

DIOGO FERREIRA DO AMARAL

**BIOMARCADORES COMPORTAMENTAIS E
MUTAGÊNICOS EM GIRINOS DE RÃ TOURO (*LITHOBATES
CATESBEIANUS*) EXPOSTOS À ABAMECTINA**

**Programa de Pós-Graduação em Conservação de Recursos Naturais do Cerrado
(Mestrado Profissional)**



Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano

Reitor

Prof. Dr. Vicente Pereira Almeida

Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação e Inovação

Prof. Dr. Fabiano Guimarães Silva

Campus Urutaí

Diretor Geral

Prof. Dr. Gilson Dourado da Silva

Diretor de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação

Prof. Dr. André Luís da Silva Castro

Programa de Pós-Graduação em Conservação de Recursos Naturais do Cerrado

Coordenador

Prof. Dr. Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes

DIOGO FERREIRA DO AMARAL

**BIOMARCADORES COMPORTAMENTAIS E
MUTAGÊNICOS EM GIRINOS DE RÃ TOURO
(*LITHOBATES CATESBEIANUS*) EXPOSTOS À
ABAMECTINA**

Orientador

Prof. Dr. André Luis da Silva Castro

Coorientador

Prof. Dr. Guilherme Malafaia

Dissertação apresentada ao Instituto Federal Goiano –
Campus Urutaí, como parte das exigências do Programa
de Pós-Graduação em Conservação de Recursos Naturais
do Cerrado para obtenção do título de Mestre.

Urutaí, GO

2018

Os direitos de tradução e reprodução reservados.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/IF Goiano Campus Urutaí

A488b Amaral, Diogo Ferreira do.

Biomarcadores comportamentais e mutagênicos em girinos de Rã Touro (*Lithobates catesbeianus*) expostos à Abamectina / Campus Urutaí. [manuscrito] / Diogo Ferreira do Amaral. -- Urutaí, GO: IF Goiano, 2018.

50 fls.

Orientador: Dr. André Luis da Silva Castro

Coorientador: Dr. Guilherme Malafaia

Dissertação (Mestrado) – Instituto Federal Goiano - Campus Urutaí, 2018.

1. Defensivo agrícola. 2. Pesticida. 3. *Lithobates catesbeianus*.
4. Ecotoxicologia. I. Título.


CDU 631/635

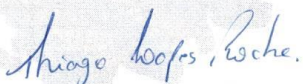


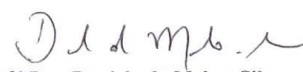
FICHA DE APROVAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

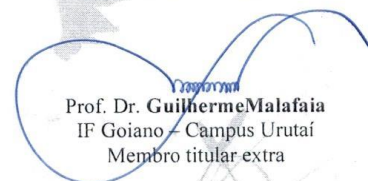
Título da dissertação:	Biomarcadores comportamentais e mutagênicos em Sirinos de rã tauro (<i>Lithobates catesbeianus</i>) expostos à Abamectina
Orientador:	Prof. Dr. André Luis da Silva Castro
Coorientador:	Prof. Dr. Guilherme Malafaia
Autor:	Diogo Ferreira do Amaral

Dissertação de Mestrado **APROVADA** em 19 de fevereiro de 2018, como parte das exigências para obtenção do Título de **MESTRE EM CONSERVAÇÃO DE RECURSOS NATURAIS DO CERRADO**, pela Banca Examinadora especificada a seguir.


 Prof. Dr. André Luis da Silva Castro
 Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí
 Presidente


 Prof. Dr. Thiago Lopes Rocha
 Universidade Federal de Goiás – Campus Samambaia
 Membro titular


 Prof.ª Dra. Daniela de Melo e Silva
 Universidade Federal de Goiás – Campus Samambaia
 Membro titular


 Prof. Dr. Guilherme Malafaia
 IF Goiano – Campus Urutaí
 Membro titular extra

*“A ciência nunca resolve um problema
sem criar pelo menos outros dez”
(George Bernard Shaw).*

AGRADECIMENTOS

Dou início a esta página agradecendo à Deus, pelo seu amor imensurável e pela sua ininterrupta presença em minha vida.

Aos meus melhores amigos, que também os chamo de “pai e mãe” - *Wanderlan Luiz do Amaral* e *Cleusa Amaral* -, pelo apoio a todas as minhas decisões, pela credibilidade e incentivo aos estudos.

Agradeço aos meus irmãos – *Alessandro Amaral* e *Thiago Amaral* - que são o maior elo entre o meu passado e meu futuro. A minha avó materna *Zilda A. Ferreira*, que supriu de forma tão grandiosa a ausência do meu avô e avós paterno. Aos meus sobrinhos – *Giovana Amaral*, *Pedro Amaral* e *Vitor Amaral* -, que mesmo tão pequenos despertam em mim a vontade de crescer em conhecimento.

Agradeço ao grande amigo indispensável, *Vinícius Guerra* pela cumplicidade e aos insubstituíveis *Carolina Prudente*, *Poliana Gabriel*, *Márcia Rosa Gomes* e *Luiza Lima*, pela torcida, apoio e confidências trocadas. Vocês são parte das minhas conquistas.

Ao meu coorientador, *Prof. Dr. Guilherme Malafaia*, pela paciência, por todo o conhecimento, por me sugerir este projeto e pelo enorme entusiasmo pela Ciência que me contagiou.

Ao meu orientador, *Prof. Dr. André Luis da Silva Castro*, pela disponibilidade em me orientar, pelo apoio, sabedoria e pela colaboração em todas as etapas desta pesquisa.

Aos grandes professores, *Dr.^a Aline Sueli de Lima Rodrigues*, *Dr. Anderson Rodrigo da Silva*, *Dr. Daniel de Paiva Silva* e *Dr. Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes*, que sem dúvidas são pilares fundamentais para existência do Programa e a todos os colegas da 1^a Turma de Mestrado do Programa de Pós Graduação em Conservação dos Recursos Naturais do Cerrado.

Agradeço ao Instituto Federal Goiano (GO, Brasil), ao Laboratório de Pesquisas Biológicas (Campus Urutaí, GO, Brasil), bem como ao *Dr. Boniek Gontijo Vaz* (Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, GO, Brasil), pela valiosa ajuda nas análises químicas das águas de exposição.

À todos, o meu muito obrigado.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	8
RESUMO.....	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. MATERIAL E MÉTODOS	15
2.1. Animais e delineamento experimental	15
2.2. Testes comportamentais	19
2.2.1. Teste de agregação	19
2.2.2. Teste de atividade natatória.....	21
2.2.3. Teste de resposta ao predador	22
2.3. Teste de Micronúcleo	23
2.4. Biometria.....	25
2.5. Análises estatísticas.....	25
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4. CONCLUSÃO.....	41
REFERÊNCIAS	41

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Distribuição temporal do experimento e análise realizada19
- Figura 2-** Vista geral do aparato utilizado no teste de agregação (A) e vista superior do aparato durante a primeira (B) e segunda sessão do teste (C). As cores são meramente ilustrativas.....20
- Figura 3-** Desenho esquemático das diferentes sessões do teste de resposta ao predador. (A) Primeira sessão do teste em que não foi utilizado estímulo predatório e (B) segunda sessão, em que o estímulo predatório foi adicionado na caixa onde se encontravam os girinos. As cores e figuras são meramente ilustrativas.....23
- Figura 4-** Variação morfológica dos eritrócitos circulantes avaliados em girinos de *Lithobates catesbeianus* expostos ou não à diferentes concentrações de abamectina. (A) eritrócito normal; (B) eritrócito micronucleado; (C) célula apoptótica; (D) núcleo *blebbed*; (E) núcleo multinucleado; (F) núcleo entalhado; (G) eritrócito binucleado; (H) núcleo reniforme.....24
- Figura 5-** (A) Biomassa corpórea e (B) comprimento boca-cloaca de girinos de *Lithobates catesbeianus* expostos ou não à diferentes concentrações de abamectina. As barras indicam a média + desvio padrão dos dados, os quais foram submetidos à two-way ANOVA. Neste caso, as múltiplas comparações foram realizadas pelo teste post hoc de Tukey, a 5% de probabilidade. As distintas letras minúsculas indicam diferenças significativas. ABA 12,5%, ABA 25% e ABA 50%, correspondem, respectivamente, aos grupos de animais expostos a 12,5% (18 µg a.i./L), 25% (36 µg a.i./L) e 50% (72 µg a.i./L) da CL₅₀ definida previamente. n = 25 girinos/grupo27
- Figura 6-** (A) Total de cruzamentos da linha central do aparato do teste de agregação, (B) percentual de tempo e (C) frequência com que os girinos permaneceram nadando de forma anormal no teste de atividade natatória e (D) tempo de permanência na zona próxima aos coespecíficos (não familiares e não aparentados) de girinos de *Lithobates catesbeianus* expostos ou não à diferentes concentrações de abamectina. As barras indicam a média + desvio padrão dos dados originais. Em “A-C”, os dados foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn’s, a 5% de probabilidade. Em “D”, os dados foram transformados em log(x) e posteriormente submetidos à two-way ANOVA. As múltiplas comparações foram realizadas pelo teste post hoc de Tukey, a 5% de probabilidade. As distintas letras minúsculas indicam diferenças significativas. ABA 12,5%, ABA 25% e ABA 50%, correspondem, respectivamente, aos grupos de animais expostos a 12,5% (18 µg a.i./L), 25% (36 µg a.i./L) e 50% (72 µg a.i./L) da CL₅₀ definida previamente. n = 25 girinos/grupo30
- Figura 7-** (A) Tempo de mobilidade e (B) atividade locomotora de girinos de *Lithobates catesbeianus* expostos ou não a diferentes concentrações de abamectina. As barras indicam a média + desvio padrão dos dados originais, os quais foram transformados em log(x) e posteriormente submetidos à two-way ANOVA. As múltiplas comparações foram realizadas pelo teste post hoc de Tukey, a 5% de probabilidade. As distintas letras minúsculas indicam diferenças significativas. ABA 12,5%, ABA 25% e ABA 50%, correspondem, respectivamente, aos grupos de animais expostos a 12,5% (18 µg a.i./L), 25% (36 µg a.i./L) e 50% (72 µg a.i./L) da CL₅₀ definida previamente. Sem estímulo predatório (SE) e com estímulo predatório (CEPred). n = 25 girinos/grupo33

Figura 8- Escores atribuídos na avaliação dos discos orais de girinos de *Lithobates catesbeianus* expostos ou não a diferentes concentrações de abamectina. (A) Escores relativos à avaliação da estrutura mandibular, (B) da pigmentação das bainhas mandibulares e (C) da dentição dos animais. A.1 e A.2 correspondem, respectivamente, a imagens representativas das estruturas mandibulares intactas (normais) e com anormalidades. B.1, B.2 e B.3 correspondem a bainhas mandibulares com pigmentação normal, com pigmentação alterada e sem pigmentação, respectivamente. C.1 e C.2 correspondem a imagens representativas da dentição normal e com alterações. As barras indicam a média + desvio padrão dos dados originais, os quais foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com teste post hoc de Dunn's, a 5% de probabilidade. As distintas letras minúsculas indicam diferenças significativas. ABA 12,5%, ABA 25% e ABA 50%, correspondem, respectivamente, aos grupos de animais expostos a 12,5% (18 µg a.i./L), 25% (36 µg a.i./L) e 50% (72 µg a.i./L) da CL₅₀ definida previamente. n = 25 girinos/grupo.....35

Figura 9- Somatório total das anormalidades nucleares eritrocitárias observado nos girinos de *Lithobates catesbeianus* expostos ou não a diferentes concentrações de abamectina. As barras indicam a média + desvio padrão dos dados originais, os quais foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com teste post hoc de Dunn's, a 5% de probabilidade. As distintas letras minúsculas indicam diferenças significativas. ABA 12,5%, ABA 25% e ABA 50%, correspondem, respectivamente, aos grupos de animais expostos a 12,5% (18 µg a.i./L), 25% (36 µg a.i./L) e 50% (72 µg a.i./L) da CL₅₀ definida previamente. C: controle; CP: controle positivo (ciclofosfamida – 40 mg/L). n = 25 girinos/grupo.....36

Figura 10- Tempo de permanência nas diferentes zonas do aparato utilizado no teste de agregação (sessão de habituação e teste) de girinos de *Lithobates catesbeianus* dos grupos controle (A), ABA 12,5% (B), ABA 25% (C) e ABA 50% (D). As barras indicam a média + desvio padrão dos dados originais. Os dados paramétricos foram submetidos ao teste t de Student e os não-paramétricos ao teste de Mann-Whitney, ambos a 5% de probabilidade. As distintas letras minúsculas indicam diferenças significativas. ABA 12,5%, ABA 25% e ABA 50%, correspondem, respectivamente, aos grupos de animais expostos a 12,5% (18 µg a.i./L), 25% (36 µg a.i./L) e 50% (72 µg a.i./L) da CL₅₀ definida previamente. n = 25 girinos/grupo.....37

Figura 11- (A) Frequência de eritrócitos micronucleados, bem como (B) células eritrocíticas multilobuladas, (C) binucleadas e com (D) núcleo notched de girinos de *L. catesbeianus* expostos ou não a diferentes concentrações de abamectina. As barras indicam a média + desvio padrão dos dados originais, os quais foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn's, a 5% de probabilidade. As distintas letras minúsculas indicam diferenças significativas. ABA 12,5%, ABA 25% e ABA 50%, correspondem, respectivamente, aos grupos de animais expostos a 12,5% (18 µg a.i./L), 25% (36 µg a.i./L) e 50% (72 µg a.i./L) da CL₅₀ definida previamente. C: controle; CP: controle positivo (ciclofosfamida – 40 mg/L). n = 25 girinos/grupo38

Figura 12- (A) Frequência de células eritrocíticas com núcleo kidney-shaped, (B) blebbed e de (C) células apoptóticas de girinos de *Lithobates catesbeianus* expostos ou não a diferentes concentrações de abamectina, por um período de 12 dias. As barras indicam a média + desvio padrão dos dados originais, os quais foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com teste post hoc de Dunn's, a 5% de probabilidade. As distintas letras minúsculas indicam diferenças significativas. ABA 12,5%, ABA 25% e ABA 50%, correspondem, respectivamente, aos grupos de animais expostos a 12,5% (18 µg a.i./L), 25% (36 µg a.i./L) e 50% (72 µg a.i./L) da CL₅₀ definida

previamente. C: controle; CP: controle positivo (ciclofosfamida – 40 mg/L).n = 25
girinos/grupo.....39

RESUMO

A abamectina (ABA) é comercializada como pesticida e pode ser encontrada acidentalmente em ambientes aquáticos, podendo causar diversos efeitos negativos aos organismos que são expostos a sua composição química. Neste estudo avaliamos se a exposição a ABA em diferentes concentrações [12,5%, 25% e 50% da concentração letal mediana (CL₅₀), previamente estabelecida] pode provocar mudanças comportamentais e efeito mutagênico em girinos de *Lithobates catesbeianus*. Os testes comportamentais identificaram ausência de agregação, de mudanças no padrão natatório e ausência de resposta defensiva dos girinos expostos ao pesticida. Além disso, maiores concentrações do pesticida alteraram a morfologia e pigmentação do aparelho bucal e causou alterações nucleares nos eritrócitos. As alterações no comportamento anti-predatório podem ter sido causadas devido a mudança nos mecanismos de percepção e de resposta defensiva devido ao efeito nocivo da ABA. Mudanças na morfologia bucal podem provocar consequências negativas na atividade de forrageio e alimentação dos indivíduos. Além disso, o aumento de anormalidades nucleares nos eritrócitos confirma o potencial mutagênico da ABA em girinos de *L. catesbeianus*. Nosso estudo confirma a hipótese de que a presença da ABA nos ambientes aquáticos pode provocar impactos negativos sobre os girinos e, portanto, afetar as populações de anfíbios nos ecossistemas naturais.

Palavras-chave: Defensivos agrícolas, pesticida, *Lithobates catesbeianus*, ecotoxicologia.

ABSTRACT

Abamectin (ABA) is marketed as a pesticide and can be found accidentally in aquatic environments and may cause various negative effects on organisms that are exposed to their chemical composition. In this study, we evaluated whether exposure to ABA at different concentrations [12.5%, 25% and 50% of the previously established median lethal concentration (LC50)] may lead to behavioral changes and mutagenic effect in *L. catesbeianus* tadpoles. Behavioral tests identified absence of aggregation, changes in swimming pattern and absence of defensive response of tadpoles exposed to pesticide. In addition, higher concentrations of the pesticide altered the morphology and pigmentation of the oral apparatus and caused nuclear alterations in the erythrocytes. Changes in anti-predatory behavior may have been caused by changes in the mechanisms of perception and defensive response due to the deleterious effect of ABA. Changes in oral morphology can have negative consequences on forage activity and feeding of individuals. In addition, increased nuclear abnormalities in erythrocytes confirm the mutagenic potential of ABA in tadpoles of *L. catesbeianus*. Our study confirms the hypothesis that the presence of ABA in aquatic environments can have negative impacts on tadpoles and therefore affect amphibian populations in natural ecosystems.

