

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Urutaí  
Programa de Pós-Graduação em Conservação de  
Recursos Naturais do Cerrado

**EFEITOS TOXICOLÓGICOS DA  
CONTAMINAÇÃO POR AGROTÓXICOS EM  
RECÉM-ECLODIDOS DE *Podocnemis expansa*  
(Testudines: Podocnemididae)**

**JOSÉ SILONARDO PEREIRA DE OLIVEIRA**

**Orientador:** Prof. Dr. Guilherme Malafaia.

**Coorientadoras:** Profa. Dra. Daniela de  
Melo e Silva e Dra. Wanessa Fernandes  
Carvalho.

Urutaí, fevereiro de 2020



## **Instituto Federal Goiano de Educação, Ciência e Tecnologia**

*Reitor*

Prof. Dr. Vicente Pereira Almeida

*Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação e Inovação*

Prof. Dr. Alan Carlos Costa

### **Campus Urutaí**

*Diretor Geral*

Prof. Dr. Paulo César Ribeiro da Cunha

*Diretor de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação*

Prof. Dr. Anderson Rodrigo da Silva

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

*Coordenador*

Prof. Dr. Daniel de Paiva Silva

**JOSÉ SILONARDO PEREIRA DE OLIVEIRA**

**EFEITOS TOXICOLÓGICOS DA CONTAMINAÇÃO POR  
AGROTÓXICOS EM RECÉM-ECLODIDOS DE *Podocnemis*  
*expansa* (Testudines: Podocnemididae)**

*Orientador*

Prof. Dr. Guilherme Malafaia

*Coorientadoras*

Profa. Dra. Daniela de Melo e Silva

Dra. Wanessa Fernandes Carvalho

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)

2020

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

P48e           Pereira de Oliveira, José Silonardo  
                  EFEITOS TOXICOLÓGICOS DA CONTAMINAÇÃO POR  
AGROTÓXICOS EM RECÉM-ECLODIDOS DE *Podocnemis expansa*  
(Testudines: Podocnemididae) / José Silonardo  
Pereira de Oliveira; orientador Guilherme Malafaia;  
co-orientadora Wanessa Fernandes Carvalho. --  
Urutaí, 2020.  
                  35 p.

Dissertação ( em Mestrado Profissional em  
Conservação de Recursos Naturais do Cerrado) --  
Instituto Federal Goiano, Campus Urutaí, 2020.

1. Agrotóxicos. 2. Genotoxicidade. 3.  
Morfotoxicidade. 4. Mutagenicidade. 5. Toxicologia.  
I. Malafaia, Guilherme, orient. II. Fernandes  
Carvalho, Wanessa , co-orient. III. Título.

Responsável: Johnathan Pereira Alves Diniz - Bibliotecário-Documentalista CRB-1 nº2376

**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 9.610/98, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, a disponibilizar gratuitamente o documento no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, em formato digital 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  | <input type="checkbox"/> Artigo Científico              |
| <input checked="" type="checkbox"/> Dissertação                      | <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 |
| <input type="checkbox"/> Produto Técnico e Educacional - Tipo: _____ |   |

Nom e Completo do Autor: José Silonardo Pereira de Oliveira.

Matrícula: 2018101330940129

Título do Trabalho: EFEITOS TOXICOLÓGICOS DA CONTAMINAÇÃO POR AGROTÓXICOS EM FILHOTES DE *Podocnemis expansa* (Testudines: Podemididae)

**Restrições de Acesso ao Documento**

Documento confidencial:  Não  Sim, justifique: \_\_\_\_\_

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: 28/04/2020

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:

1. 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;
2. obteve autorização de quaisquer materiais inclusos no documento do qual não detém os direitos de autor/a, 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;
3. 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.

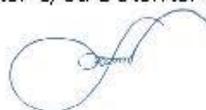
Anápolis, 13/04/2020.

