The HUMNxl scoring criteria for different cell types and nuclear anomalies in the buccal micronucleus cytome assay: an update and expanded photogallery. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* 753, 100e113.

Bolpato, Marieli Basso. 2012. Diagnóstico Ambiental do Córrego Sapo, Rio Verde, Goiás e suas possíveis implicações com a saúde. 107 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação STRICTO SENSU em Ciências Ambientais e Saúde) - Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia - Goiás.

Borges, R.E.; Santos, L.R.S.; Assis, R.A.; Benvindo-Souza, M.; Franco-Belussi, L.; Oliveira, C. 2019a. Monitoring the morphological integrity of neotropical anurans. *Environ. Sci. and Pol. Res.*, 26: 2623–2634.

Borges, R.E.; Santos, L.R.S.; Benvindo-Souza, M.; Modesto, R.S.; Assis, R.A.; Oliveira, C. 2019b. Genotoxic Evaluation in Tadpoles Associated with Agriculture in the Central Cerrado, Brazil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 77: 22-28.

Budischak, S.A.; Belden, L.K.; Hopkins, W.A. 2008. Effects of malathion on embryonic development and latent susceptibility to trematode parasites in ranid tadpoles. *Environ Toxicol Chem* 27:2496–2500 Rohr JR, McCoy KA (2010) A qualitative meta-analysis reveals consistent effects of atrazine on freshwater fish and amphibians. *Environ Health Perspect* 18:20–32

Candiotti, J.V.; Natale, G.S.; Soloneski, S.; Ronco, A.E.; Larramendy, R.L. 2010. Sublethal and lethal effects on *Rhinella Arenarum* (Anura, Bufonidae) tadpoles exerted by the pirimicarb-containing technical formulation insecticide Aficida®. *Chemosphere* 78:249–255

Carezzano, F.J.; Cabrera, M.R. 2011. Variación en la fórmula dentaria larval de *Physalaemus biligonigerus* (Amphibia, Leptodactylidae) de humedales en agroecosistemas del sur de Córdoba, Argentina. *Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay* 20:28–33

Carrasco, G.H.; de Souza, M.B.; de Souza Santos, L.R. 2021. Effect of multiple stressors and population decline of frogs. *Environ Sci Pollut Res* 28, 59519–59527. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-16247-6>

Castro, B.B.; Guilhermino, L.; Ribeiro, R. 2003. In situ bioassay chambers and procedures for assessment of sediment toxicity with *Chironomus riparius*. *Environ Pollut* 125:325–335

Castro-Català, N.; Kuzmanovic, M.; Roig, N.; Sierra, J.; Ginebreda, A.; Barceló, D.; Pérez, S.; Petrovic, M.; Picó, Y.; Schuhmacher, M.; Muñoz, I. 2016. Ecotoxicity of sediments in rivers: Invertebrate community, toxicity bioassays and the toxic unit approach as complementary assessment tools. *Sci Total Environ* 540:297–306

Çavas, T.; Ergene-Gözükara, S. 2005. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquat Toxicol* 74(3):264–271

Çavas, T.; Garanko, N.; Arkhipchuk, V. 2005. Introduction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate *Food Chem. Toxicol.*, 43, pp. 569-57

Chahid, A.; Hilali, M.; Benhachimi, A.; Bouzid, T. 2014. Contents of cadmium, mercury and lead in fish from the Atlantic Sea (Morocco) determined by atomic absorption spectrometry. *Food Chem.* 147, 357e360. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.008>. Elsevier Ltd.

Colli, G.R.; Bastos, R.P.; Araújo, A.F.B. 2002. The character and dynamics of the Cerrado Herpetofauna. In: OLIVEIRA, P.S., MARQUIS, R.J., (Eds.), *The Cerrados of Brazil: Ecology and Natural History of a Neotropical Savanna*, New York, USA, Columbia University Press, p. 233–241.

Cribb, A. Y. 2013. Manual técnico de ranicultura / André Yves Cribb, Andre Muniz Afonso, Cláudia Maris Ferreira Mostério. – Brasília, DF : Embrapa.

Cruz-Esquivel, A.; Vilorio-Rivas, J.; Marrugo-Negrete, J. 2017. Genetic damage in *Rhinella marina* populations in habitats affected by agriculture in the middle region of the SinA River, Colombia. *Environ Sci Pollut Res* 24:27392–27401

Fenech, M. 2000. The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 455: 81–95.