Key-words: Agricultural defenses, pesticide, *Lithobates catesbeianus*, ecotoxicology.

1. INTRODUÇÃO

As avermectinas (AVMs) constituem um grupo de compostos químicos comercializados como pesticidas, produto veterinário e agente farmacêutico (Bai et al., 2016). Esses compostos são lactonas macrocíclicas derivadas da fermentação de *Streptomyces avermitilis* (Burg et al., 1979). A abamectina, ivermectina e doramectina – que compõem o grupo das AVMs – são eficazes contra um amplo espectro de parasitos comuns na agricultura e na medicina veterinária (Mesa et al., 2017), o que as torna uma das classes de parasiticidas mais utilizadas no mundo (Novelli et al., 2016).

No Brasil, a fim de revolucionar o mercado antiparasitário, foram introduzidas a ivermectina e a abamectina em 1981 e 1985, respectivamente (Rath et al., 2016). Após uma década do lançamento das AVMs no Brasil, segundo Rath et al. (2016), sua patente expirou, o que resultou no aparecimento de várias marcas de AVMs no mercado. Até dezembro de 2014 havia disponível no país mais de 130 formulações de AVMs registradas por diferentes laboratórios, sendo que mais de 30 empresas são responsáveis por disponibilizar mais de 50 medicamentos de uso veterinário contendo abamectina (Eddi & Caracostantogolo, 2012).

Dentre as AVMs destaca-se a abamectina (ABA), a qual tem sido comercializada amplamente como pesticida no setor agropecuário, sobretudo, em formulações comerciais, tais como Avomec[®], Agri-Mek[®], Avid[®], Dynamec[®], Kraft[®] e Zephyr[®] (Campbell, 2012; Yu et al., 2017). De acordo com a Agrofit (2009), a abamectina é registrada – número de registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA): 07703 – para controle de *Tetranychus urticae* na cultura do mamoeiro, sendo eficiente também contra insetos e nematoides, além de ação acaricida (Ware e Whitacre, 2004).

A ABA é composta de uma combinação química que contém cerca de 80% de avermectina B_{1a} e 20% de avermectina B_{1b}, as quais possuem propriedades biológicas e toxicológicas semelhantes (Bai & Ogbourne 2016; Moreira et al., 2017). Tal biopesticida pode atuar na inibição do ácido gama-aminobutírico (GABA), hiperpolarizando células nervosas e musculares dos organismos, bem como interferindo na transmissão neuromuscular (Cully et al., 1994; Novelli et al., 2012; Zortéa et al., 2017). Esse mecanismo foi mencionado pioneiramente por Paredes & Agmo (1992) que afirmam em seus estudos que a ABA atua em vertebrados inibindo os receptores de glutamato.

Embora a ABA não seja aplicada diretamente nos ecossistemas aquáticos, podemos considerar sua ocorrência acidental ou mesmo por escoamento de águas superficiais de áreas

agrícolas, o que pode acarretar efeitos adversos sobre a biota (Nowell et al., 2016). De acordo com Branco et al. (2003); Scoz et al. (2004); Carvalho et al. (2005) e Marion et al. (2012), no Brasil as doses de ABA recomendadas – formulação comercial Kraft® 36 EC – variam de 7,5 a 62,5 mL/L de água, tendo como alvo principal o ácaro vermelho (*Oligonychus ilicis*) e o ácaro branco (*Polyphagotarsonemus latus*), principais pragas que afetam a cultura do cafeeiro no Brasil (Neto et al., 2015).

Estudos prévios evidenciaram efeitos negativos da ABA sobre distintas espécies de zooplâncton (Novelli, 2012; Mesa et al., 2017), fitoplâncton (Vieira, 2010), peixes (Novelli et al., 2016; Thanomsit, 2016; Sanches et al., 2017), répteis (Mingo et al., 2017), aves (Weldemariam & Getachew, 2016) e mamíferos (Soloneski et al., 2017). Entretanto, ainda é muito incipiente o conhecimento sobre o impacto da ABA sobre os anfíbios, os quais são considerados organismos-chave nos ambientes aquáticos, cujo declínio populacional pode ter consequências danosas na estrutura e funcionamento dos ecossistemas (Schiesari et al., 2009; Vasconcelos et al. 2017; Chai et al., 2017). Apesar de alguns estudos, como os de Rohr et al. (2017), Wagner & Bruhl (2017), Rumschlag & Rohr (2017) e Pochini & Hoverman (2017) terem avaliado os efeitos de diferentes pesticidas sobre os anfíbios, o conhecimento sobre as consequências da ação de diferentes agrotóxicos envolvendo esses animais ainda é limitado, em comparação com outros grupos de organismos aquáticos, tais como algas (Altenburger et al., 1990; Knauer et al., 2017), invertebrados (Ashauer et al., 2007; Münze et al., 2017) e peixes (Brodeur et al., 2017).

Quanto aos estudos relacionados com a exposição de anfíbios à ABA, destaca-se apenas o estudo de Montalvão & Malafaia (2017), no qual os autores investigaram possíveis efeitos mutagênicos sobre girinos de *Lithobates catesbeianus* expostos a ABA diluída em água, aplicada via formulação comercial Kraft® 36 EC. Esses autores observaram que a frequência de micronúcleo foi influenciada pelo fator “tempo de exposição” enquanto o total de outras anormalidades nucleares foram influenciadas pelos diferentes tratamentos, confirmando a hipótese de que a exposição dos girinos ao biopesticida, ainda que por curto período de tempo (24, 48 e 72 h) e em baixas concentrações (36 µg a.i./L e 72 µg a.i./L), provocou aumento significativo de anormalidades nucleares em células eritrocitárias desses animais.

Assim, é necessário ampliar as investigações sobre os possíveis efeitos tóxicos deste biopesticida, para além daqueles relatados no estudo supramencionado. Questiona-se, por exemplo, se exposições mais prolongadas em relação àquela avaliada por Montalvão &

Malafaia (2017) seriam mais danosas aos girinos, sendo capazes de causar, além de alterações nucleares eritrocitárias, outros prejuízos biológicos nos animais, como alterações comportamentais e morfológicas.

Nesse sentido, objetivamos avaliar se a exposição a ABA pode causar alterações comportamentais e mutagênicas, bem como, se o pesticida pode gerar alterações morfológicas no aparelho bucal de girinos de *L. catesbeianus*. Partimos da hipótese de que mesmo em pequenas concentrações, águas contaminadas com ABA podem causar alterações biológicas importantes no modelo experimental escolhido. Na medida em que investigações como estas são desenvolvidas, têm-se a oportunidade de conhecer de forma mais abrangente a real magnitude do impacto deste pesticida sobre a biota.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais e delineamento experimental

No presente estudo foram utilizados girinos de *L. catesbeianus*, todos em estágio de desenvolvimento, 25G de acordo com Gosner, 1960, considerada uma espécie altamente tolerante a doenças e infecções (Miaud et al., 2016). Os girinos desta espécie tem se revelado bons sentinelas das modificações ambientais, respondendo de maneira precoce e satisfatória às alterações negativas ocorridas no ambiente através de mecanismos de defesa sensíveis, ao mesmo tempo em que resistem às diversas situações em que são expostas no processo de experimentação animal (Bueno-Guimarães et al., 2001), se tornando então, um bom modelo experimental para estudos toxicológicos (Freitas et al. 2016, Rissoli et al., 2016, Wirz et al., 2005).

Mesmo se tratando de uma espécie exótica, a espécie *L. catesbeianus* é facilmente encontrada no Brasil, por se tratar de uma espécie comercial. Diferentes ranculturas têm garantido a demanda experimental de *L. catesbeianus* - permitindo seu uso em todas as fases de desenvolvimento e em todas as épocas do ano – nas várias áreas de pesquisas científicas (Bueno-Guimarães et al., 2001). Assim, os animais utilizados neste estudo foram adquiridos em um criadouro comercial (Gameleira de Goiás, GO, Brasil) e todas as etapas experimentais foram conduzidas em laboratório com temperatura controlada ($24 \pm 2^\circ \text{C}$) e fotoperíodo natural.

Antes do início do experimento os animais foram previamente aclimatados¹ às condições de laboratório por 96 h, de acordo com Pisteková et al. (2005) e Vasconcelos et. al.

¹O período de aclimação é um processo teste em que se observa a capacidade de uma determinada espécie em desenvolver características fenotípicas e plásticas de forma que possa garantir sua sobrevivência em uma nova condição ambiental não vivenciada anteriormente (Angilletta, 2009). A avaliação da aclimação de organismos

(2016). Em seguida, os girinos foram distribuídos nos seguintes grupos experimentais (n=25, em cada grupo), com biomassa corpórea contrabalanceada: i) grupo controle, composto de girinos mantidos em caixas com apenas água decolorada; e grupos ii) ABA 12,5%, iii) ABA 25% e iv) ABA 50%, os quais correspondem, respectivamente a 12%, 25% e 50% da concentração letal média (CL₅₀) determinada previamente para girinos de *L. catesbeianus* (Vasconcelos et al. 2016). Na ocasião, Vasconcelos et al. (2016) realizaram testes laboratoriais agudos e crônicos para avaliar a toxicidade da ABA (formulação comercial Vertimec 18EC) aos girinos de *L. catesbeianus*. Os autores avaliaram a mortalidade, o desenvolvimento e o comportamento dos girinos expostos a diferentes concentrações – 36, 72, 144, 216, 288 µg a.i./L - de ABA, durante 96 h e 24 dias de exposição.

Em nossos estudos, a ABA foi aplicada nas águas de exposição a partir da formulação comercial Kraft® 36EC e para confirmar as concentrações nominais do pesticida, amostras coletadas ao longo do experimento foram analisadas por HPLC/MS/MS. As análises revelaram que as concentrações pretendidas foram 98,7% ± 2,7 (média ± desvio padrão; n =7) das concentrações nominais. Logo, as concentrações do pesticida nos grupos ABA 12,5%, ABA 25% e ABA 50% corresponderam a 18 µg a.i./L; 36 µg a.i./L e 72 µg a.i./L, respectivamente.

Os girinos foram mantidos em caixas de polietileno (nas dimensões: 18 cm de altura x 34 cm de largura x 41 cm de comprimento) com capacidade volumétrica de 15 L. Cada caixa foi preenchida com 10 L de água descolorada, respeitando a densidade de 1 girino/2 L. Não foram adicionados nenhum tipo de substrato no fundo das caixas, conforme Costa & Nomura (2014), e compressores mantiveram a água oxigenada constantemente durante todo período experimental.

Durante o experimento a água das caixas foram renovadas a cada dois dias em 50% do seu volume total, por sifonamento de fundo, retirando-se as fezes e os restos alimentares dos animais. Seguindo o método utilizado por Bryan et al. (1988), a água que era repostada nas caixas, continha a mesma concentração nominal de xenobiótico referente à cada grupo experimental. Os girinos foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial para peixes carnívoros, contendo os seguintes níveis de garantia: 45% (mín.) proteína bruta (PB), 14% (mín.) extrato etéreo (EE), 5% (mín.) fibra bruta (FB), 14% (máx.) matéria mineral (MM); e 87% (mín.) matéria seca (MS). Os parâmetros físico-químicos da água das caixas dos grupos experimentais

às variáveis ambientais, tais como temperatura (Schiffer et al., 2013), salinidade (Bossus et al., 2015), pH (Fantazzini et al., 2015) e luminosidade (Casati et al., 2011), são essenciais para o sucesso de uma espécie no novo ambiente em que se encontram.

foram monitorados diariamente (por meio de um multiparâmetro portátil), não tendo sido observadas diferenças entre os tratamentos (Tabela 1).

O período experimental total foi de 12 dias, o que pode equivaler a aproximadamente 16% a 13,3% da vida exclusivamente aquática da espécie², uma vez que a completa metamorfose dos girinos de *L. catesbeianus* pode variar de 75 a 90 dias, dependendo das condições climáticas, incluindo luminosidade, temperatura da água, qualidade da alimentação, dentre outros fatores (Cribb et al., 2013). No 11º e 12º dia experimental, os girinos foram expostos sequencialmente a diferentes testes comportamentais. Em seguida, os animais foram eutanasiados (com excesso de lidocaína 50 mg/g) para avaliação morfológica e de possíveis anormalidades nucleares eritrocitárias e após a eutanásia os girinos foram conservados em formalina a 10%. Os espécimes utilizados nos experimentos estão depositados no Laboratório de Pesquisas Biológicas do Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí-GO.

Todos os testes comportamentais e análise das variáveis investigadas foram realizados no Laboratório de Pesquisas Biológicas do Departamento de Ciências Biológicas do Instituto Federal Goiano - Campus Urutaí (GO, Brasil). A Figura 1 ilustra o cronograma temporal das avaliações realizadas e a seguir, elas são detalhadas.

²Conforme descrito por Cribb et al. (2013), a fase aquática de *L. catesbeianus* inicia-se pela embrionagem. Assim que ocorre a eclosão dos ovos, tem-se a fase larval “G1” que, entre as principais características desta fase destaca-se a presença de brânquias externas. Após um período de 5 a 7 dias as brânquias se interiorizam, iniciando a fase “G2”, que tem como principal característica a frequente procura, dos girinos, por alimentos no ambiente aquático. Ao surgir os primeiros vestígios das patas traseiras, os girinos encontram-se na fase “G3” que finaliza com o surgimento das patas dianteiras, entrando na “G4” ou clímax metamórfico. Esta última fase dura até que a cauda esteja totalmente absorvida e, então, os anfíbios passam a ser denominados de imago (Cribb et al. 2013). Tais fases são diferentes dos estágios de desenvolvimento embrionários propostos pela classificação de Gosner (1960).

Tabela 1. Análises físico-químicas das águas de exposição de girinos de *L. catesbeianus* expostos ou não à diferentes concentrações de abamectina.

Atributos	Controle	ABA 12,5%	ABA 25%	ABA 50%
Temperatura (°C)	23, ^a ± 1,14	23,0 ^a ± 1,58	23,1 ^a ± 1,55	22,9 ^a ± 1,50
Pressão atmosférica (atm)	0,91 ^a ± 0,0001	0,92 ^a ± 0,01	0,92 ^a ± 0,04	0,94 ^a ± 0,04
Resistividade elétrica (Ωm)	0,01 ^a ± 0,0001	0,01 ^a ± 0,0007	0,01 ^a ± 0,003	0,01 ^a ± 0,003
Condutividade elétrica (µS/cm ²)	96,2 ^a ± 1,83	95,8 ^a ± 1,72	96,1 ^a ± 2,31	95,8 ^a ± 2,78
Sólidos totais dissolvidos (mg/L)	48,2 ^a ± 0,83	47,6 ^a ± 1,67	47,0 ^a ± 2,54	46,8 ^a ± 2,48
Salinidade	0,04 ^a ± 0,004	0,04 ^a ± 0,014	0,04 ^a ± 0,012	0,04 ^a ± 0,024
Potencial de Redução da Oxidação (ORP)	130,21 ^a ± 6,17	130,73 ^a ± 6,46	130,4 ^a ± 6,25	130,1 ^a ± 6,20
Oxigênio dissolvido (mg/L)	7,72 ^a ± 0,78	7,92 ^a ± 0,41	7,76 ^a ± 0,16	7,84 ^a ± 0,12
pH	7,2 ^a ± 0,38	7,3 ^a ± 0,47	7,2 ^a ± 0,54	7,4 ^a ± 0,42

As linhas apresentam a média ± desvio padrão dos dados referentes às análises realizadas nas águas de exposição de girinos de *Lithobates catesbeianus* expostos ou não à diferentes concentrações de abamectina. Os dados foram submetidos à one-way ANOVA, a 5% de probabilidade. Letras iguais nas linhas indicam a inexistência de diferenças estatisticamente significativa entre os grupos experimentais.