Local Data



Assinatura do Autor e/ou Detentor dos Direitos Autorais

Ciente e de acordo:



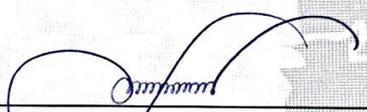
Assinatura do(a) orientador(a)

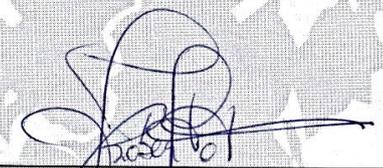


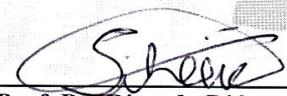
### FICHA DE APROVAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

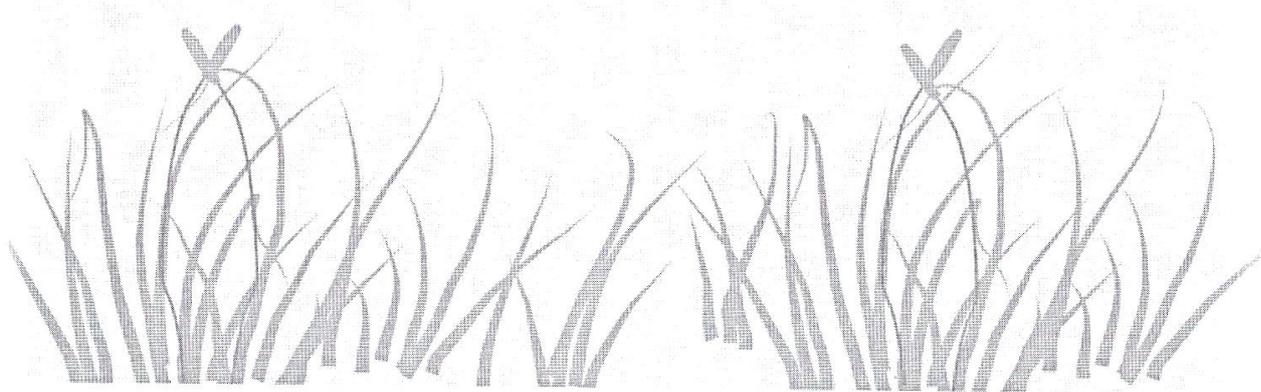
Título da dissertação:	<i>Efeitos Toxicológicos da contaminação por agrotóxicos em filhotes de Podocnemis expansa (Testudines: Podocnemididae)</i>
Orientador:	<b>Prof. Dr. Guilherme Malafaia</b>
Autor:	<b>José Silonardo Pereira de Oliveira</b>

Dissertação de Mestrado **APROVADA** em **28 de fevereiro de 2020**, 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. Guilherme Malafaia**  
Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. José Roberto Ferreira Alves Júnior**  
Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Ricardo Diógenes Dias Silveira**  
Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí



*“Que será do homem sem os animais? Se todos os animais desaparecessem, o homem morreria de solidão espiritual. Porque tudo que aconteça aos animais pode afetar os homens. Tudo está relacionado.”*

*“O que fere a terra fere também os filhos da terra. O homem não tece a teia da vida; é antes um de seus fios. O que quer que faça a essa teia, faz a si próprio.”*

*(Trechos da carta do Chefe Seattle)*

*“O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano. Construímos muros demais e pontes de menos. A gravidade explica os movimentos dos planetas, mas não pode explicar quem colocou os planetas em movimento. Deus governa todas as coisas e sabe tudo que é ou que pode ser feito.”*

*(Isaac Newton)*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço com carinho a minha mãe Edinalva Pereira Cardozo, o meu pai Leovegildo Cardozo, a minha irmã Kátia Simone Pereira de Oliveira, o meu irmão Evânio Ricardo Pereira de Oliveira e as minhas sobrinhas Allana de Oliveira Milhomem e Rafaella Yara de Oliveira Pires, pelo carinho, paciência, atenção e incentivo, importante ao meu crescimento pessoal e profissional.

Agradeço a meus amigos Raphael Pires de Campos, Talita Fernandes Carvalho, Marilene Carvalho Fernandes, Germano Fernandes dos Santos e Caio César Neves Sousa, que são como minha família e estão sempre presentes me apoiando e incentivando.

Faço um agradecimento especial a minha amiga e coorientadora Dra. Wanessa Fernandes Carvalho por sempre me incentivar a seguir em frente, pelo companheirismo e pela paciência em me colocar no caminho certo. Obrigado por não desistir mesmo quando eu já havia desistido!

Ao meu orientador Prof. Dr. Guilherme Malafaia pela oportunidade e confiança no meu trabalho.

A minha coorientadora Profa. Dra. Daniela de Melo e Silva pelo apoio durante todo o desenvolvimento deste estudo.

Ao Instituto Federal Goiano campus Urutaí, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Conservação de Recursos Naturais do Cerrado pela oportunidade de realização do mestrado.

Agradeço às professoras Dra. Lucélia Gonçalves Vieira e Karina Simões pelo incentivo e companheirismo na execução do estudo.