Fernandes, T.C.C.; Mazzeo, D.E.C.; Marin-Morales, M.A. 2007. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88(3), 252–259.

Frost, D.R. 2010. Amphibian Species of the World: an online reference. Version 5.4. Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. New York: American Museum of Natural History. Captured on Sep 2010.

Gagnon, C.; Gagné, F.; Turcotte, P.; Saulnier, I.; Blaise, C.; Salazar, M.H.; Salazar, S.M. 2006. Exposure of caged mussels to metals in a primary-treated municipal wastewater plume. *Chemosphere*, v. 62, p. 998-1010.

García, G.C.; Fontúrbel, F.R. 2003. Propuestas para un desarrollo sostenible: Lago Titikaka por estrategias K. Editorial Publicaciones Integrales, La Paz

Ghisi, N.C.; De Oliveira, E.C.; Fávaro, L.F.; Silva De Assis, H. C.; Prioli, A.J. 2014. In Situ Assessment of a Neotropical Fish to Evaluate Pollution in a River Receiving Agricultural and Urban Wastewater. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 93(6), 699–709.

Gökalmuranli, F.D.; Güner, U. 2011. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes of mosquito fish (*Gambusia affinis*) following exposure to the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. *Mut Res* 726:104–108

Gomez-Meda, B.C.; Zuniga-Gonzalez, G.M.; Sanchez-Orozco, L.V.; Zamora-Perez, A.L.; Rojas-Ramirez, J.P.; Rocha-Munoz, A.D.; Sobrevilla-Navarro, A.A.; Arellano-Avelar, M.A.; Guerrero-De Leon, A.A.; Armendariz-Borunda, J.S. 2017. Buccal micronucleus cytome assay of populations under chronic heavy metal and other metal exposure along the Santiago River, Mexico. *Environ. Monit. Assess.* 189, 522.

Gonçalves M.W.; Campos, C.B.M.; Godoy, F.R.; Gambale, P.G.; Nunes, H.F.; Nomura, F.; Bastos, R.P.; Cruz, A.D.; Silva, D.M. 2019. Assessing genotoxicity and mutagenicity of three common amphibian species inhabiting agroecosystem environment. *Arch Environ Contam Toxicol* 77:409–420

Gonçalves, M.W.; Vieira, T.B.; Maciel, N.M.; Carvalho, W.F.; Lima, L.S.F.; Gambale, P.G.; Cruz, A.D.; Nomura, F.; Bastos, R.P.; Silva, D.M. 2015. Detecting genomic damages in the frog *Dendropsophus minutus*: preserved versus perturbed areas. *Environ Sci Pollut Res* 22:3947–3954. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3682-1>

Gosner, K.L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, 16:183-190.

Green, F.B.; East, A.G.; Salice, C.J. 2019. Will temperature increases associated with climate change potentiate toxicity of environmentally relevant concentrations of chloride on larval green frogs (*Lithobates clamitans*)? *Science of the Total Environment*, 682: 282-290.

Greenberg, A. E., Clesceri, L. S., Eaton, A. D., Franson, M. A. H. 1992. Standard Methods for the Examination of the Water and Wastewater.

Heath, A.G. 1995. Water Pollution and Fish Physiology, second ed. C.R.C. Press: Lewia Publishers.

Hoffman, D.J.; Rattner, B.A.; Burton, G.A.; Cairns, J.J. 2010. Handbook of ecotoxicology. CRC Press, London, New York, Washington

Köhler, H.R.; Triebkorn, R. 2013. Wildlife ecotoxicology of pesticides: can we track effects to the population level and beyond? Science, 341: 759-765.

Lajmanovich, R.C.; Cabagna-Zenklusen, M.C.; Attademo, A.M.; Junges, C.M.; Peltzer, P.M.; Basso, A., Lorenzatti, E. 2014. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in tadpoles of the common toad (*Rhinella arenarum*) treated with the herbicides Liberty® and glufosinate-ammonium. Mutat Res Genetic Toxicol Environ Mutagenesis 769:7-12

Lajmanovich, R.C.; Sandoval, M.T.; Peltzer, P.M. 2003. Induction of mortality and malformation in *Scinax nasicus* tadpoles exposed by glyphosate formulations. Bull Environ Contam Toxicol 70:612-618

Lannoo, M. 2008. The collapse of aquatic ecosystems: malformed frogs. University of California press, Berkeley.