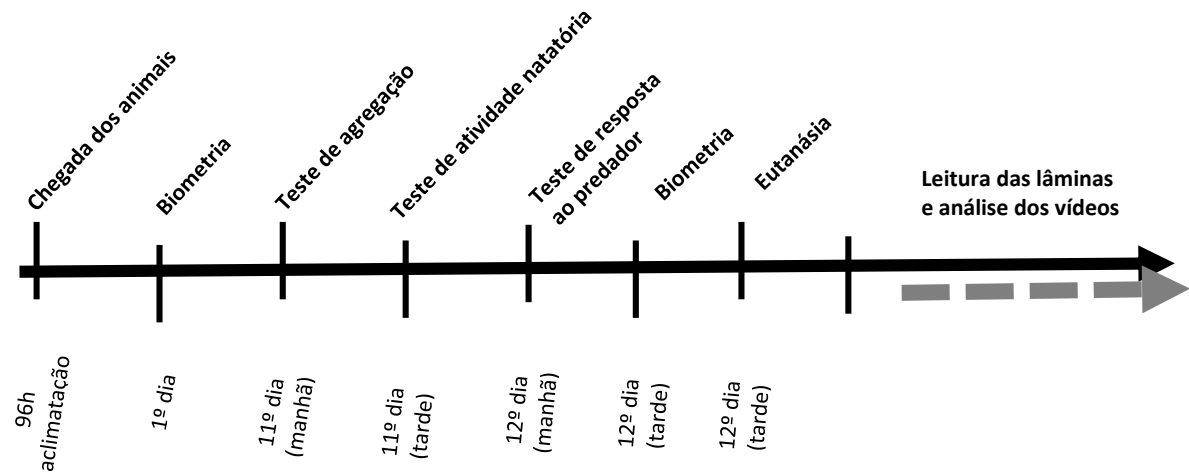


Figura 1. Distribuição temporal do experimento e análise realizada.

2.2. Testes comportamentais

2.2.1. Teste de agregação

No 11º dia experimental foi realizado o teste de agregação, tal teste tem sido utilizado para avaliar a capacidade dos girinos de reconhecer pistas químicas e visuais emitidas por coespecíficos familiares ou não familiares e aparentados ou não aparentados. Em nosso estudo foi analisado se substâncias químicas afetam essa capacidade de reconhecimento por meios das pistas químicas (Cornell et al., 1989; Fishwild et al., 1990; Saidapur & Girish, 2000; Gramapurohit et al., 2006; Casillas-Barragán et al., 2016).

Para realização do teste, utilizamos bandejas plásticas (nas dimensões: 28 cm de comprimento x 17,5 cm de largura x 11,5 cm de altura), contendo 2 L de água declorada para o grupo controle e as devidas concentrações de ABA referente à cada grupo, para os grupos contaminantes. As bandejas foram divididas em três repartições: região central (de soltura do girino teste) e duas extremidades, as quais poderiam estar vazias ou alocadas com 20 girinos coespecíficos não familiares e não aparentados, de acordo com cada sessão do teste (Figura 2A). O material que separava as repartições era uma malha fina (do tipo “sombrite”) disposta a 5 cm de cada extremidade (borda) da bandeja, a qual impedia o contato físico entre os girinos coespecíficos; porém, permitia o contato visual, auditivo e a passagem de estímulos químicos (Figura 2A).

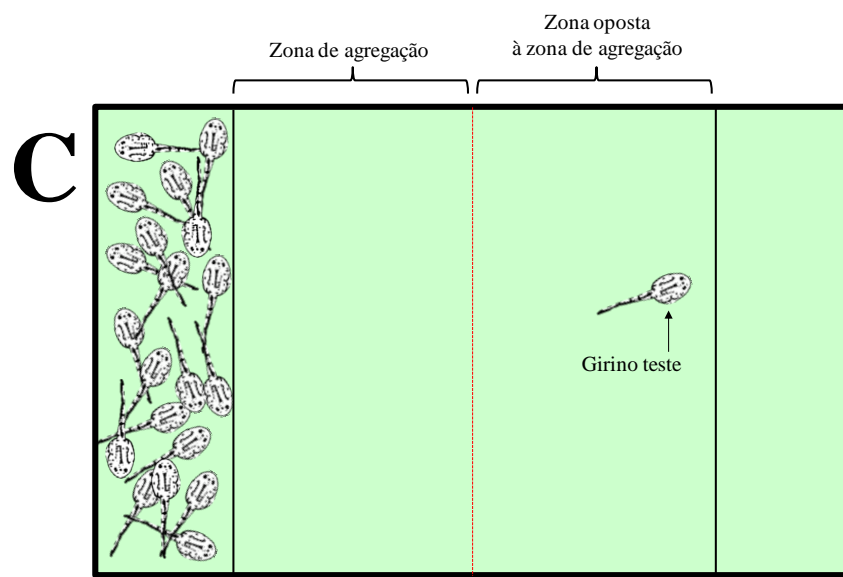
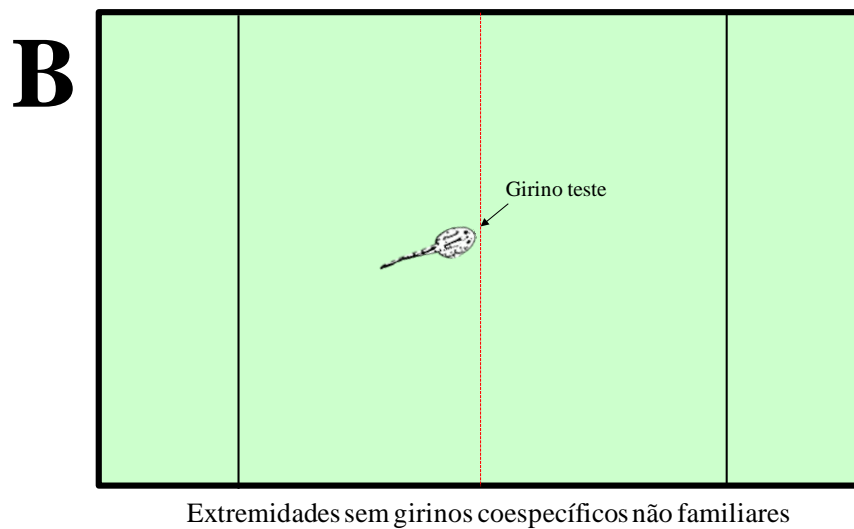
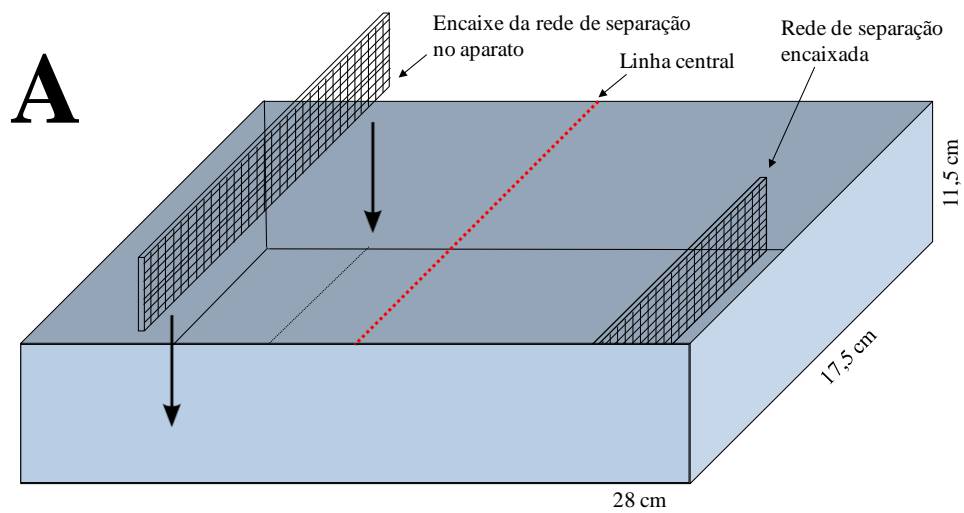


Figura 2. Vista geral do aparato utilizado no teste de agregação (A) e vista superior do aparato durante a primeira (B) e segunda sessão do teste (C). As cores são meramente ilustrativas.

Antes do início do teste cada grupo de girinos foi alojado por 10 min na sala de testes, visando a aclimação dos animais (Griffiths & Denton 1992). Tal sala possui isolamento acústico, iluminação artificial, temperatura controlada ($24 \pm 2^\circ \text{C}$) e câmeras de vídeo infravermelho acopladas a um computador localizado externamente.

O teste foi dividido em duas sessões. Na primeira sessão, cada girino foi colocado individualmente no centro do aparato na ausência de qualquer coespecífico e filmado por 5 min. Na segunda sessão, o girino teste foi retirado do aparato e, simultaneamente, 20 girinos coespecíficos não familiares e não aparentados (de mesmo estágio de desenvolvimento) foram colocados em uma das extremidades. Em seguida, o girino teste foi recolocado no centro do aparato e filmado por mais 5 min. Entre uma sessão e outra a água era trocada e os girinos coespecíficos utilizados também eram trocados. Além disso, a extremidade onde os girinos coespecíficos foram colocados era alternada entre uma sessão e outra, afim de evitar que uma possível preferência por algum dos lados da bandeja alterasse os resultados. Após as filmagens os seguintes parâmetros foram analisados: total de cruzamentos (ou seja, número de vezes em que o girino teste passou pela linha central do campo de análise) e tempo de permanência na zona de agregação, nas sessões sem e com estímulo dos coespecíficos.

2.2.2. Teste de atividade natatória

O teste de atividade natatória – realizado logo após o teste de agregação, no 11º dia experimental –, consistiu em avaliar a atividade natatória dos girinos, portanto, utilizamos um béquer contendo água, conforme procedimentos adotados por David et al. (2012). Para isso, cada girino foi avaliado individualmente em um béquer de capacidade volumétrica de 5 L, contendo 1 L de água desclorada para o grupo controle e as diferentes concentrações de ABA presentes nas águas de manutenção dos girinos para os grupos contaminantes. Cada animal permaneceu por 5 min no béquer para aclimação e, após isso, a água foi suavemente agitada por um bastão de vidro, durante 5 s, o que foi suficiente para formar um redemoinho (Figura 3A-B).

A atividade natatória foi avaliada por 60 s, tendo sido classificada em diferentes categorias. A categoria “nado normal” era registrada quando os animais nadavam normalmente e ativamente contra a corrente de água criada. Já o “nado anormal” era registrado quando os girinos nadavam sem muito esforço contra a corrente de água, deixando-se levar por ela por um tempo superior ao do nado. Além disso, essa categoria natatória também era registrada quando os girinos nadavam com o corpo na lateral do béquer ou fora do padrão normal (em serpentina).

Já a categoria “imobilidade”, era registrada quando havia paralisia completa da natação, sendo que os animais se deixavam levar por completo contra a corrente de água criada. Essas categorias natatórias foram definidas com base nos estudos de Sarikaya & Yilmaz (2003) e David et al. (2012).

2.2.3. Teste de resposta ao predador

O teste de resposta ao predador foi realizado no 12º dia experimental. Tal teste teve como objetivo avaliar se a ABA foi capaz de afetar a capacidade dos girinos responderem a um estímulo predatório diluído na água onde os animais se encontravam. Para isso, o teste foi realizado na própria caixa de manutenção dos girinos, sendo que os animais permaneceram aclimatando por 20 min na sala de testes.

Como estímulo predatório foi utilizada água de recipiente (solução de predador) onde foram mantidas larvas de Odonata, família Libellulidae, as quais são predadoras dominantes em ecossistemas aquáticos naturais (Rohr & Crumrine, 2005) e seus estímulos químicos são reconhecidos como predadores por anuros (Ehram et al., 2016). Para o preparo da solução de predador foram coletadas 12 larvas de Odonata de uma lagoa temporária localizada nos arredores do Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí (Urutaí, GO, Brasil). As larvas foram mantidas em uma caixa com capacidade volumétrica de 15 L de água, preenchida com 10 L de água desclorada, substrato de cascalho, com aeração constante, por 48 h. Durante este período as larvas foram alimentadas com girinos de *L. catesbeianus*. A temperatura e o fotoperíodo foram controlados em 24 ± 2 °C e 12 h claro/12 h escuro, respectivamente.

O teste de resposta ao predador foi realizado em duas sessões distintas. A primeira sessão consistiu em adicionar à caixa dos girinos 15 mL de água desclorada, conforme Ehram et al. (2016). Metade do volume total foi adicionada em um dos lados da caixa de manutenção dos girinos e a outra no lado oposto (Figura 5A). Em seguida, os girinos foram filmados por 10 min por uma câmera posicionada a 90 cm acima da caixa. Em seguida, adicionou à caixa dos animais 15 mL de solução de predação (conforme realizado previamente por Do Amaral et al. (2018)) e os animais foram filmados por mais 10 min (segunda sessão do teste) (Figura 3B). Ao final, foi avaliada a atividade locomotora dos girinos (na sessão sem e com estímulo predatório), por meio do total de cruzamentos dos quadrantes de 5 cm² traçados na parte superior da caixa.

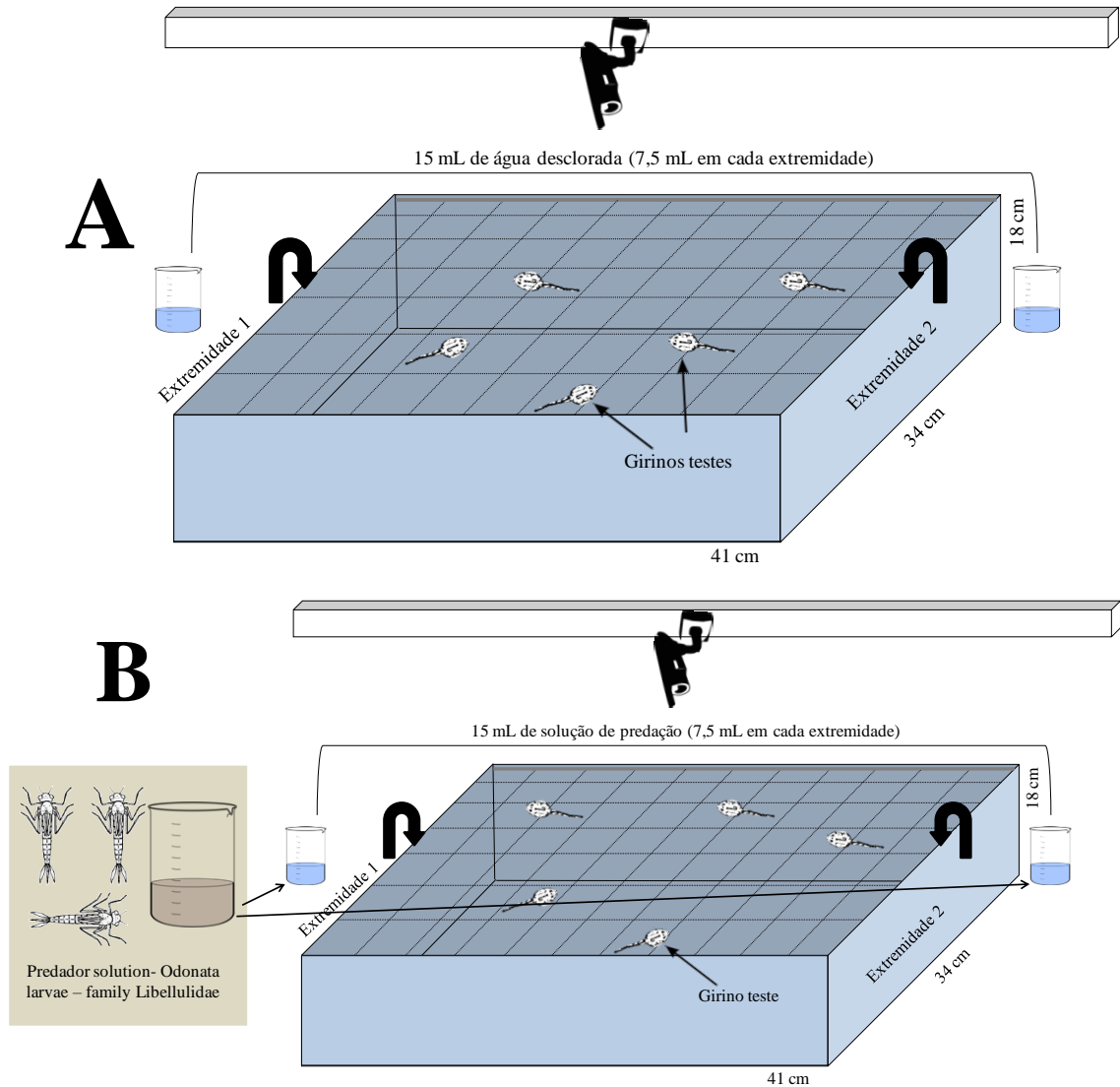


Figura 3. Desenho esquemático das diferentes sessões do teste de resposta ao predador. (A) Primeira sessão do teste em que não foi utilizado estímulo predatório e (B) segunda sessão, em que o estímulo predatório foi adicionado na caixa onde se encontravam os girinos. As cores e figuras são meramente ilustrativas.