Agradeço o Laboratório de Genética e Mutagênese do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, o Laboratório de Pesquisas Biológicas do Instituto Federal Goiano, Campus Urutaí, e o Laboratório de Ensino e Pesquisa em Animais Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia por todo apoio e disponibilidade em participar do desenvolvimento das diferentes etapas do estudo.

Agradeço os alunos de graduação, mestrado e doutorado dos Laboratórios de Genética e Mutagênese da UFG, especialmente a Akemi Vieira Hosokawa, Andreyra Gonçalves Costa Motta, Jheneffer Sonara Aguir, Marcelino Benvindo de Souza, Tais Alves e ao graduando Thiago Gonçalves Barbosa do Laboratório de Ecologia Teórica e Síntese, pelo apoio e dedicação no desenvolvimento do estudo.

Agradeço a DBO Engenharia e aos meus companheiros e amigos de ofício, Crizanto Brito de Carvalho, Evellyn Borges de Freitas, Andrea Cristina Rodrigues dos Santos, Paulo Tassara Bueno, Filipe Viegas, Nathane Queiroz, Rafaela Vilela, Rayna Chaves Teixeira, Samuel Corrêa Bueno e Ricardo Araújo Prudente Pires pela compreensão e apoio.

Aos meus colegas do mestrado, Ana Flávia de Jesus Pinto, Anaian Antunes Bembem, Camilla Angélica de Lima, Élide Priscila Bogéa Carvalho, Éllen Lemes Silva, Fábio Miguel da Silva Borges, Italo Rômulo Mendes de Souza, Juliene de Brito Ferreira, Karll Cavalcante Pinto, Liliam Rodrigues Pinheiro, Mallú de Mendonça Barros, Marcos Vinicius Rezende de Ataíde, Matheus Rocha Mendes, Michelle Granato Guastalla, Natália Aparecida Campos, Paulo Tárcyo de R. Teixeira, Rômulo Vargas Lustosa e Temístocles Pacheco Lima, meus colegas nessa caminhada e bons amigos, por todo o conhecimento e momentos agradáveis compartilhados e por sempre me incentivarem seguir em frente. Foi uma honra estar ao lado de vocês nessa caminhada!

Agradeço também a cada professor e funcionário do do Instituto Federal Goiano, Campus Urutaí, por compartilharem seu conhecimento e nos proporcionarem um ambiente agradável e pródigo a aprendizagem, sempre com bom humor e presteza.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>12</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>13</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1. Coleta e incubação artificial dos ovos .....</b>	<b>18</b>
<b>2.2. Delineamento experimental e exposição aos agrotóxicos .....</b>	<b>19</b>
<b>2.3. Biomarcadores de toxicidade .....</b>	<b>20</b>
<b>2.3.1. Teste do micronúcleo e outras anormalidades nucleares eritrocitárias.....</b>	<b>20</b>
<b>2.3.2. Ensaio cometa.....</b>	<b>20</b>
<b>2.3.3. Processamento de imagem e morfometria eritrocitária .....</b>	<b>21</b>
<b>2.4. Análises estatísticas .....</b>	<b>22</b>
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>22</b>
<b>4. DISCUSSÃO.....</b>	<b>26</b>
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>29</b>
<b>6. AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>30</b>
<b>7. CUMPRIMENTO DAS NORMAS ÉTICAS .....</b>	<b>30</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>30</b>

## LISTA DE FIGURA

**Figura 1.** (A-K) Fotomicrografias representativas das anormalidades nucleares eritrocitárias identificadas em *Podocnemis expansa* expostas a diferentes pesticidas. (L) Frequência total de anormalidades nucleares eritrocitárias em *P. expansa* expostas ou não aos pesticidas glifosato, atrazina e fipronil em diferentes concentrações. Em “L”, as barras indicam a média + erro padrão. Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais. (H) representa a frequência de anormalidade nucleares e (p) significância. Gly: glifosato; Fip: fipronil e Atra: atrazina.....23

**Figura 2.** (A-E) Medidas morfométricas dos eritrócitos de *Podocnemis expansa* expostas ou não aos diferentes pesticidas avaliados. (A) Área eritrocitária, (B) razão “área nuclear/área eritrocitária”, (C-D) circularidade aferida nos eritrócitos e nos núcleos, respectivamente. (E-F) Fotomicrografias representativas dos eritrócitos não alterados de *Podocnemis expansa* (E) e com alterações no tamanho e na forma (F). Em “A-D”, as barras indicam a média + erro padrão. Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais. Os dados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dun’s, a 5% de probabilidade. Gly: glifosato; Fip: fipronil e Atra: atrazina.....25