Lima, L.; Morais, P.; Andrade, R.; Mattos, L.; Moron, S. 2018. Use of biomarkers to evaluate the ecological risk of xenobiotics associated with agriculture. Environmental pollution (Barking, Essex: 1987). 237. 611-624.

Lopes, C.; Herva, M.; Franco-Uría, M.; Roca, E. 2011. Inventory of heavy metal content in organic waste applied as fertilizer in agriculture: evaluating the risk of transfer into the food chain. Environ. Sci. Poll Res. 18(6):918-939.

Martin, L.B.; Hopkins, W.A.; Mydlarz, L.D.; Rohr, J.R. 2010. The effects of anthropogenic global changes on immune functions and disease resistance. Ann N Y Acad Sci 1195:129-148

Martinez, C.B.R.; Nagae, M.Y.; Zaia, C.T.B.V.; Zaia, D.A.M. 2004. Acute morphological and physiological effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. Braz. J. Biol. 64 (4), 797e807. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842004000500009>.

Nascimento, F. A.; Alves, A. A.; Nunes, H. F.; Miziara, F.; Parise, M. R.; Silva, D.M. 2020. Cultivated areas and rural workers' behavior are responsible for the increase in agricultural intoxications in Brazil? Are these factors associated? Environ Sci Pollut Res 27:38064-38071. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09988-3>

Obiakor, M. O.; Okonkwo, J. C.; Nnabude, P. C.; Ezeonyejiaku, C. D. 2012. Ecogenotoxicology: Micronucleus Assay in Fish Erythrocytes as In situ Aquatic Pollution Biomarker: a Review. Journal of Animal Science Advances, v. 2(1): p. 123-133.

Palermo, F. F.; Risso, W. E.; Simonato, J. D.; Martinez, C. B. R. 2015. Bioaccumulation of nickel and its biochemical and genotoxic effects on juveniles of the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 116, 19e28. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.02.032>. Elsevier.

Pérez-Iglesias, J. M.; Soloneski, S.; Nikoloff, N.; Natale, G. S.; Larramendy, M. L. 2016. Toxic and genotoxic effects of the imazethapyr-based herbicide formulation Pivot H® on monteideo tree frog *Hypsiboaspulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 119: p. 15 -24.

Pérez-Iglesias, J.M.; Arcaute, C.R.; Nikoloff, N.; Dury, L.; Soloneski, S.; Natale, G.S.; Larramendy, M.L. 2014. The genotoxic effects of the imidacloprid-based insecticide formulation GlacoxanImida on Monteideo tree frog *Hypsiboaspulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*104, 120e126.

Pérez-Iglesias, J.M.; Natale, G.S.; Soloneski, S.; Larramendy, M.L. 2018. Are the damaging effects induced by the imazethapyr formulation Pivot® H in Boanapulchella (Anura) reversible upon ceasing exposure? *Ecotoxicol. Environ. Saf.*148, 1e10.

Pérez-Iglesias, J.M.; Soloneski, S.; Nikoloff, N.; Natale, G.S.; Larramendy, M.L. 2015. Toxic and genotoxic effects of the imazethapyr-based herbicide formulation Pivot H ® on monteideo tree frog *Hypsiboaspulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicol Environ Saf* 119:15–24

Pollo, F.E.; Bionda, C.L.; Salinas, Z.A.; Salas, N.E.; Martino, A.L. 2015. Common toad *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867) and its importance in assessing environmental health: test of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes. *Environmental Monitoring and Assessment*, 187: 581.

Pollo, F.E.; Grenat, P.R.; Otero, M.A.; Salas, N.E.; Martino, A.L. 2016. Assessment in situ of genotoxicity in tadpoles and adults of frog *Hypsiboascordobae* (Barrio 1965) inhabiting aquatic ecosystems associated to fluorite mine. *Ecotoxicol Environ Saf* 133:466–474

Pollo, F.E.; Grenat, P.R.; Salinas, Z.A.; Otero, M.A.; Salas, N.E.; Martino, A.L. 2017. Evaluation in situ of genotoxicity and stress in South American common toad *Rhinella arenarum* in environments related to fluorite mine. *Environmental Science and Pollution Research*, 24: 18179–18187