2.3. Teste do micronúcleo

Para avaliar possível efeito mutagênico dos tratamentos sobre as células eritrocitárias dos animais, foi acrescentado ao delineamento experimental um grupo controle positivo (n=25), composto de girinos mantidos em caixas com água desclorada que continha ciclofosfamida, uma droga de ação mutagênica conhecida, (40 mg.L^{-1} , Genuxal®; Baxter Healthcare S/A, São Paulo, Brasil), conforme utilizada por Lajmanovich et al. (2013). Foram coletados de cada girino $25 \text{ }\mu\text{L}$ de sangue, por meio de pressão da veia caudal, para o preparo de esfregaço sanguíneo. Para cada animal foram preparadas duas lâminas, as quais foram fixadas com metanol a 100% (v/v) durante 5 min, coradas em Panótico Rápido® (New Prov), tendo sido analisadas utilizando-se lente em imersão, conforme procedimentos metodológicos adotados

por Do Amaral et al., (2018). Foram contadas 4000 células eritrocitárias de cada indivíduo, sendo considerados somente aquelas que não estavam sobrepostas umas às outras e com membrana celular e nuclear intactas.

As lâminas foram analisadas às cegas e de forma aleatória por um único observador. A frequência de micronúcleo (MN) (Figura 4) foi determinada de acordo com os critérios previamente relatados por Bosch et al. (2011). A frequência de MN foi expressa como o número de eritrócitos micronucleados analisados (MNE)/4000 células. Além disso, a presença de outras anomalias nucleares foi registrada de acordo com os critérios de Fenech (2000). Nesse caso, a frequência das seguintes alterações nucleares foi registrada: núcleo reniforme, núcleo blebbed, núcleo entalhado, núcleo multilobulado, eritrócito binucleado e células apoptóticas (Figura 4).

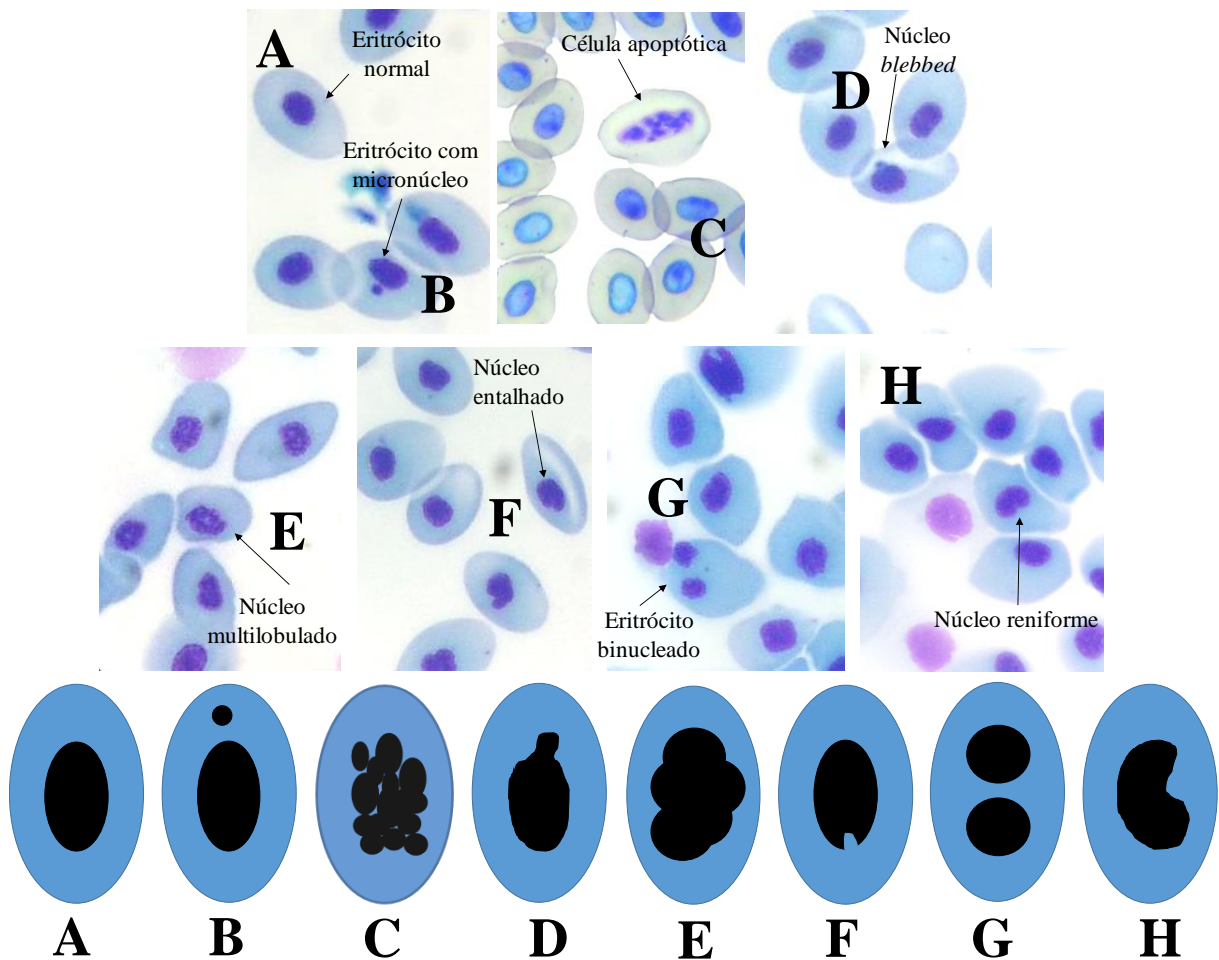


Figura 4. Variação morfológica dos eritrócitos circulantes avaliados em girinos de *Lithobates catesbeianus* expostos ou não à diferentes concentrações de abamectina. (A) eritrócito normal; (B) eritrócito micronucleado; (C) célula apoptótica; (D) núcleo *blebbed*; (E) núcleo multinucleado; (F) núcleo entalhado; (G) eritrócito binucleado; (H) núcleo reniforme.

2.4. Biometria

Tanto no início, quanto ao final do experimento, os girinos tiveram suas biomassas corpóreas aferidas, seu comprimento boca-cloaca medido, além de realizarmos a avaliação dos seus discos orais³. Para isso, cada girino foi avaliado em microscópio estereoscópico de acordo com os procedimentos metodológicos utilizados por Babini et al. (2015), com algumas modificações. Para a avaliação dos discos orais dos girinos foi atribuída para cada condição observada um escore específico. Os animais que apresentavam bainha mandibular superior e inferior intactas recebiam escore 10; aqueles que apresentavam apenas uma das bainhas mandibulares com alguma alteração recebiam escore 5, e aqueles em que não eram identificadas bainhas mandibulares recebiam escore 0. A atribuição de escores também foi utilizada na avaliação da pigmentação das bainhas mandibulares dos girinos. Nesse caso, os animais que apresentavam bainhas em coloração escura [correspondente a um padrão natural, conforme Altig (1970)] recebiam escore 10, enquanto aqueles que apresentavam despigmentação de uma das bainhas recebiam escore 5. Já aos girinos sem pigmentação mandibular era atribuído um escore 0.

Por fim, avaliamos a condição da dentição dos girinos, sendo que o escore 10 era atribuído àqueles animais que apresentavam fileiras de dentes intactas, sendo a superior composta por duas linhas completas e a inferior composta por três linhas completas. Por outro lado, quando uma das fileiras de dentes apresentava-se incompleta ou alterada, os girinos recebiam escore 5. Já àqueles animais sem fileiras de dentes ou que apresentavam as duas fileiras (superiores e inferiores) alteradas e/ou incompletas, recebiam escore 0.

2.5. Análises estatísticas

Inicialmente todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk, que foi seguido pelo teste de variância de homogeneidade de Levene. Os dados referentes ao teste de atividade natatória, às avaliações morfológicas e citotóxicas foram submetidos à *one-way* ANOVA, com teste post hoc de Tukey, a 5% de probabilidade, nos casos de F

³Estudos prévios indicam que contaminantes podem causar alterações em suas estruturas mandibulares, assim como em sua dentição (Pérez-Iglesias et al. 2015; Pérez-Iglesias et al. 2017). Os discos orais dos girinos são estruturas complexas que desempenham um papel importante na alimentação (Babini et al., 2015). Os dentes labiais funcionam como ancora, fixando o disco oral no substrato para a retirada de alimento (Veneky et al., 2010a). A ausência de dentes labiais reduz a eficácia da forragem de girinos (Matthew et al., 2010) e afeta negativamente a cinemática de alimentação (Veneky et al., 2010b), sendo assim, os girinos afetados se alimentam com mais frequência que os girinos com discos orais normais, gastando mais recursos energéticos na aquisição de alimentos, reduzindo os recursos energéticos para crescimento e metamorfose (Babini et al., 2015).

significativos. Os dados que não apresentaram distribuição normal foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com teste post hoc de Dunn's, a 5% de probabilidade.

Os dados referentes ao teste de agregação, de resposta ao predador, biomassa dos girinos e ao comprimento foram submetidos à *two-way* ANOVA, de acordo com o projeto fatorial (2 x 4) utilizando os fatores “tratamento” (quatro níveis: controle e tratamentos ABA 12,5%, ABA 25% e ABA 50%) e “estímulo” (dois níveis: presença ou ausência de girinos coespecíficos (no caso do teste de agregação); presença ou ausência de estímulo predatório (no caso do teste de resposta ao predador) ou “tempo” (dois níveis: início ou fim do experimento (no caso dos dados relativos à biomassa dos girinos)]. Nos casos de F significativo, foi aplicado o teste post hoc de Tukey a 5% de probabilidade. Ressalta-se que os dados não paramétricos foram transformados em $\log(x)$ para somente, *a posteriori*, serem submetidos à *two-way* ANOVA. Ressalta-se que todos os gráficos e as análises estatísticas foram realizadas no *software* GraphPad Prism (versão 6.0).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o intuito de avaliar possível efeito dos tratamentos sobre alguns parâmetros biométricos, inicialmente investigamos se a biomassa corpórea e o comprimento dos animais foram alterados. Nossas análises revelaram efeito significativo do fator “tempo” para ambos os parâmetros. Os animais de todos os grupos apresentaram incremento de suas biomassas e comprimento corporal ao final do experimento, quando comparadas às suas medidas iniciais (Figura 5A-B, respectivamente). Diante disso, esses dados sugerem que a exposição à ABA (em qualquer das concentrações) não causou toxicidade sistêmica nos girinos ou, que as variáveis aqui avaliadas, não foram alteradas pela intoxicação sistêmica, caso ela tenha ocorrido.

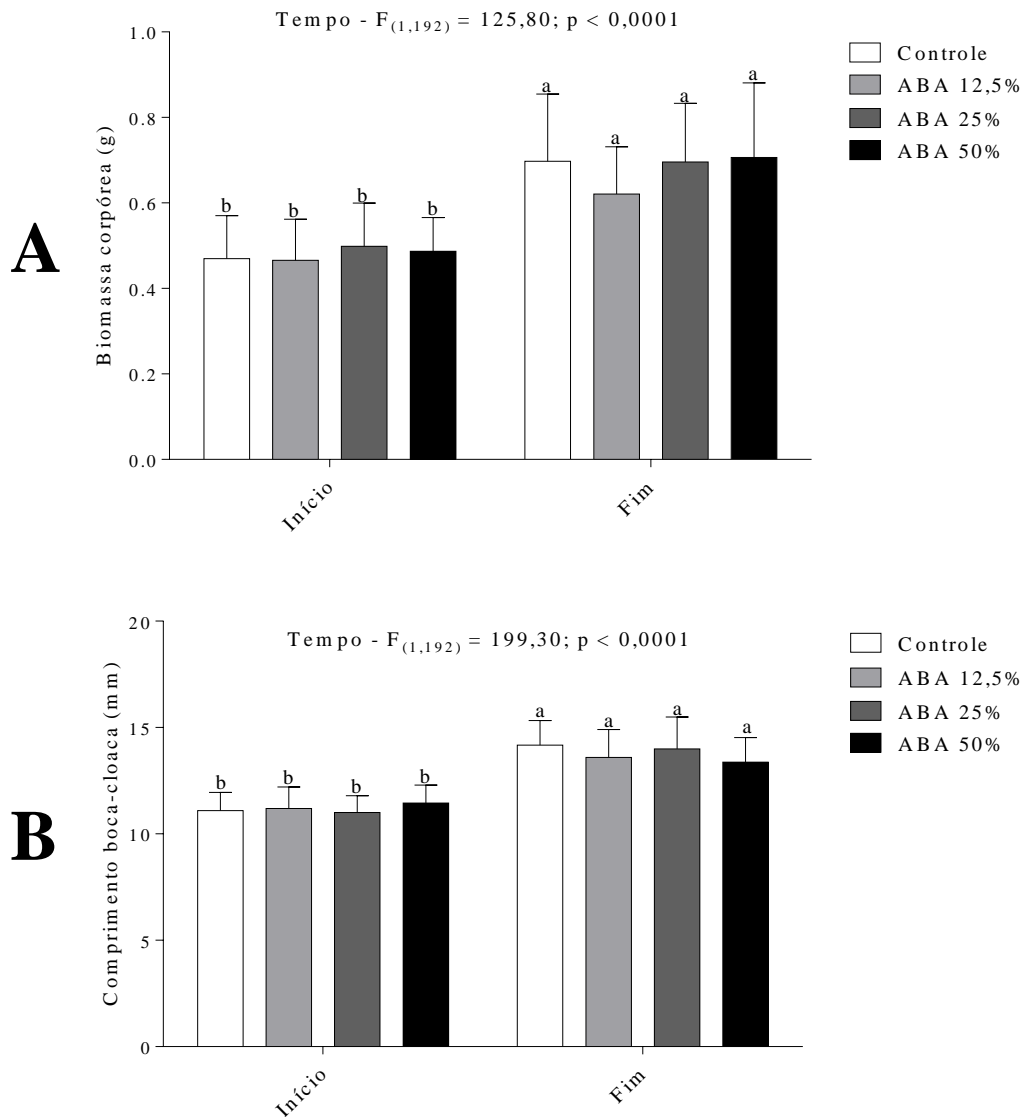


Figura 5. (A) Biomassa corpórea e (B) comprimento boca-cloaca de girinos de *Lithobates catesbeianus* expostos ou não à diferentes concentrações de abamectina. As barras indicam a média + desvio padrão dos dados, os quais foram submetidos à two-way ANOVA. Neste caso, as múltiplas comparações foram realizadas pelo teste post hoc de Tukey, a 5% de probabilidade. As distintas letras minúsculas indicam diferenças significativas. ABA 12,5%, ABA 25% e ABA 50%, correspondem, respectivamente, aos grupos de animais expostos a 12,5% (18 $\mu\text{g a.i./L}$), 25% (36 $\mu\text{g a.i./L}$) e 50% (72 $\mu\text{g a.i./L}$) da CL_{50} definida previamente. $n = 25$ girinos/grupo.

Em relação às avaliações comportamentais, os animais foram primeiramente submetidos ao teste de agregação. Nós observamos que a frequência com que os animais cruzaram a linha central do aparato não diferiu entre os grupos experimentais (Figura 6A), o que sugere que os tratamentos não afetaram a capacidade locomotora dos girinos no referido teste. É importante destacar que as alterações na atividade natatória desses animais podem interferir na fuga de predadores e que variações nesta atividade podem estar diretamente

relacionadas com a deformação morfológica da cauda dos animais (Van Buskirk & McCollum, 2000). Hänzi & Straka (2017) afirmaram que caudas maiores podem auxiliar positivamente no desempenho da natação, enquanto caudas relativamente inferiores ao tamanho padrão, podem interferir até mesmo na preservação da espécie. Neste caso, os animais expostos ao pesticida apresentaram por mais tempo e maior frequência atividade natatória anormal (Figura 6B-C), sem que essas alterações tenham sido suficientes para interferir na capacidade locomotora dos animais.

Contudo, os animais dos grupos controle e ABA 12,5% demonstraram preferência pelo compartimento sem estímulo, tendo permanecido menos tempo na zona de agregação quando os girinos coespecíficos foram introduzidos no aparato (Figura 6D), o que não foi observado nos demais grupos. Ainda que estes animais tenham demonstrado preferência espacial, na sessão de habituação do teste (Figura 10A-B, vide “Material e Suplementar”), o tempo de permanência desses girinos foi menor na zona de agregação, quando da presença de seus coespecíficos. Já a distribuição dos girinos expostos às maiores concentrações de ABA foi aleatória tanto na sessão de habituação (Figura 10C-D, em “Material Suplementar”), quanto na sessão teste (Figura 6D), o que demonstra o efeito do pesticida sobre o comportamento de agregação desses animais.