## LISTA DE TABELA

**Tabela 1.** Frequência de micronúcleos e de outras anormalidades nucleares eritrocitárias evidenciadas em recém-eclodidos de *Podocnemis expansa* expostos a diferentes agrotóxicos. ....22

**Tabela 2.** Parâmetros avaliados no ensaio cometa em recém-eclodidos de *Podocnemis expansa* expostos a diferentes agrotóxicos. ....24

---

# EFEITOS TOXICOLÓGICOS DA CONTAMINAÇÃO POR AGROTÓXICOS EM RECÉM-ECLODIDOS DE *Podocnemis expansa* (Testudines: Podocnemididae)

## RESUMO

Os efeitos danosos dos agrotóxicos glifosato (Gly), atrazina (Atra) e fipronil (Fip) são conhecidos em diferentes organismos, porém os potenciais mutagênico, genotóxico e morfotóxico em eritrócitos de Testudines de água doce é pouco estudado. Assim, objetivou-se avaliar os potenciais toxicológicos desses compostos em recém-eclodidos de *Podocnemis expansa* (tartarugas-da-amazônia) nascidos de ovos incubados artificialmente em substrato com diferentes concentrações dos herbicidas Gly e Atra e do inseticida Fip. O teste do micronúcleo e outras anormalidades nucleares, ensaio cometa e medidas morfométricas de eritrócitos circulantes dos animais foram utilizados como biomarcadores de toxicidade. Os recém-eclodidos expostos aos grupos Gly-65 ppb e Gly-6500 ppb apresentaram maior frequência de eritrócitos com núcleo multilobulado. Para os grupos Atra-2 ppb e Gly-65 ppb as anormalidades núcleo entalhado e núcleo deslocado foram as mais frequentes. Além disso, observou-se que em Gly-6500 ppb, Atra-2 ppb, Atra-200 ppb, Fip-4 ppb e Fip-400 ppb, com exceção do grupo Gly-65 ppb, induziram diminuição da área eritrocitária, aumento da relação “área nuclear: área eritrocitária” e diminuição da circularidade dos eritrócitos e seus núcleos, o que indica claro efeito sobre o tamanho e forma dessas células. Por outro lado, no ensaio cometa não se observou evidências sugestivas de efeito genotóxico dos pesticidas. No entanto, concluiu-se que as concentrações de glifosato, atrazina e fipronil permitidas pela legislação ambiental brasileira causam morfotoxicidade eritrocitária e efeito aneuploidogênico, sem efeito genotóxico identificado pelo ensaio cometa. A ausência de efeitos genotóxicos identificados pelo ensaio cometa possivelmente é explicada pela longa exposição aos agrotóxicos. Os longos períodos de exposição podem elevar os danos genotóxicos, causando morte celular. Assim como muitos outros, este estudo comprova a ação danosa do glifosato, atrazina e fipronil à biota, contudo, além destes, diversos pesticidas são prejudiciais, muitos dos quais se tem pouco ou nenhum conhecimento dos impactos lesivos ao meio ambiente, e a própria vida humana, a longo prazo.

**Palavras-chave:** Agrotóxicos, genotoxicidade, morfotoxicidade, mutagenicidade, pesticidas, toxicologia.

---

# TOXICOLOGICAL EFFECTS OF PESTICIDE CONTAMINATION IN NEWLY HATCHED OF *Podocnemis expansa* (Testudines: Pocnemididae)

## ABSTRACT

The damaging effects of the pesticides glyphosate (Gly), atrazine (Atra) and fipronil (Fip) are known in different organisms, however the mutagenic, genotoxic and morphotoxic potential in erythrocytes of freshwater Testudines is poorly studied. Thus, we aim to evaluate the toxicological potential of these compounds in puppies of *Podocnemis expansa* (Amazon turtles) hatched from eggs incubated artificially in substrate with different concentrations of the herbicides Gly and Atra and the insecticide Fip. The micronucleus test and other nuclear abnormalities, comet assay and morphometric measurements of the animals' circulating erythrocytes were used as biomarkers of toxicity.