Relyea, R.A.A. 2009. Cocktail of contaminants: how mixtures of pesticides at low concentrations affect aquatic communities. *Oecologia* 159:363–376 Rudek Z, Rozek M (1992) Induction of micronuclei in tadpoles of *Rana temporaria* and *Xenopus laevis* by the pyrethroid Fastac 10 EC. *Mutat Res* 298:25–29

Roig, N.; Sierra, J.; Nadal, M.; Moreno-Garrido, I.; Nieto, E.; Hampel, M.; Gallego, E.P.; Schuhmacher, M.; Blasco, J. 2015. Assessment of sediment ecotoxicological status as a complementary tool for the evaluation of surface water quality: the Ebro river basin case study. *Sci Total Environ* 503–504:269–278

Santos, F.I.; Mizobata, A.A.; Suyama, G.A.; Cenci, G.B.; Follador, F.A.C.; Arruda, G.; Hellmann, L.; Gomes, E.M.V.; De Oliveira Schmitz, A.P.; Pokrywiecki, J.C.; Lingnau, R.; Manosso, F.C.; Pokrywiecki, T.S.; Düsman, E. 2021. Cytotoxicity and mutagenicity of the waters of the Marrecas River (Paraná, Brazil) to bullfrogs (*Lithobates scaberrimus*). *Environ Sci Pollut Res Int*. May;28(17):21742-21753. doi: 10.1007/s11356-020-12026-x. Epub 2021 Jan 7. PMID: 33410086.

Silva, Y.J.A.B.; Cantalice, J.R.B.; Nascimento, C.W.A.; Singh, V.P.; Silva, Y.J.A.B.; Silva, C.M.C.A.C.; Silva, M.O.; Guerra, S.M.S. 2017. Bedload as an indicator of heavy metal contamination in a Brazilian anthropized watershed. *C* 153(2):106-113.

Simonato, J.D.; Mela, M.; Doria, H.B.; Guiloski, I.C.; Carvalho, P.S.; Meletti, P.C.; Silva De Assis, H.C.; Bianchini, A.; Martinez, C.B. 2016. Biomarkers of waterborne copper exposure in the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Aquat Toxicol* 170(1):31-41.

Thomas, P.; Wang, Y.J.; Zhong, J.H.; Kosaraju, S.O.; Callaghan, N.J.; Zhou, X.F.; Fenech, M. 2009b. Grape seed polyphenols and curcumin reduce genomic instability events in a transgenic mouse model for Alzheimer's disease. *Mutat. Res.* 661, 25e34.

Voccia, I.; Blakley, B.; Brousseau, P.; Fournier, M. 1999. Immunotoxicity of pesticides: a review. *Toxicol Ind Health* 15:119–132

Young, B.; Stuart, S.N.; Chanson, J.S.; Cox, N.A.; Boucher, T.M. 2004. Disappearing jewels: The status of New World amphibians. *Nature* Serve, Arlington Kiesecker JM (2002) Synergism between trematode infection and pesticide exposure: a link to amphibian limb deformities in nature? *Proc Natl Acad Sci* 99:9900–9904

Material Suplementar

Frequência de dano genotóxico

Tabela 1. Frequência média de micronúcleo e outras anormalidades nucleares eritrocitárias de animais coletados em ambiente agrícola e urbano.

Alterações	Média±erro padrão		Resumo estatístico
	Agrícola (n=10)	Urbano (n=10)	
Micronúcleo	5.10±0.94*	0.60±0.27	$U = 7.000; p = 0.001$
Broto nuclear	1.60±0.48	1.90±0.66	$t = -0.369; p = 0.716$
Binucleada	0.90±0.31	2.60±0.43*	$t = -3.407; p = 0.004$
Núcleo entalhado	4.30±0.86	10.40±1.57*	$t = -3.407; p = 0.003$
Núcleo segmentado	2.20±0.49	4.00±0.93	$t = -1.711; p = 0.104$
Núcleo reniforme	0.70±0.21	0.70±0.26	$t = -0.000; p = 1.000$
Núcleo lobado	0.70±0.30	4.80±1.86	$U = 26.000; p = 0.069$
Anucleada	0.90±0.28	0.40±0.16	$t = 1.555; p = 0.137$
Total AENs	16.40±2.07	22.80±4.42	$U = 41.000; p = 0.496$

(*) indica diferença significativa entre os ambientes. Teste T de Student e teste U de Mann Whitney foram aplicados. Um $p < 0,05$ foi considerado significativo.