Em estudo anterior, Blaustein & O’Hara (1987), ao utilizarem um aparato semelhante ao nosso, realizaram dois experimentos afim de avaliarem comportamento de agregação de girinos de *Rana cascadae*. No primeiro experimento os autores utilizaram girinos testes capturados em uma lagoa e para o estímulo foram utilizados girinos coespecíficos não-familiares e não aparentados, capturados da mesma lagoa. No segundo experimento, foram utilizados girinos criados em laboratório que não haviam contato com coespecíficos não-familiares e não aparentados. Em seus resultados, os autores observaram uma tendência desses animais de permanecerem mais tempo próximos a seus coespecíficos aparentados (irmãos) do que no compartimento sem a presença de seus coespecíficos. Por outro lado, esta tendência não foi observada quando os coespecíficos de *R. cascadae* não possuíam parentesco com os girinos testes, resultado semelhante ao que observamos nos girinos dos grupos controle e ABA 12,5% (Figura 9A-B).

Sabe-se que o reconhecimento de parentesco em girinos de anuros, conforme discutido por Blaustein & Waldman (1992), é mediado, essencialmente, pelo reconhecimento de pistas químicas – liberadas pelos seus coespecíficos – e visuais. Enquanto as pistas visuais seriam importantes para os indivíduos identificarem seus coespecíficos, as pistas químicas seriam

essencialmente utilizadas para o reconhecimento do parentesco (Blaustein & O'Hara, 1987). Além disso, é importante ressaltar que o comportamento de agregação em girinos pode ser estimulado por pistas de alarme (e.g.: predadores em potencial), conforme demonstrado por Spieler (2003) e Bateman & Fleming (2015), o que não ocorreu em nosso estudo, uma vez que não utilizamos pistas predatórias na avaliação do comportamento de agregação dos animais.

Logo, podemos supor que os girinos dos grupos controle e ABA 12,5% podem ter preferido permanecer mais tempo na zona oposta à de agregação devido a uma potencial ameaça de competição intraespecífica que poderia ser estabelecida com seus coespecíficos não-familiares e não aparentados. Nesse caso, podemos inferir que a estrutura multicanal que separava os girinos testes dos seus coespecíficos foi suficiente para promover a percepção visual, acústica e/ou química dos animais avaliados.

Por outro lado, nossos dados confirmam achados anteriores que demonstram que o reconhecimento de pistas químicas por girinos pode ser fortemente influenciado por fatores ambientais, como qualidade e temperatura da água (Polo-Cavia et al., 2016). Os autores demonstraram que girinos de *Pelobates cultripes* em águas contaminadas – mesmo em concentrações subletais – podem ter seu comportamento alterado, pois a qualidade da água pode influenciar na habilidade das larvas de reconhecerem os predadores, aumentando assim o risco de predação.

Em nosso estudo observamos que, apesar da qualidade físico-química e química da água das caixas dos diferentes grupos não ter diferido entre os tratamentos (Tabela 1 – em “Material e métodos”), podemos supor que a ABA, por mecanismos ainda desconhecidos, possa ter influenciado os constituintes químicos das pistas emitidas pelos coespecíficos, reduzindo sua percepção pelos girinos testes. Além disso, sugerimos que o pesticida tenha interferido nos mecanismos de recepção odorífera dos animais ou ainda, nas redes neurais de transmissão das informações olfatórias recebidas e o processamento/exibição do comportamento dos animais. Essa hipótese é corroborada por outros estudos que demonstram que o mecanismo principal de ação da ABA envolve necessariamente interferências de neurotransmissores de papel chave na exibição de categorias comportamentais de organismos não-alvo [vide revisão de Lumaret et al. (2012)].

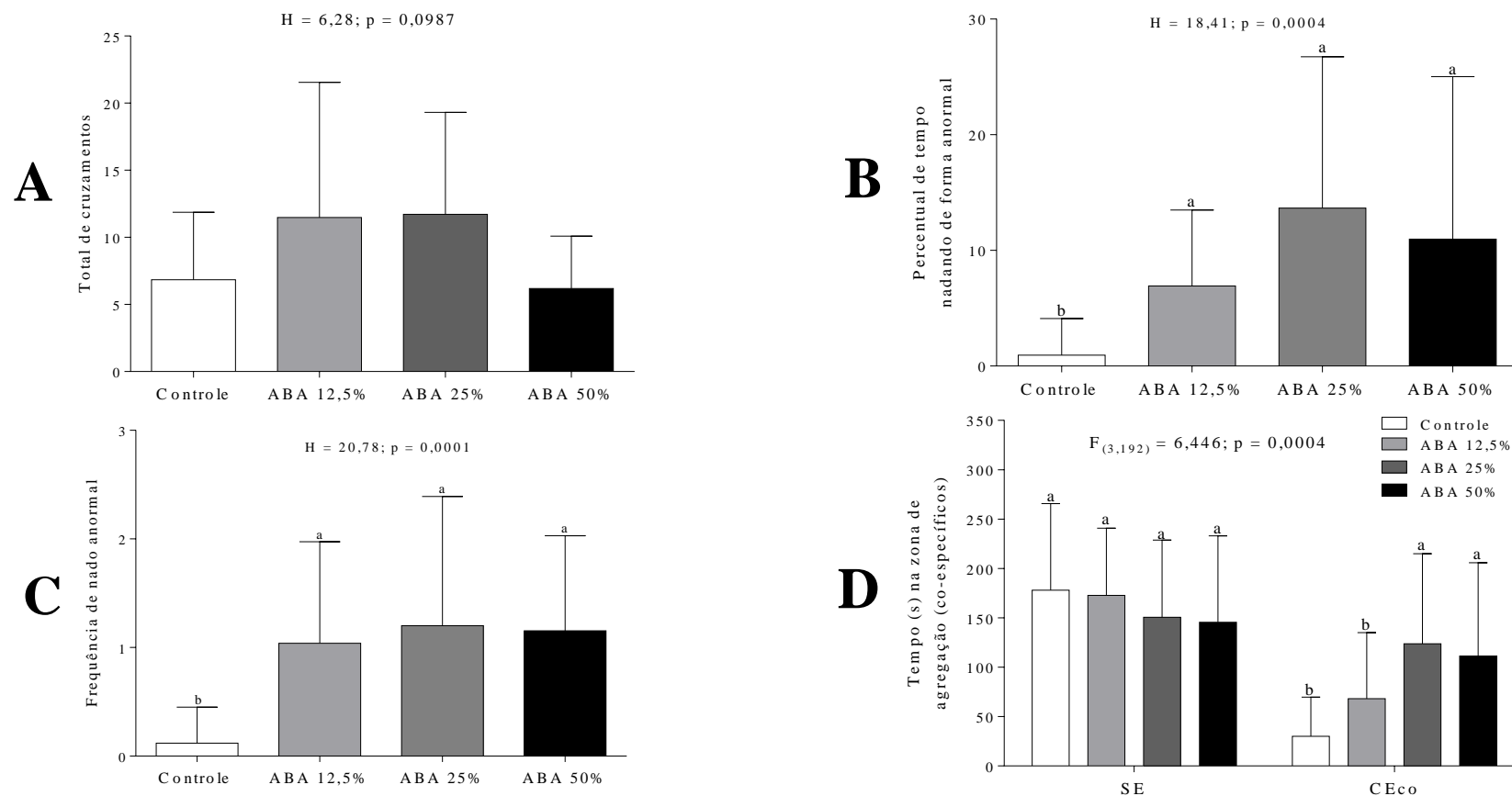


Figura 6. (A) Total de cruzamentos da linha central do aparato do teste de agregação, (B) percentual de tempo e (C) frequência com que os girinos permaneceram nadando de forma anormal no teste de atividade natatória e (D) tempo de permanência na zona próxima aos coespecíficos (não familiares e não aparentados) de girinos de *Lithobates catesbeianus* expostos ou não à diferentes concentrações de abamectina. As barras indicam a média + desvio padrão dos dados originais. Em “A-C”, os dados foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn’s, a 5% de probabilidade. Em “D”, os dados foram transformados em $\log(x)$ e posteriormente submetidos à two-way ANOVA. As múltiplas comparações foram realizadas pelo teste post hoc de Tukey, a 5% de probabilidade. As distintas letras minúsculas indicam diferenças significativas. ABA 12,5%, ABA 25% e ABA 50%, correspondem, respectivamente, aos grupos de animais expostos a 12,5% (18 $\mu\text{g a.i./L}$), 25% (36 $\mu\text{g a.i./L}$) e 50% (72 $\mu\text{g a.i./L}$) da CL_{50} definida previamente. n = 25 girinos/grupo.

Em relação ao teste de resposta ao predador, nossas análises evidenciaram interação entre os fatores “estímulo” e “tratamento” para os parâmetros “tempo de mobilidade” e “frequência de cruzamentos” (Figura 7A-B). Notamos que apenas os girinos do grupo controle apresentaram maior tempo de mobilidade e de atividade locomotora na sessão em que o estímulo predatório foi introduzido no aparato. Conforme discutido por Teplitsky et al. (2005), o maior desempenho natatório desses animais, nessa sessão, pode indicar que sua habilidade de reconhecer estímulos predatórios na água estava preservada e nos permite inferir que o aumento da locomoção desses animais esteja ligada à sua rápida capacidade de escape (que pode garantir sua sobrevivência), conforme também evidenciado por Fernandez & Oliveira (2017) em girinos de *Rhinella ornata*. Esses autores observaram em seus experimentos que girinos de *R. ornata* são capazes de reconhecer e responder aos sinais químicos presentes, evitando os ambientes que simulam predação. Além disso, os autores perceberam que o indivíduo teste escolhe o ambiente sem outros girinos, evidenciando ainda mais nossos resultados.

Por outro lado, os animais expostos à ABA não alteraram seu comportamento locomotor entre as sessões do teste. Nesse sentido, podemos supor que o biopesticida tenha provocado alterações nos mecanismos de percepção e de resposta defensiva frente a pistas químicas predatórias e, por conseguinte, interferido negativamente nas táticas evasivas locomotoras dos girinos avaliados. Conforme discutido por Langerhans (2009), alterações nesse tipo de habilidade têm implicações importantes na sobrevivência dos animais, uma vez que, a taxa de predação pode ser consideravelmente aumentada, colocando em risco a densidade populacional dos girinos de um determinado habitat.

Complementando essa avaliação, podemos observar que na sessão sem estímulo predatório a atividade locomotora dos animais expostos ABA (de todos os grupos) foi similar ao tempo de mobilidade e frequência de cruzamento dos girinos do grupo controle (Figura 6A-B). Se por um lado esses dados confirmam a ausência de efeito locomotor da ABA sobre os animais; por outro, permite descartar a possibilidade da resposta antipredatória ter sido influenciada por déficits na locomoção dos girinos no teste de resposta ao predador. Portanto, esses resultados reforçam a hipótese de que a ABA possa ter causado alterações nos mecanismos ligados à formação/exibição de uma resposta defensiva dos animais, ainda que estudos anteriores, como o de Raftery & Volz (2015), já tenham demonstrado que a ABA pode interferir negativamente na atividade locomotora de organismos não-alvo. Na ocasião, os autores investigaram o mecanismo de hipoatividade induzida por abamectina em *Danio rerio*, seus resultados sugeriram que a ABA induz a hipoatividade rápida e reversível dentro de

embriões iniciais de espécies não alvo, um efeito que pode ser mediado através do receptor GABA.

Nesse caso, é possível que a ABA não tenha interferido prejudicialmente nas vias dopaminérgicas dos animais ligadas à formação de resposta locomotora, tampouco causado alterações nos mecanismos GABAérgicos que participam da transmissão neuromuscular. Considerando que o mecanismo principal de ação da ABA nos organismos alvo envolve diretamente a inibição do neurotransmissor GABA (Cully et al., 1994; Novelli et al., 2012; Zortéa et al., 2017), nosso estudo demonstra pioneiramente que a exposição a esse biopesticida ocasiona, em um organismo não-alvo (i.e.: girinos de *L. catesbeianus*), efeitos muito diferentes daqueles esperados.

A literatura é muita escassa de investigações relacionadas aos efeitos da ABA sobre representantes da classe dos anfíbios. Entretanto, nossos dados se assemelham a outros estudos que evidenciaram alterações em respostas antipredatórias de girinos expostos a concentrações subletais de outros poluentes (Relyea 2003; Rohr & Crumrine, 2005; Relyea e Edwards, 2010; Polo-Cavia et al., 2016), reforçando a importância da qualidade da água para a resposta defensiva desses animais. Também vale ressaltar que diferente do que observamos, tais estudos relatam que os girinos de algumas espécies de anfíbios respondem a pistas predatórias, reduzindo seus níveis de atividade, evitando, assim, a detecção em encontros com predadores. Nesse caso, uma possível explicação para as divergências entre essas observações e o que observamos nos animais controle do nosso estudo, estaria relacionada com os procedimentos metodológicos adotados nos estudos, assim como as distintas espécies avaliadas. Além disso, conforme discutido por Langerhans (2009) e Pruitt & Husak (2010), deve-se ponderar que o desempenho de girinos frente à presença ou estímulo químico de um potencial predador é fortemente influenciado pelo tipo de predador utilizado e pela densidade de suas populações no ambiente em que se encontram os girinos. Enquanto, em habitats que sofrem frequentemente efeitos da estiagem (sucessivos eventos de seca) nota-se a presença de poucos predadores (Babbitt et al., 2003), habitats permanentes podem ter uma grande quantidade e diversidade de predadores (Wellborn et al., 1996) que podem afetar e, até mesmo, excluir completamente algumas populações de anuros nesses ambientes.

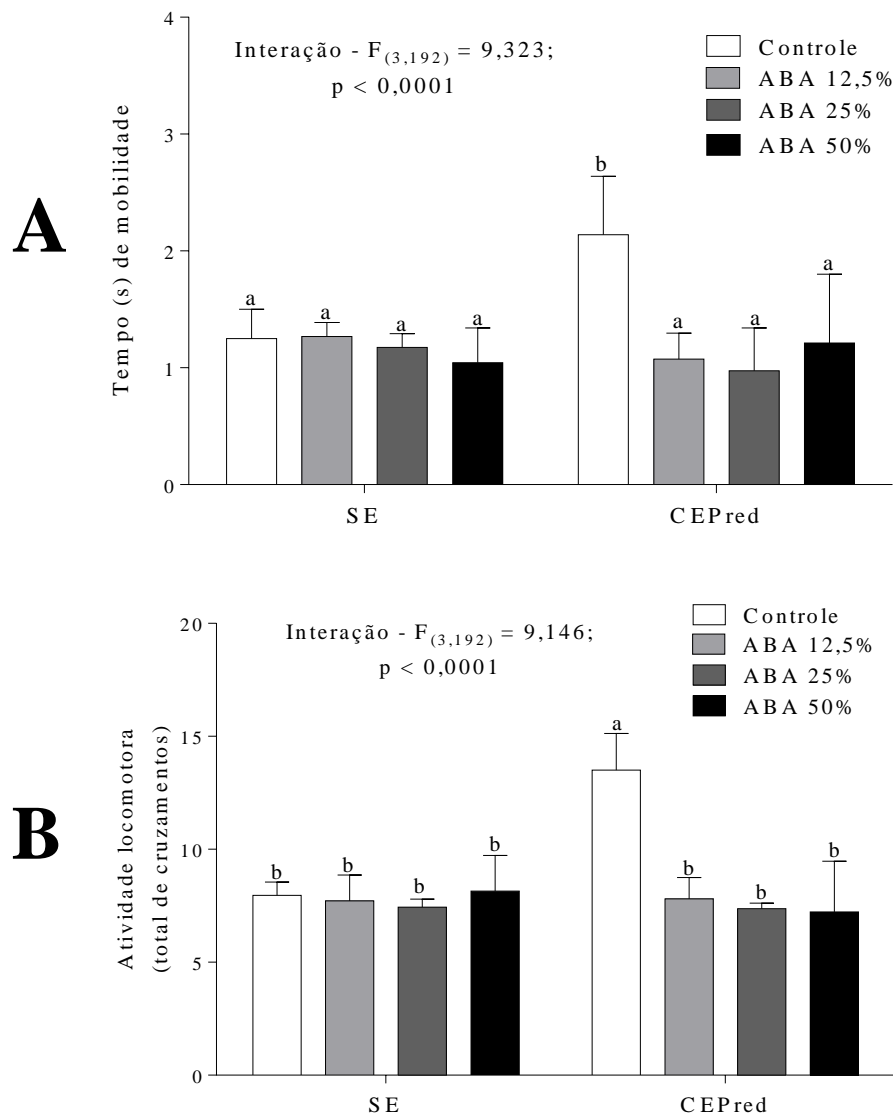


Figura 7. (A) Tempo de mobilidade e (B) atividade locomotora de girinos de *Lithobates catesbeianus* expostos ou não a diferentes concentrações de abamectina. As barras indicam a média + desvio padrão dos dados originais, os quais foram transformados em $\log(x)$ e posteriormente submetidos à two-way ANOVA. As múltiplas comparações foram realizadas pelo teste post hoc de Tukey, a 5% de probabilidade. As distintas letras minúsculas indicam diferenças significativas. ABA 12,5%, ABA 25% e ABA 50%, correspondem, respectivamente, aos grupos de animais expostos a 12,5% (18 $\mu\text{g a.i./L}$), 25% (36 $\mu\text{g a.i./L}$) e 50% (72 $\mu\text{g a.i./L}$) da CL_{50} definida previamente. Sem estímulo predatório (SE) e com estímulo predatório (CEPred). $n = 25$ girinos/grupo.