Puppies exposed to Gly (groups Gly-65 ppb and Gly-6500 ppb) had a higher frequency of erythrocytes with multilobulated nucleus, for groups Atra-2 ppb and Gly-65 ppb the notched and displaced nucleus abnormalities were the most frequent. In addition, it was observed that all treatments (Gly-6500 ppb, Atra-2 ppb, Atra-200 ppb, Fip-4 ppb and Fip-400 ppb), with the exception of the Gly-65 ppb group, induced a decrease in the erythrocyte area, increase in the “nuclear area: erythrocyte area” ratio and decrease in the circularity of erythrocytes and their nuclei, which indicates a clear effect on the size and shape of these cells. On the other hand, in the comet assay there was no evidence suggestive of the genotoxic effect of pesticides. In conclusion, this study pioneered the mutagenic, genotoxic and morphotoxic potential of pesticides in puppies of *P. expansa* exposed in ovo to Gly, Atra and Fip, which constitutes how these compounds can affect the health of these animals.

**Keywords:** Testudines, pesticides, toxicology, mutagenicity, genotoxicity, morphotoxicity.

## 1. INTRODUÇÃO

A região do Cerrado concentra áreas de grande diversidade de solos, geomorfologia, condições climáticas e fitofisionomias para o cultivo da soja, do milho e do algodão (SILVA ET AL. 2006). No entanto, este domínio morfoclimático possui áreas de grande endemismo e está incluído entre os 36 "hotspots" mundiais (MYERS ET AL. 2005, WILLIAMS ET AL., 2011; NOSS ET AL., 2015; CEPF, 2016). O Cerrado apresenta aproximadamente um terço da biota brasileira, com riqueza mínima estimada de 320 mil espécies (DIAS 1996). Existem 837 espécies de aves, 161 de mamíferos, 150 de anfíbios e 120 de répteis (MYERS ET AL. 2000). Entre os invertebrados há a estimativa de 90 mil espécies de insetos (DIAS 1996). As plantas vasculares do Cerrado possuem a maior taxa de endemismo (44%), seguida pelos anfíbios (30%), répteis (20%) (MYERS ET AL. 2000), aves (11%) (MACEDO 2002) e mamíferos (9,3%) (MARINHO-FILHO ET AL. 2002).

No Brasil há um dissenso que circunda o debate sobre a necessidade de expansão da fronteira agrícola e os riscos para a conservação da biodiversidade natural existente por todo o território nacional. Goiás, até a década de 1960 apresentava baixos níveis de produtividade com as práticas tradicionais utilizadas na agricultura, incluindo as técnicas de cultivo inapropriadas aos solos do Cerrado. BEZERRA & CLEPS JR (2004) verificaram que somente a partir da década de 1970 o desenvolvimento agrícola de toda a região Centro-Oeste foi intensificado e diretamente vinculado à concretização da fronteira agrícola. Segundo os dados do Censo Agropecuário do IBGE (2000), Goiás concentra a maior parte da produção de grãos e as atividades pecuárias altamente modernizadas, é o quarto produtor de grãos no Brasil, com 9,2 milhões de toneladas, contribuindo com 8,98% na produção nacional e possui também o terceiro maior rebanho de bovinos de corte do país.

A pressão exercida pelo agronegócio sobre a fauna e flora, traduzida em destruição de habitats naturais essenciais à manutenção das espécies, desmatamento, introdução de espécies exóticas, poluição por agrotóxicos, erosão dos solos e destruição de rios e nascentes, são fatores determinantes para o processo de perda de biodiversidade do Cerrado, (WWF, 2000).

As estratégias de ocupação e avanço agrícola da região Centro-Oeste, possibilitadas em boa parte pelos programas governamentais (PNDs, POLO-CENTRO, PRODECER, etc.), não demonstraram ter levado em consideração a possibilidade de destruição do Cerrado, tampouco se pautaram em uma gestão sustentável dos recursos naturais por meio da implementação de áreas prioritárias para a conservação deste bioma, de monitoramentos e ampla publicidade da situação da biodiversidade, nem de medidas eficazes para conter os evidentes impactos adversos sobre o ecossistema da região (LONDRES, 2011).

Os agrotóxicos são compostos manufacturados resistentes à degradação biótica ou abiótica utilizados na agricultura para prevenir ou reduzir a ação dos efeitos nocivos de pragas (HOSHI, 2009; CARVALHO ET AL. 2011). O Programa Nacional de Defensivos Agrícolas, no âmbito do II Plano Nacional de Desenvolvimento estimulou na década de setenta a produção e consumo de insumos agrícolas no Brasil (LONDRES, 2011). O país é um dos maiores produtores de alimentos, madeira, biocombustíveis e algodão, com a adesão ao Sistema Nacional de Crédito Rural (SNCR) tornou-se um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo (VALDES, 2010; SCHIESARI ET AL. 2013). Os herbicidas são agrotóxicos bastante utilizados durante o combate a plantas invasoras na agricultura brasileira (IBAMA, 2010), apresentam solubilidade em água e alta susceptibilidade nos impactos em ecossistemas aquáticos (HARTLEY ET AL. 2001; VALDES, 2010).