Tabela 2. Frequência média de dano genotóxico de animais de áreas agrícola e urbana estudadas para controle negativo.

Alterações nos eritrócitos	Média±erro padrão dos tratamentos					
	CAA	Agrícola	P-valor	CAU	Urbano	P-valor
MN	1.10±0.46	5.10±0.94*	0.015	0.00±0.00	0.60±0.27	0.067
BR	0.90±0.41	1.60±0.48	0.207	3.60±1.95	1.90±0.66	0.759
BI	0.30±0.21	0.90±0.31	0.208	0.20±0.13	2.60±0.43*	0.005
NE	8.10±2.00	4.30±0.86	0.140	6.30±1.39	10.40±1.57*	0.027
NS	3.80±2.04	2.20±0.49	0.889	1.90±0.62	4.00±0.93	0.107
NR	1.20±0.59	0.70±0.21	0.529	2.60±0.73	0.70±0.26	0.063
NL	1.40±0.40	0.70±0.30	0.286	1.30±0.42	4.80±1.86	0.097
AN	0.20±0.13	0.90±0.28	0.076	0.60±0.16	0.40±0.16	0.528
Total AENs	17.00±4.87	16.40±2.07	0.959	16.30±4.16	22.80±4.42	0.232

CAA = Controle Área Agrícola, CAU = Controle Área Urbana, MN = Micronúcleo, BR = Broto Nuclear, BI = Célula Binucleada, NE = Núcleo Entalhado, NS = Núcleo Segmentado, NR = Núcleo Reniforme, NL = Núcleo Lobado, AN = Célula Anucleada, AENs = Anormalidades. (*) diferença significativa entre o grupo amostral e seu controle.

Parâmetros físico-químico da água

Tabela 3. Análise físico-química da água nas áreas amostradas.

Parâmetros	Área Agrícola	Área Urbana
Temperatura	30,1 °C	25,1 °C
pH	7,43	6,68
Oxigênio Dissolvido	74,8%	28,3%
Condutividade	4,75 µ/s	152,5 µ/s
TDS	2,11ppm	75,8 ppm
Salinidade	0,00psu	0,07 psu
Resistividade	2,52 KΩ	6,5 KΩ

TDS = Sólidos Totais Dissolvido.

Tabela 4. Resultado da Análise de pesticidas em Área Agrícola.

Parâmetros	Resultados	Unidade	LQ	CONAMA 357/2005 Classe II (VMP)
Glifosato	<55,00	µg/L	55,00	65,00
Glifosato+Ampa	<105,00	µg/L	105,00	NR

2,4D	<0,1500	µg/L	0,1500	4,0000
2,4,5T	<1,00	µg/L	1,00	2,00
2,4D+2,4,5T	<1,15	µg/L	1,15	NR
Alaclor	<0,100	µg/L	0,100	20,000
Aldicarb + Aldicarb sulfona+aldicarb sulfóxido	<10	µg/L	10	NR
Aldrin+Dieldrin	<0,00200	µg/L	0,00200	0,00500
Atrazina	<1,00	µg/L	1,00	2,00
Carbendazina+Benomil	<20,000	µg/L	20,000	NR
Carbofurano	<5,000	µg/L	5,000	NR
Clordano Cis + Trans	<0,020	µg/L	0,020	0,04
Clorpirifós+Clorpirifós Oxon	<5,100	µg/L	5,100	NR
Diuron	<50,000	µg/L	50,000	NR
Endossulfan alfa+Endossulfan Beta+Endossulfan Sulfato	<0,030	µg/L	0,030	0,056
Endrin	<0,001000	µg/L	0,001000	0,004000
Gama-BHC (Lindano)	<0,010	µg/L	0,010	0,020
Metamidofós	<5,0000	µg/L	5,0000	NR
Molinato	<0,100	µg/L	0,100	NR
o,p-DDD+ o,p-DDE+ o,p-DDT	<0,0030	µg/L	0,0030	NR
Parationa Metílica	<0,050	µg/L	0,050	NR
Pendimetalina	<0,100	µg/L	0,100	NR
Permetrina	<0,200	µg/L	0,200	NR
Profenofós	<0,100	µg/L	0,100	NR
Simazina	<0,100	µg/L	0,100	2,000
Tebuconazol	<0,100	µg/L	0,100	NR
Terbufós	<0,100	µg/L	0,100	NR
Trifluralina	<0,050	µg/L	0,050	0,200