Em nosso estudo, também observamos que os girinos expostos à ABA apresentaram menores escores na avaliação da estrutura (Figura 8A) e pigmentação das bainhas mandibulares (Figura 8B), assim como na avaliação da condição da dentição (Figura 8C), sem efeito concentração resposta. Embora deformações morfológicas possam ocorrer naturalmente ao longo do desenvolvimento dos girinos (Drake et al., 2007), nossos resultados confirmam o potencial do biopesticida de provocar alterações morfológicas importantes, mesmo em curto período de tempo. Dados semelhantes já foram observados em girinos expostos a ambientes poluídos (Rowe et al., 1998; Hopkins et al., 2000), à diferentes temperaturas (Bresler & Bragg, 1954) e em girinos infectados (e.g.: fungos da espécie *Batrachochytrium dendrobatidis*) (Drake et al., 2007; Babini et al., 2015), sendo consenso que as estruturas orais dos girinos têm papel importante na alimentação destes animais. Conforme demonstrado por Mathew et al. (2010) e Venesky et al. (2010), a ausência ou alterações na mandíbula e/ou dentição dos girinos afeta negativamente sua capacidade de forrageio, bem como a cinética da alimentação. Além disso, modificações em estruturas orais implicam na necessidade de os animais terem que despender maior gasto energético para a aquisição de alimento, reduzindo as fontes alocadas para seu desenvolvimento (crescimento, metamorfose, etc.) (Babini et al., 2015). Logo, nossos dados demonstram que a exposição à ABA, além de poder causar alterações nas respostas de agregação e defensivas, nos permitem inferir que o comportamento alimentar dos animais também pode ser afetado.

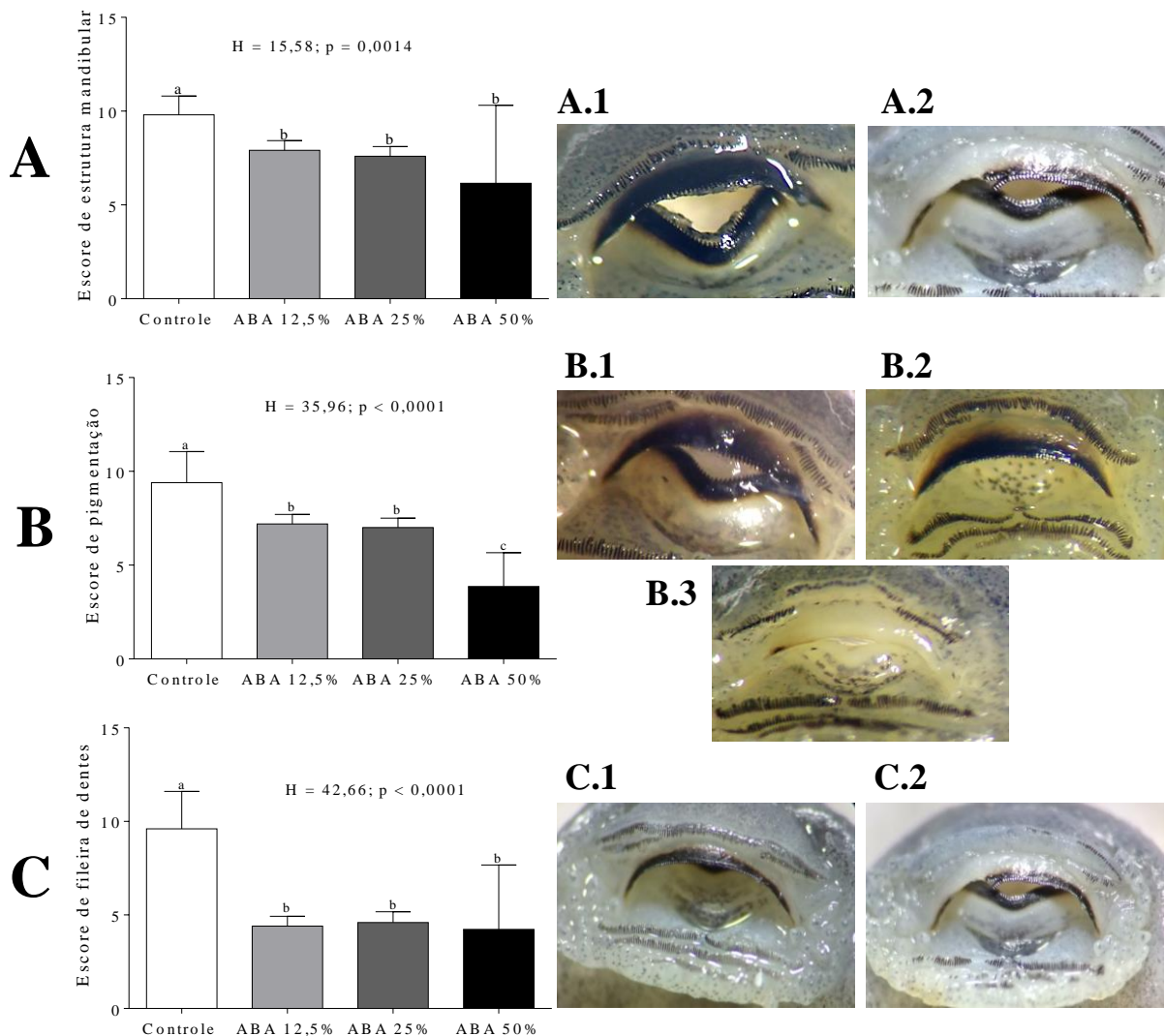


Figura 8. Escores atribuídos na avaliação dos discos orais de girinos de *Lithobates catesbeianus* expostos ou não a diferentes concentrações de abamectina. (A) Escores relativos à avaliação da estrutura mandibular, (B) da pigmentação das bainhas mandibulares e (C) da dentição dos animais. A.1 e A.2 correspondem, respectivamente, a imagens representativas das estruturas mandibulares intactas (normais) e com anormalidades. B.1, B.2 e B.3 correspondem a bainhas mandibulares com pigmentação normal, com pigmentação alterada e sem pigmentação, respectivamente. C.1 e C.2 correspondem a imagens representativas da dentição normal e com alterações. As barras indicam a média + desvio padrão dos dados originais, os quais foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com teste post hoc de Dunn's, a 5% de probabilidade. As distintas letras minúsculas indicam diferenças significativas. ABA 12,5%, ABA 25% e ABA 50%, correspondem, respectivamente, aos grupos de animais expostos a 12,5% (18 µg a.i./L), 25% (36 µg a.i./L) e 50% (72 µg a.i./L) da CL₅₀ definida previamente. n = 25 girinos/grupo.

Por fim, a avaliação do potencial mutagênico da ABA revelou alterações significativas nas células eritrocitárias dos girinos expostos ao pesticida. Quando comparados ao grupo controle esses animais apresentaram maior frequência de MN e maior somatório total de outras anormalidades nucleares (Figura 9). Além disso, observamos maior frequência de todos os tipos

específicos de anormalidades nucleares eritrocíticas avaliadas (núcleo multilobulado, binucleado, notched, kidney-shaped, blebbed e células apoptóticas) nos girinos expostos à ABA (Figura 11A-D e Figura 12A-C – em “Material Suplementar”). Com exceção da frequência de eritrócitos binucleados, para todas as outras anormalidades avaliadas observamos frequências iguais ou superiores àquelas identificadas nos animais do grupo controle positivo (Figura 11A-D e Figura 12A-C). Portanto, nossos dados demonstram que a exposição à ABA, mesmo por um curto período de tempo, provoca efeitos mutagênicos semelhantes ao fármaco ciclofosfamida, cujo efeito clastogênico (e.g.: micronúcleo) e aneugênico (e.g.: células binucleadas) é conhecido (Rehman et al., 2012).

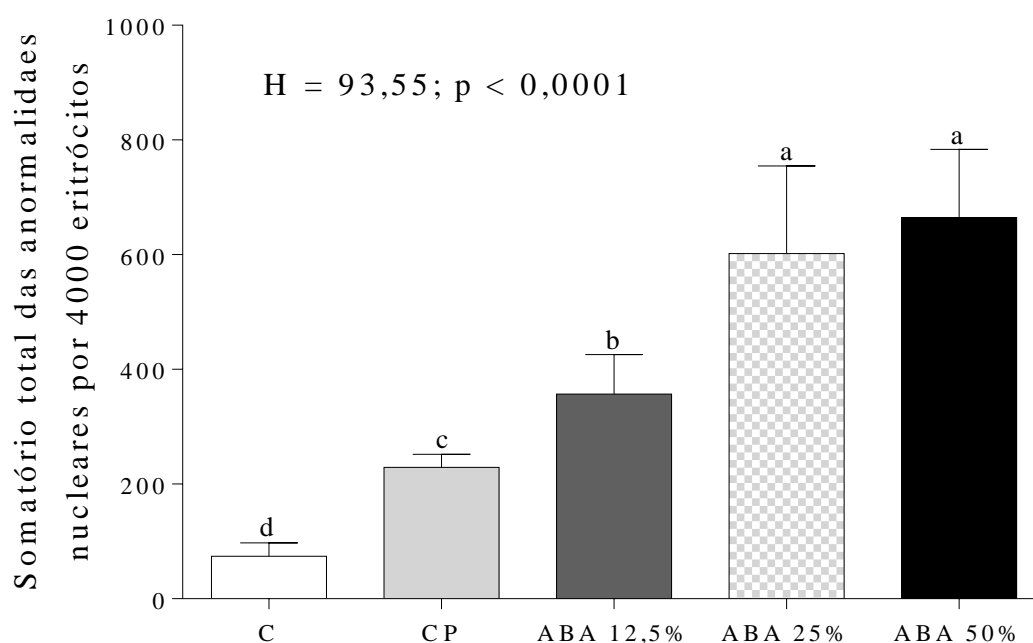


Figura 9. Somatório total das anormalidades nucleares eritrocitárias observado nos girinos de *Lithobates catesbeianus* expostos ou não a diferentes concentrações de abamectina. As barras indicam a média + desvio padrão dos dados originais, os quais foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com teste post hoc de Dunn's, a 5% de probabilidade. As distintas letras minúsculas indicam diferenças significativas. ABA 12,5%, ABA 25% e ABA 50%, correspondem, respectivamente, aos grupos de animais expostos a 12,5% (18 µg a.i./L), 25% (36 µg a.i./L) e 50% (72 µg a.i./L) da CL_{50} definida previamente. C: controle; CP: controle positivo (ciclofosfamida – 40 mg/L). n = 25 girinos/grupo.

O teste do MN é um dos mais populares de genotoxicidade ambiental, tendo como principal intuito avaliar o índice de dano citogenético (Udroiu, 2006). Sendo massas de cromatina citoplasmática com aparência de núcleos pequenos que surgem de fragmentos de cromossomos ou de cromossomos inteiros intactos atrasados no estágio de anáfase da divisão celular. Sua presença nas células representa aberrações cromossômicas estruturais e/ou

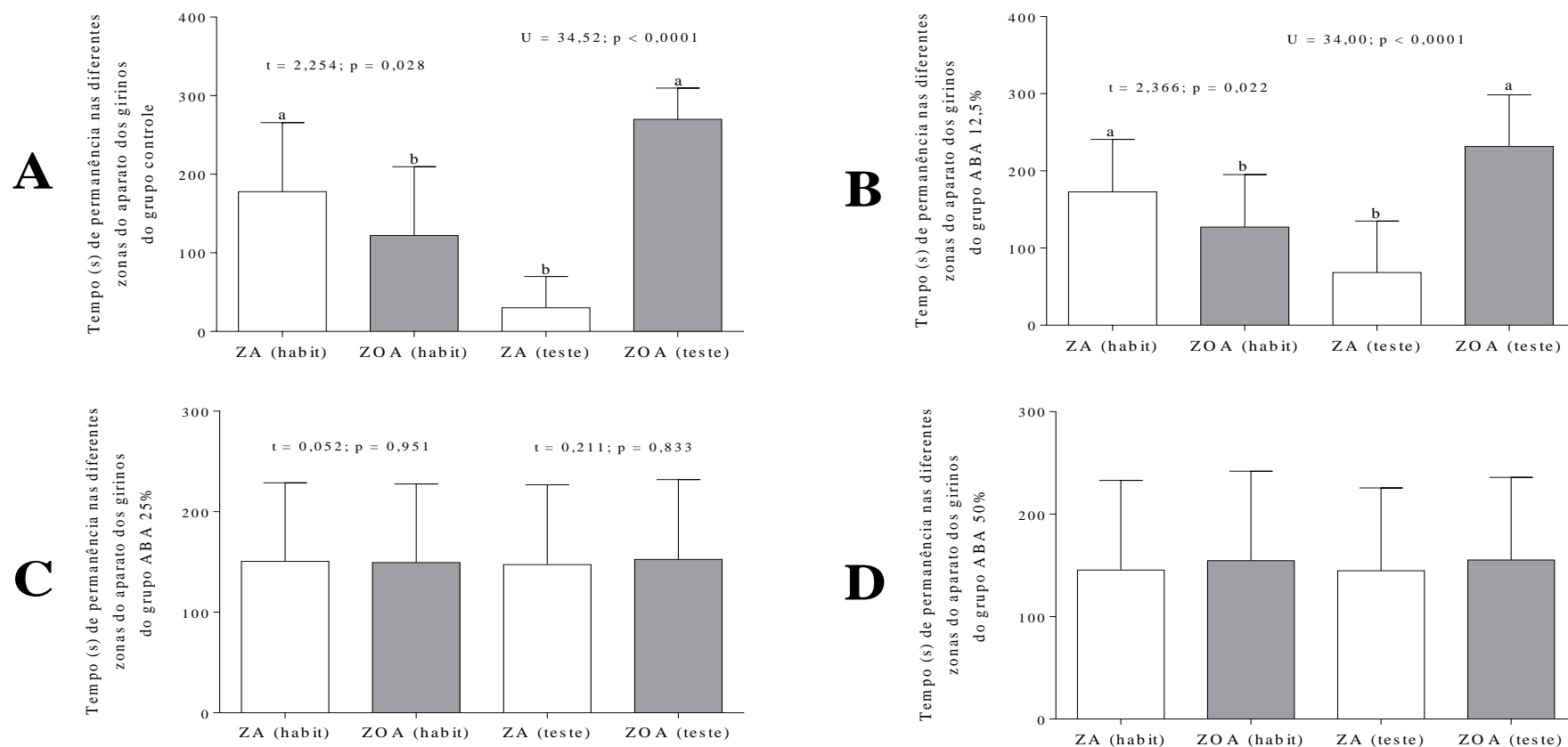


Figura 10. Tempo de permanência nas diferentes zonas do aparato utilizado no teste de agregação (sessão de habituação e teste) de girinos de *Lithobates catesbeianus* dos grupos controle (A), ABA 12,5% (B), ABA 25% (C) e ABA 50% (D). As barras indicam a média + desvio padrão dos dados originais. Os dados paramétricos foram submetidos ao teste t de Student e os não-paramétricos ao teste de Mann-Whitney, ambos a 5% de probabilidade. As distintas letras minúsculas indicam diferenças significativas. ABA 12,5%, ABA 25% e ABA 50%, correspondem, respectivamente, aos grupos de animais expostos a 12,5% (18 µg a.i./L), 25% (36 µg a.i./L) e 50% (72 µg a.i./L) da CL_{50} definida previamente. n = 25 girinos/grupo.