NR: Não há recomendação pela legislação, VMP: Valor máximo permitido, pH: Potencial hidrogeniônico, cel: células, uH: Unidade da cor pelo Hazen em mg/L Pt-Co, NTU: Unidades Nefelométricas de Turbidez, V.A.: Virtualmente ausente, UFC: Unidade formadora de colônia, LQ: Limite de Quantificação, N.A.: Não Aplicável; E.A.: Em Análise.

Águas de Classe I, II e III - limites definidos segundo a Resolução N° 357 do CONAMA de 17 de março de 2005. Segundo a RESOLUÇÃO CONAMA 357/2005: CLASSE II: destina-se ao abastecimento doméstico, após tratamento convencional; à proteção das comunidades aquáticas; à recreação de contato primário.

Tabela 5. Resultados da Análise Química da água de Área Urbana.

Parâmetros	Resultados	Unidade	LQ	1CONAMA 357/2005 Classe II (VMP)
Surfactantes aniônicos	0,09	mg/L	0,001	NR
Nitrogênio amoniacal total	0,28	mg/L	0,01	3,7
Alumínio dissolvido	0,09	mg/L	0,01	0,1
Chumbo total	0,01	mg/L	0,01	0,01
Cobre total	0,06*	µg/L	0,001	0,009
Cromo total	0,01	CU	0,01	0,05

Ferro dissolvido	1,58*	mg/L	0,01	0,3
Fósforo total	0,03	mg/L	0,01	NR
Manganês total	0,01	mg/L	0,01	0,1
Níquel total	0,05*	mg/L	0,01	0,025
Zinco total	0,012	mg/L	0,01	0,18
Antimônio	< 0,004	mg/L	0,004	0,005
Arsênio total	< 0,006	mg/L	0,010	0,010
Bário total	0,222	mg/L	0,001	0,700
Berílio total	< 0,0003	mg/L	0,0003	0,0400
Boro total	< 0,2	mg/L	0,2	0,5
Cádmio total	< 0,0005	mg/L	0,0005	0,0010
Cobalto total	< 0,001	mg/L	0,001	0,050
Lítio total	< 0,008	mg/L	0,008	2,500
Mercúrio	< 0,0002	mg/L	0,0002	0,0002
Prata total	< 0,005	mg/L	0,005	0,010
Selênio total	< 0,008	mg/L	0,008	0,010
Vanádio total	< 0,01	mg/L	0,01	0,10
Alaclor	< 0,1	µg/L	0,1	20,0
Aldrin + Dieldrin	< 0,002	µg/L	0,002	0,005
Atrazina	< 1,0	µg/L	1,0	2,0
Carbaril	< 0,01	µg/L	0,01	0,02
ClordanoCis + Trans	< 0,02	µg/L	0,02	0,04
2 – Clorofenol	< 0,05	µg/L	0,05	0,10
2,4 – D	< 0,15	µg/L	0,15	4,00
Demeton (Demeton-O + DemetonS)	< 0,02	µg/L	0,02	0,10
1,2 Dicloroetano	< 0,000450	µg/L	0,000450	0,01
1,1 Dicloroetano	< 0,00010	µg/L	0,00010	0,00300
2,4 Diclorofenol	< 0,05	µg/L	0,05	0,30
DDT (p,p’-DDT+p,p’-DDE + p,p’-DDD)	< 0,003	µg/L	0,003	0,002
Mirex	< 0,001	µg/L	0,001	0,001
(Dodecacloropentaciclodecano)				
Endossulfan Alfa + Endossulfan	< 0,03	µg/L	0,03	0,06
Beta + Endossulfan Sulfato				
Endrin	< 0,001	µg/L	0,001	0,004
Glifosato	< 55	µg/L	55	65
Gution	< 0,004	µg/L	0,004	0,005
HeptacloroEpóxido + Heptacloro	< 0,02	µg/L	0,02	0,01
Hexaclorobenzeno	< 0,001	µg/L	0,001	0,007
Lindano (Gama-BHC)	< 0,01	µg/L	0,01	0,02
Malation	< 0,05	µg/L	0,05	0,10
Metolacloro	< 0,1	µg/L	0,1	10,0
Metoxicloro	< 0,001	µg/L	0,001	0,030
Paration	< 0,01	µg/L	0,01	0,04
Pentaclorofenol	< 0,00010	µg/L	0,00010	0,009