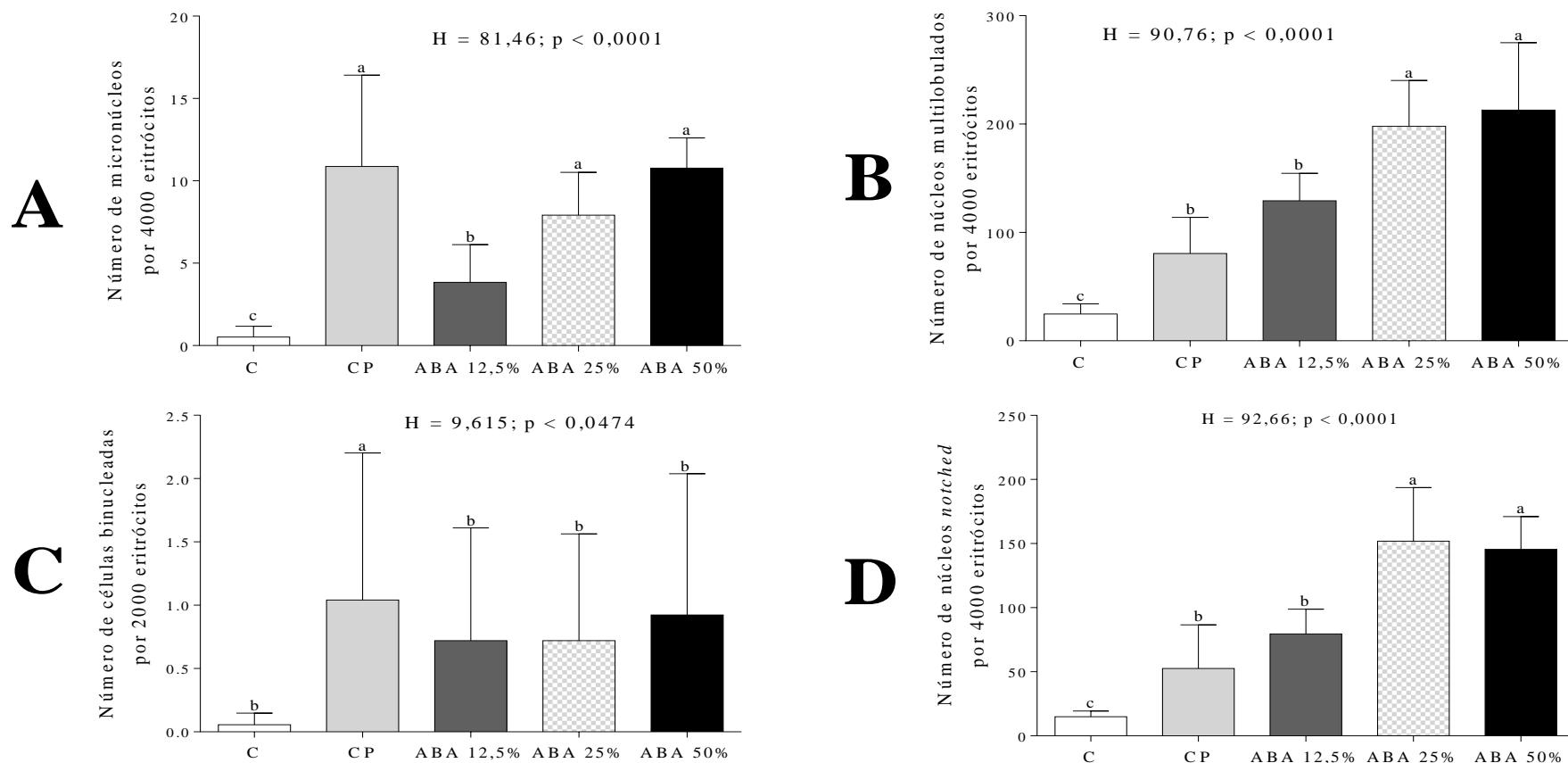


Figura 11. (A) Frequência de eritrócitos micronucleados, bem como (B) células eritrocíticas multilobuladas, (C) binucleadas e com (D) núcleo notched de girinos de *Lithobates catesbeianus* expostos ou não a diferentes concentrações de abamectina. As barras indicam a média + desvio padrão dos dados originais, os quais foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn's, a 5% de probabilidade. As distintas letras minúsculas indicam diferenças significativas. ABA 12,5%, ABA 25% e ABA 50%, correspondem, respectivamente, aos grupos de animais expostos a 12,5% (18 µg a.i./L), 25% (36 µg a.i./L) e 50% (72 µg a.i./L) da CL_{50} definida previamente. C: controle; CP: controle positivo (ciclofosfamida – 40 mg/L). n = 25 girinos/grupo.

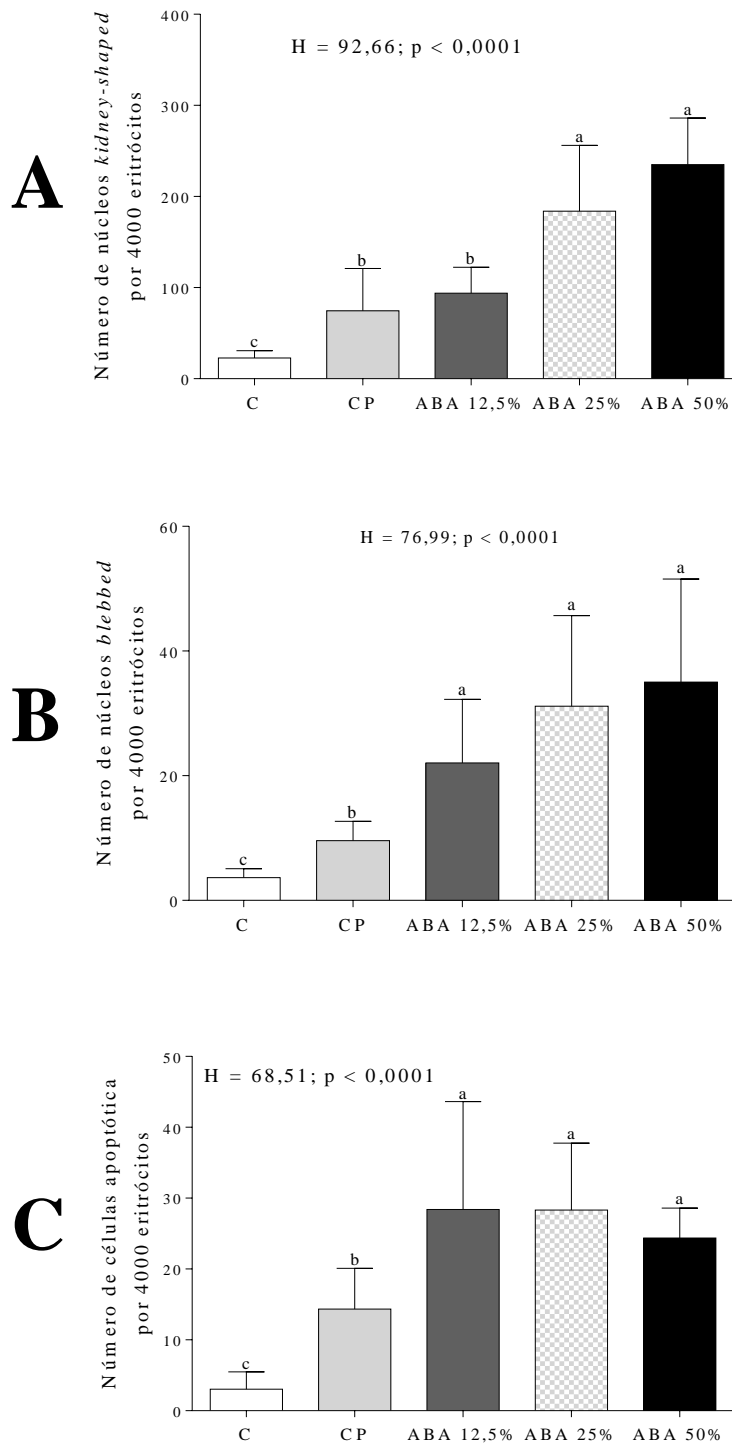


Figura 12. (A) Frequência de células eritrócíticas com núcleo *kidney-shaped*, (B) *blebbed* e de (C) células apoptóticas de girinos de *Lithobates catesbeianus* expostos ou não a diferentes concentrações de abamectina, por um período de 12 dias. As barras indicam a média + desvio padrão dos dados originais, os quais foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com teste post hoc de Dunn's, a 5% de probabilidade. As distintas letras minúsculas indicam diferentes significativas. ABA 12,5%, ABA 25% e ABA 50%, correspondem, respectivamente, aos grupos de animais expostos a 12,5% (18 µg a.i./L), 25% (36 µg a.i./L) e 50% (72 µg a.i./L) da CL₅₀ definida previamente. C: controle; CP: controle positivo (ciclofosfamida – 40 mg/L). n = 25 girinos/grupo.

numéricas decorrentes da mitose (Bolognesi et al., 2006), devido principalmente a um estresse induzido por químicos (Ateeq et al., 2002). A formação de anormalidades nucleares morfológicas foi descrita primeiramente em eritrócitos de peixes por Carrasco et al. (1990) e tais anormalidades, incluindo os núcleos lobulados, entalhados e células binucleadas, foram utilizadas por vários autores como possíveis indicadores mutagênicos (Viana et al., 2017). Vários estudos mostraram que os eritrócitos de espécies não-alvo apresentam uma alta frequência de anormalidades nucleares após exposição a xenobióticos em diferentes condições, seja *in situ* ou *ex situ* (Yadav e Trivedi, 2009). A detecção de MN e outras anormalidades nucleares em organismos não-alvo é uma importante ferramenta para avaliação da qualidade da água, bem como a saúde de uma determinada espécie (Matozzo et al., 2018).

Em estudo desenvolvido por Montalvão & Malafaia (2017), os autores relataram efeito mutagênico semelhante ao que observamos. Na ocasião, os autores observaram que a exposição de girinos de *L. catesbeianus* a ABA (nas concentrações de 25% e 50% da CL₅₀), por apenas 48 h, foi suficiente para causar aparecimento de variadas anormalidades nucleares eritrocitárias. Portanto, nossa investigação além de confirmar o potencial mutagênico da ABA, demonstra que a exposição à concentração menor do pesticida (12,5 % da CL₅₀), também causa anormalidades eritrocitárias, bem como evidencia que período mais prolongado de exposição (12 dias) aumenta consideravelmente a frequência de anormalidades nucleares nesses animais. Enquanto o percentual de eritrócitos com anormalidades nucleares observado no estudo de Montalvão & Malafaia (2017) – após 96 h de exposição – não ultrapassou 2% do total de células avaliadas; no presente estudo, observamos que aproximadamente 33% do total de células analisadas apresentaram alguma alteração nuclear, após 12 dias de exposição.

Entretanto, o modo como a ABA age nas células causando anormalidades nucleares, constitui um campo fértil para investigações por estudos futuros. De qualquer forma, considerando os tipos de anormalidades nucleares mais frequentemente observados nos girinos expostos ao pesticida, assim como a semelhança entre as alterações eritrocitárias dos animais expostos a ABA e daqueles expostos à ciclofosfamida, é tentador especular que o pesticida tenha agido em estágios tardios da divisão celular eritrocitária – causando, especialmente, defeitos no processo de citocinese (inferidos pela presença de células binucleadas). Além disso, conforme discutido por Gómez-Meda et al. (2006), o maior número de núcleos *multiloculated*, *notched*, *kidney-shaped* e *blebbed* nos eritrócitos

circulantes dos animais expostos ao poluente pode estar relacionado com o aumento da produção e liberação da enzima Dnase ativada por caspase, levando à clivagem de diferentes proteínas nucleares e constituintes do citoesqueleto, além de dano mitocondrial, nitração de proteínas do DNA, falhas na polimerização da tubulina ou oxidação de RNAm. Ao observamos alta frequência de eritrócitos micronucleados nos animais expostos ao biopesticida, também é plausível supor que possa ter havido rupturas cromossômicas (o que caracteriza um efeito clastogênico) ou disfunção na segregação dos cromossomos durante a divisão celular eritrocitária (o que caracteriza um efeito aneugênico da ABA). Assim, não podemos negligenciar o fato de que os mecanismos de ação do biopesticida responsáveis por provocar efeitos citogenéticos nos eritrócitos podem ser complexos e abrangentes, o que merece ser investigado em estudos mais específicos.

4. CONCLUSÕES

Nossos dados confirmam a hipótese que a ABA causa em girinos de *L. catesbeianus* alterações comportamentais, morfológicas e aumento de anormalidades nucleares em eritrócitos circulantes. Portanto, nossos resultados evidenciam alterações biológicas importantes nos girinos expostos ao pesticida que, no ambiente natural, podem implicar negativamente não apenas na sobrevivência dos indivíduos, mas em processos ecológicos importantes na dinâmica de suas populações em habitats contaminados. Assim, o presente trabalho abre perspectivas para que investigações futuras avaliem o modo como a ABA age nos organismos não-alvos (neste caso, os girinos), como também para a identificação de outras possíveis alterações celulares, genéticas, comportamentais e/ou morfológicas.

6. REFERÊNCIAS

Agrofit (Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários), Ministério da Agricultura; Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 10 Dez. 2017.

Altenburger R, Bödeker W, Faust M & Grimme LH. Evaluation of the isobologram method for the assessment of mixtures of chemicals: combination effect studies with pesticides in algal biotests. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 20(1): 98-114, 1990.

- Altig R. A key to the tadpoles of the continental United States and Canada. *Herpetologica*, 180-207, 1970.
- Angilletta MJ. Thermal adaptation: a theoretical and empirical synthesis. Oxford University Press, 2009.
- Ashauer R, Boxall AB, Brown CD. New ecotoxicological model to simulate survival of aquatic invertebrates after exposure to fluctuating and sequential pulses of pesticides. *Environmental Science & Technology*, 41(4): 1480-1486, 2007.
- Ateeq B, Abul FM, Niamat AM & Ahmad W. Induction of micronuclei and erythrocyte alterations in the catfish *Clarias batrachus* by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and butachlor. *Mutation Research*, 518(2): 135-144, 2002.
- Babini MS, Salas NE, de Lourdes Bionda C & Martino AL. Implicaciones de la urbanización en la presencia, distribución y ecología reproductiva de la fauna de anuros de una ciudad del área central de Argentina. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 86(1): 188-195, 2015.
- Bai SH & Ogbourne S. Eco-toxicological effects of the avermectin family with a focus on abamectin and ivermectin. *Chemosphere*, 154, 204-214, 2016.
- Bateman PW & Fleming PA. Body size and group size of Cuban tree frog (*Osteopilus septentrionalis*) tadpoles influence their escape behavior. *Acta Ethologica*, 18(2): 161-166, 2015.
- Bolognesi C, Perrone E, Roggieri P, Pampanin DM & Sciutto A. Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. *Aquatic Toxicology*, 78, 93-98, 2006.
- Bosch B, Gorla N, Aiassa D. Micronucleus test in post metamorphic *Odontophrynus cordobae* and *Rhinella arenarum* (Amphibia: Anura) for environmental monitoring. *Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences*, 3(6): 155-163, 2011.
- Bossus MC, Madsen SS, Tipsmark CK. Functional dynamics of claudin expression in Japanese medaka (*Oryzias latipes*): response to environmental salinity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 187, 74-85, 2015.
- Branco CM, França FH, Pontes LA & Amaral PS. Avaliação da suscetibilidade a inseticidas em populações de traça-das-crucíferas de algumas áreas do Brasil. *Horticultura Brasileira*, 21, 549-552, 2003.
- Brodeur JC, Sanchez M, Castro L, Rojas DE, Cristos D, Damonte MJ & Andriulo AE. Accumulation of current-use pesticides, cholinesterase inhibition and reduced body condition

in juvenile one-sided livebearer fish (*Jenynsia multidentata*) from the agricultural Pampa region of Argentina. *Chemosphere*, 185, 36-46, 2017.

Bryan GW, Gibbs PE, Burt GR. A comparison of the effectiveness of tri-n-butyltin chloride and five other organotin compounds in promoting the development of imposex in the dogwhelk, *Nucella lapillus*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 68, 4, 733-744, 1988.

Bueno-Guimarães HM, Ferreira CM, Garcia MLB & Saldiva OPHN. Tadpole Epithelium Test: Potential Use of *Rana catesbeiana* Histopathologic Epithelium Changes to Evaluate Aquatic Pollution. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 67, 202-209, 2001.

Burg RW, Miller BM, Baker EE, Birnbaum J, Currie SA, Hartman R & Tunac JB. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 15(3): 361-367, 1979.

Campbell WC. Ivermectin and Abamectin. Springer Science & Business Media, 2012.

Cardoso-Vera JD, Islas-Flores H, SanJuan-Reyes N, Montero-Castro EI, Galar-Martínez M, García-Medina S & Gómez-Oliván LM. Comparative study of diclofenac-induced embryotoxicity and teratogenesis in *Xenopus laevis* and *Lithobates catesbeianus*, using the frog embryo teratogenesis assay: *Xenopus* (FETAX). *Science of the Total Environment*, 574, 467-475, 2017.

Carvalho GAD, Morais AA, Rocha LC, Godoy MS & Cosme LV. Selectivity of insecticides to eggs and nymphs of *Orius insidiosus* (Hemiptera: Anthocoridae). *Neotropical Entomology*, 34(3): 423-427, 2005.

Casati P, Morrow DJ, Fernandes J & Walbot V. UV-B signaling in maize: transcriptomic and metabolomic studies at different irradiation times. *Plant Signaling & Behavior*, 6(12): 1926-1931, 2011.

Chai L, Wang H, Zhao H & Dong S. Chronic Effects of Fluoride Exposure on Growth, Metamorphosis, and Skeleton Development in *Bufo gargarizans* Larvae. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 98(4): 496-501, 2017.

Costa RN & Nomura F. Measuring the impacts of Roundup Original® on fluctuating asymmetry and mortality in a Neotropical tadpole. *Hydrobiologia*, 765(1): 85-96, 2017.

Cribb AY, Afonso AM, Mostério C. Manual técnico de ranicultura. Embrapa Agroindústria de Alimentos-Livro técnico. Infoteca-E, 2013.

Cully DF, Vassilatis DK, Liu KK, Paresse PS, Van der Ploeg LHT, Schaeffer JM & Arena JP. Cloning of an avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel from *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 371(6499): 707-711, 1994.

David M, Marigoudar SR, Patil VK & Halappa, R. Behavioral, morphological deformities and biomarkers of oxidative damage as indicators of sublethal cypermethrin intoxication on the tadpoles of *D. melanostictus* (Schneider, 1799). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 103(2): 127-134, 2012.

Do Amaral DF, Montalvão MF, de Oliveira Mendes B, de Souza JM, Chagas TQ, de Lima Rodrigues AS & Malafaia G. Insights about the toxic effects of tannery effluent on *Lithobates catesbeianus* tadpoles. *Science of The Total Environment*, 621, 791-801, 2018.

Eddi CAN & Caracostantogolo J. Use of macrocyclic lactones to control cattle parasites in South America. In: Vercruyysse JR, Rew RS. *Macrocyclic lactones in antiparasitic therapy*. Wallingford. CBI Publishing. 262-71, 2012.

Ehrsam M, Knutie SA, Rohr JR. The herbicide atrazine induces hyperactivity and compromises tadpole detection of predator chemical cues. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(9): 2239-2244, 2016.

Fantazzini P, Mengoli S, Pasquini L, Bortolotti V, Brizi L, Mariani M & Prada F. Gains and losses of coral skeletal porosity changes with ocean acidification acclimation. *Nature Communications*, 6(1): 7785-7792, 2015.

Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455(1): 81-95, 2000.

Fernandez JMC & Oliveira MZT. Predation and Schooling Influence on the Primary Response of Individuals of *Rhinella ornata* (Spix, 1824) (Anura: Bunonidae): An Experimental Assessment of Habitat Selection. *South American Journal of Herpetology*, 12(1): 57-60, 2017.

Freitas JS & Almeida, EA. Antioxidant defense system of tadpoles (*Eupemphix nattereri*) exposed to changes in temperature and pH. *Zoological Science*, 33(2): 186-194, 2016.

Gambale PG, Woitovicz-Cardoso M, Vieira RR, Batista VG, Ramos J & Bastos RP. Composição e riqueza de anfíbios anuros em remanescentes de Cerrado do Brasil Central. *Iheringia, Série Zoologia*, 104(1): 50-58, 2014.

Gosner KL. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, 16(3): 183-190, 1960.

- Griffiths RA & Denton J. Interspecific associations in tadpoles. *Animal Behaviour*, 44(6): 1153-1157, 1992.
- Knauer K, Homazava N, Junghans M & Werner I. The influence of particles on bioavailability and toxicity of pesticides in surface water. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 13, 585-600, 2017.
- Lajmanovich RC, Junges CM, Attademo AM, Peltzer PM, Cabagna-Zenklusen MC & Basso A. Individual and mixture toxicity of commercial formulations containing glyphosate, metsulfuron-methyl, bispyribac-sodium, and picloram on *Rhinella arenarum* tadpoles. *Water, Air, & Soil Pollution*, 224(3): 1404, 2013.
- Lefcort H. Adaptive, chemically mediated fright response in tadpoles of the southern leopard frog, *Rana utricularia*. *Copeia*, 1996(2): 455-459, 1996.
- Li M, Zhou S, Wang XS, Liu C & Li S. Effects of in vitro and in vivo avermectin exposure on alpha synuclein expression and proteasomal activity in pigeons. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 135, 24-31, 2017.
- Lumaret JP, Errouissi F, Floate K, Römbke J & Wardhaugh K. A review on the toxicity and non-target effects of macrocyclic lactones in terrestrial and aquatic environments. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 13(6): 1004-60, 2012.
- Marion LF, Lobo EA, Schuch M, Kern DI & Niemeyer JC. Avaliação da toxicidade do solo em culturas olerícolas de bases ecológicas e convencionais, município de Santa Cruz do Sul, RS, Brasil, através de ensaios ecotoxicológicos. *Caderno de Pesquisa*, 24(1): 14-33, 2012.
- Matozzo V, Fabrello J, Masiero L, Ferraccioli F, Finos L, Pastore P & Bogialli S. Ecotoxicological risk assessment for the herbicide glyphosate to non-target aquatic species: A case study with the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Environmental Pollution*, 233, 623-632, 2018.
- Matthew DV, Wassersug RJ, Parris MJ. The impact of variation in labial tooth number on the feeding kinematics of tadpoles of southern leopard frog (*Lithobates sphenoccephalus*). *Copeia*, 3, 481-486, 2010.
- Mesa LM, Lindt I, Negro L, Gutierrez MF, Mayora G, Montalto L & Lifschitz A. Aquatic toxicity of ivermectin in cattle dung assessed using microcosms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 144, 422-429, 2017.
- Miaud C, Dejean T, Savard K, Millery-Vigues A, Valentini A, Gaudin NCG & Garner TW. Invasive North American bullfrogs transmit lethal fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Biological Invasions*, 18(8): 2299-2308, 2016.

- Mikó Z, Ujszegi J, Gál Z & Hettyey A. Effects of a glyphosate-based herbicide and predation threat on the behaviour of agile frog tadpoles. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 140, 96-102, 2017.
- Mingo V, Lötters S, Wagner, N. The impact of land use intensity and associated pesticide applications on fitness and enzymatic activity in reptiles - A field study. *Science of The Total Environment*, 590, 114-124, 2017.
- Montalvão MF, de Souza JM, Guimarães ATB, de Menezes IPP, da Silva Castro AL, de Lima Rodrigues AS & Malafaia G. The genotoxicity and cytotoxicity of tannery effluent in bullfrog (*Lithobates catesbeianus*). *Chemosphere*, 183, 491-502, 2017.
- Moreira RA, Daam MA, Vieira BH, Sanches ALM, Reghini MV, da Silva Mansano A & Rocha O. Toxicity of abamectin and difenoconazole mixtures to a Neotropical cladoceran after simulated run-off and spray drift exposure. *Aquatic Toxicology*, 185, 58-66, 2017.
- Münze R, Hannemann C, Orlinskiy P, Gunold R, Paschke A, Foit K & Jernstedt H. Pesticides from wastewater treatment plant effluents affect invertebrate communities. *Science of The Total Environment*, 599, 387-399, 2017.
- Neto MP, Reis PR, Silva RA & Zacarias MS. Influência do manejo das plantas adventícias na diversidade de ácaros em cafezal orgânico. *Coffee Science*, 10(3), 357-364, 2015.
- Novelli A, Vieira BH, Braun AS, Mendes LB, Daam MA & Espíndola ELG. Impact of runoff water from an experimental agricultural field applied with Vertimec® 18EC (abamectin) on the survival, growth and gill morphology of zebrafish juveniles. *Chemosphere*, 144, 1408-1414, 2016.
- Novelli A, Vieira BH, Cordeiro D, Cappelini LTD, Vieira EM & Espíndola ELG. Lethal effects of abamectin on the aquatic organisms *Daphnia similis*, *Chironomus xanthus* and *Danio rerio*. *Chemosphere*, 86(1), 36-40, 2012.
- Nowell LH, Norman JE, Ingersoll CG & Moran PW. Development and application of freshwater sediment-toxicity benchmarks for currently used pesticides. *Science of the Total Environment*, 550, 835-850, 2016.
- Paredes R & Agmo A. GABA and behavior: the role of receptor subtypes. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 16, 145-170, 1992.
- Pérez-Iglesias JM, de Arcaute CR, Natale GS, Soloneski S & Larramendy M. Evaluation of imazethapyr-induced DNA oxidative damage by alkaline Endo III-and Fpg-modified single-cell gel electrophoresis assay in *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 142, 503-508, 2017.

- Pérez-Iglesias JM, Soloneski S, Nikoloff N, Natale GS & Larramendy ML. Toxic and genotoxic effects of the imazethapyr-based herbicide formulation Pivot H® on monteideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 119, 15-24, 2015.
- Pisteková V, Voslarová E, Svobodová Z. Nitrite toxicity to *Danio rerio*: Effects of chloride concentration during acclimatization and in toxicity test. *Acta Veterinaria Brno*, 74(3): 435-440, 2005.
- Pochini KM & Hoverman JT. Immediate and lag effects of pesticide exposure on parasite resistance in larval amphibians. *Parasitology*, 144(6): 817-822, 2017.
- Polo-Cavia N, Burraco P, Gomez-Mestre I. Low levels of chemical anthropogenic pollution may threaten amphibians by impairing predator recognition. *Aquatic Toxicology*, 172, 30-35, 2016.
- Rafferty TD & Volz DC. Abamectin induces rapid and reversible hypoactivity within early zebrafish embryos. *Neurotoxicology and Teratology*, 49, 10-8, 2015.
- Rath S, Schroder CHK, Silva CR, Ferreira FO, Dionizio AC & Bosco SMD. Avermectins in Brazilian agribusiness: a solution or a problem? *Veterinária e Zootecnia*, 23(1):8-24, 2016.
- Relyea RA. The lethal impacts of roundup and predatory stress on six species of North American tadpoles. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 48(3): 351–357, 2005.
- Rissoli RZ, Abdalla FC, Costa MJ, Rantin FT, McKenzie DJ & Kalinin AL. Effects of glyphosate and the glyphosate based herbicides Roundup Original® and Roundup Transorb® on respiratory morphophysiology of bullfrog tadpoles. *Chemosphere*, 156, 37-44, 2016.
- Rohr JR & Crumrine PW. Effects of an herbicide and an insecticide on pond community structure and processes. *Ecological Applications*, 15(4): 1135-1147, 2005.
- Rohr JR, Brown J, Battaglin WA, McMahon TA & Relyea RA. A pesticide paradox: Fungicides indirectly increase fungal infections. *Ecological Applications*, 27(8): 2290-2302, 2017.
- Rumschlag S & Rohr JR. The Influence of Pesticide Use on Amphibian Chytrid Fungal Infections Varies with Host Life Stage. *BioRxiv*, 165779, 2017.
- Sanches ALM, Vieira BH, Reghini MV, Moreira RA, Freitas EC, Espindola ELG & Daam M. Single and mixture toxicity of abamectin and difenoconazole to adult zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 188, 582-587, 2017.

- Sarikaya R & Yılmaz M. Investigation of acute toxicity and the effect of 2, 4-D (2, 4-dichlorophenoxyacetic acid) herbicide on the behavior of the common carp (*Cyprinus carpio* L., 1758; Pisces, Cyprinidae). *Chemosphere*, 52(1): 195-201, 2003.
- Schiffer M, Hangartner S, Hoffmann AA. Assessing the Relative Importance of Environmental Effects, Carry-over Effects and Species Differences in Thermal Stress Resistance: a Comparison of *Drosophilids* across Field and Laboratory Generations. *Journal of Experimental Biology*, 216(20): 3790-3798, 2013.
- Scoz PL, Botton M, Garcia MS. Chemical control of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) in laboratory. *Ciência Rural*, 34(6): 1689-1694, 2004.
- Seixas Filho JTD, Camargo Filho CB, Pereira MM, Martins AMCRP, Ribeiro Filho OP, Mello SCR & Hipolito M. Histopathological aspects of the liver of free-living and farmed bullfrogs (*Lithobates catesbeianus*). *Revista Brasileira de Zootecnia*, 46(4): 275-279, 2017.
- Soloneski S, de Arcaute CR, Nikoloff N & Larramendy ML. Genotoxicity of the herbicide imazethapyr in mammalian cells by oxidative DNA damage evaluation using the Endo III and FPG alkaline comet assays. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(11): 10292-10300, 2017.
- Spieler M. Risk of predation affects aggregation size: a study with tadpoles of *Phrynomantis microps* (Anura: Microhylidae). *Animal Behaviour*, 65(1): 179-184, 2003.
- Udroiu I. The micronucleus test in piscine erythrocytes. *Aquatic Toxicology*, 79, 201-204, 2006.
- Van Buskirk JOSH & McCollum S. Influence of tail shape on tadpole swimming performance. *Journal of Experimental Biology*, 203(14): 2149-2158, 2000.
- Vasconcelos AM, Daam MA, de Resende JC, Casali-Pereira MP & Espíndola EL. Survival and development of bullfrog tadpoles in microcosms treated with abamectin. *Ecotoxicology*, 1-9, 2017.
- Vasconcelos AM, Daam MA, dos Santos LR, Sanches AL, Araújo CV & Espíndola EL. Acute and chronic sensitivity, avoidance behavior and sensitive life stages of bullfrog tadpoles exposed to the biopesticide abamectin. *Ecotoxicology*, 25(3): 500-509, 2016.
- Venesky MD, Wassersug RJ, Parris MJ. How does a change in labial tooth row number affect feeding kinematics and foraging performance of a ranid tadpole (*Lithobates sphenoccephalus*)? *Biological Bulletin*. 218(2): 160–168, 2010b.

- Venesky MD, Wassersug RJ, Parris MJ. The impact of variation in labial tooth number on the feeding kinematics of tadpoles of southern leopard frog (*Lithobates sphenoccephalus*). *Copeia* 3, 481-486, 2010a.
- Viana LF, Suárez YR, Cardoso CAL, Solórzano JCJ, do Amaral Crispim B, Grisolia AB & Lima-Junior SE. Erythrocyte Nuclear Abnormalities in *Astyanax lacustris* in Response to Landscape Characteristics in Two Neotropical Streams. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 73, 01-08, 2017.
- Vieira BH. Efeitos do agrotóxico Vertimec no fitoplâncton: um estudo laboratorial e *in situ*. MSc Thesis. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, Brasil, 2010.
- Wagner N & Brühl CA. The Use of Terrestrial Life-stages of European Amphibians in Toxicological Studies. In: *Ecotoxicology and Genotoxicology*, 143-162, 2017.
- Ware GW & Whitacre DM. *The pesticide book*, 6, 496, 2004. (ISBN 1892829-11-8). Disponível em: <http://ipmworld.umn.edu/chapters/ware.htm>. Acesso em 19 Dez. 2017.
- Weldemariam T & Getachew M. Impact of pesticides on birds from DDT to current fatality: a literature review. *Journal of Zoology Studies*, 3(2): 44-55, 2016.
- Wirz MV, Saldiva PH, Freire-Maia DV. Micronucleus test for monitoring genotoxicity of polluted river water in *Rana catesbeiana* tadpoles. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 75(6): 1220-1227, 2005.
- Yadav KK & Trivedi SP. Sublethal exposure of heavy metals induces micronuclei in fish, *Channa punctata*. *Chemosphere*, 77, 1495-1500, 2009.
- Yu M, Yao J, Liang J, Zeng Z, Cui B, Zhao X & Cui H. Development of functionalized abamectin poly (lactic acid) nanoparticles with regulatable adhesion to enhance foliar retention. *RSC Advances*, 7(19): 11271-11280, 2017.
- Zortéa T, Segat JC, Maccari AP, Sousa JP, Da Silva AS & Baretta, D. Toxicity of four veterinary pharmaceuticals on the survival and reproduction of *Folsomia candida* in tropical soils. *Chemosphere*, 173, 460-465, 2017.