Simazina	< 0,1	µg/L	0,1	2,0
2,4,5 T	< 1,0	µg/L	1,0	2,0
Tetracloretano	< 0,000310	µg/L	0,000310	0,010000
Toxafeno	< 0,01	µg/L	0,01	0,01
Triclorobenzeno (1,2,3 + 1,2,4+1,3,5)	< 0,43000	µg/L	0,43	NR
Tricloroeteno	< 0,0020	µg/L	0,002	0,0300
2,4,6 Triclorofenol	< 0,00010	µg/L	0,0001	0,01000
Trifuralina	< 0,05	µg/L	0,05	0,20
2,4,5 TP	< 1,0	µg/L	1,0	10,0

NR: Não há recomendação pela legislação, VMP: Valor máximo permitido, pH: Potencial hidrogeniônico, cel: células, uH: Unidade da cor pelo Hazen em mg/L Pt-Co, NTU: Unidades Nefelométricas de Turbidez, V.A.: Virtualmente ausente, UFC: Unidade formadora de colônia, LQ: Limite de Quantificação, N.A.: Não Aplicável; E.A.: Em Análise.

Águas de Classe I, II e III - limites definidos segundo a Resolução N° 357 do CONAMA de 17 de março de 2005. Segundo a RESOLUÇÃO CONAMA 357/2005: CLASSE II: destina-se ao abastecimento doméstico, após tratamento convencional; à proteção das comunidades aquáticas; à recreação de contato primário. *Valores acima dos limites definidos pelo CONAMA 357/2005.

Tabela 6. Análise físico-química da água controle negativo.

Parâmetros	Área Agrícola	Área Urbana
pH	7,78	7.77
Temperatura	24,35°C	24.2°C
Condutividade	313,25 µ/s	309 µ/s
Resistividade	3,18 KΩ	3.25KΩ
Salinidade	0,15125psu	0.147 psu
TDS	154.9156,75ppm	154.10 ppm

TDS = Sólidos Totais Dissolvido.

5. CONCLUSÃO GERAL

O uso de organismos teste pertencentes à classe dos anfíbios tem apresentado crescimento nos estudos de ecotoxicologia. Para o gênero *Rhinella*, nos últimos 10 anos

foram publicados a cerca de sete artigos por ano. Ainda assim, são escassos os estudos com diferentes espécies dessa importante classe, os anfíbios. Considerando que este gênero possui cerca de 90 espécies, e apenas 8 foram encontradas nas pesquisas, isso reflete o grande trabalho que se tem pela frente, a fim de conhecer melhor sobre as espécies e proteger a biodiversidade dos impactos gerados pelas ações antrópicas. Como contribuição ao preenchimento das lacunas de conhecimento, o segundo capítulo deste trabalho, identificou a presença de dano genotóxico em larvas de anfíbio da espécie *Rhinella diptycha*, em cenário alterado por atividades agrícolas e urbanas no Cerrado central, Brasil. A frequência de dano ao DNA, provavelmente foi causada por pesticidas e efluentes industriais e domésticos. Com esses resultados é possível ressaltar a extrema relevância em gerar alerta precoce para espécies de anuros. Chamando atenção para a área urbana, pois o córrego é utilizado para pesca e consumo de peixes e a população deve ter cautela sobre a qualidade da fauna local, por causa das concentrações de Cobre, Níquel e Ferro que se encontravam acima dos valores estabelecidos pela legislação brasileira. Os estudos ecotoxicológicos têm grande importância sobre a qualidade de vida e sobrevivência das espécies, visto que pelas espécies relatadas no primeiro e segundo capítulo, é possível perceber os impactos gerados pelos contaminantes. Com isso, a ecotoxicologia tem importante papel na busca pela vigilância das espécies, a fim de conter possíveis declínios populacionais. Destarte, desta contribuição científica, ressaltando que são necessários outros estudos com número maior de locais de amostragens percorrendo os gradientes urbano e agrícola, como também a aplicação de outros biomarcadores.