O glifosato é o princípio ativo da formulação comercial de diversos herbicidas (IBAMA, 2009). Este composto é bioacumulável e degradado por microorganismos, porém apresenta persistência variável no ambiente. É considerado tóxico para organismos aquático, pouco tóxico para organismos do solo, aves e abelhas (NEWTON ET AL. 1994). Formulações de glifosato têm sido utilizadas na agricultura convencional, viticultura, manejo florestal, jardinagem e restauração de habitats (DILL ET AL. 2010). De acordo com ZHANG ET AL. (2019), o uso do glifosato tem crescido nas últimas décadas, devido a fatores que incluem a introdução de colheitas geneticamente modificadas resistentes ao composto e à maior permissividade das agências regulamentadoras, aumentando os níveis de resíduos permitidos.

A atrazina (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina) é extensivamente utilizada em países como Argentina, Estados Unidos e Brasil no controle de ervas daninhas de folhas largas, sobretudo em culturas de milho e cana-de-açúcar (EPA, 2019). Por outro lado, o fipronil é um inseticida de segunda geração altamente eficiente e amplamente utilizado em produtos veterinários para o controle de pragas e ectoparasitas em animais domésticos, incluindo aqueles resistentes aos inseticidas piretróides, organofosforados e carbamatos (KIDD & JAMES 1991; TINGLE ET AL. 2003; SIMON-DELSO ET AL., 2015).

No Brasil, as combinações entre os herbicidas e inseticidas não são regularizadas, no entanto são comumente utilizados para reduzir custos de produção e para aumentar a eficiência no controle de pragas (GUIMARÃES, 2014; FIGUEIREDO, 2015). As interações químicas entre os pesticidas induzem alterações nas propriedades físico-químicas e no comportamento das moléculas e podem causar impactos sobre o meio ambiente e à saúde humana, embora, os agrotóxicos possam fornecer benefícios e vantagens para o desenvolvimento da sociedade, seu uso intensivo e descontrolado tem provocado efeitos irreversíveis sobre o ambiente natural (GUIMARÃES, 2014; FIGUEIREDO, 2015).

Vários estudos têm denunciado os impactos desses compostos sobre espécies de invertebrados (LINDSAY & FRENCH, 2004; PISA ET AL., 2015; WECH ET AL., 2018), de vertebrados (HAYES ET AL., 2011; GIBBONS ET AL., 2015; GILL ET AL., 2018), de microrganismos (DELORENZO ET AL., 2001) e espécies vegetais nativas de vários biomas de importância mundial (DALTON & BOUTIN, 2010; FLORENCIA ET AL., 2017; CEDERLUND ET AL., 2017). De acordo com os estudos citados acima, há evidências de que o uso desses produtos químicos também pode contribuir para o declínio populacional de várias espécies, representando uma ameaça à sobrevivência e permanência nos habitats naturais.

O efeito negativo dos agrotóxicos sobre a biota não é equitativo entre os diferentes grupos de seres vivos. O conhecimento sobre os efeitos danosos provocados pelo glifosato, atrazina e fipronil nos peixes (2008; NWANI ET AL., 2010; LORO ET AL., 2015; ZHANG ET AL., 2018), anfíbios (WILHELMS ET AL., 2005; SHEHATA ET AL., 2013; REINDL ET AL., 2015) e mamíferos (KARTHEEK & DAVID, 2018) é muito superior àquele voltado para os répteis (HOPKINS, 2000). Parte disso, pode ser explicado pela falta de inclusão desses animais em processos de avaliações da admissão de agrotóxicos, conforme orientações da United States Environmental Protection Agency (EPA, 2019), World Health Organization (WHO, 2010; WHO, 2019) e da European Food Safety Authority (EFSA, 2009).

Bioensaios de genotoxicidade e mutagenicidade são utilizados em estudos toxicológicos para detectar alterações fisiológicas sobre as estruturas, o crescimento, o comportamento e a reprodução do organismo (SARKAR ET AL. 2006). São capazes de avaliar o efeito de diferentes contaminantes nos altos níveis de organização biológica (LAM; GRAY, 2003). Podem ser utilizados de forma preditiva em estudos de biomonitoramento ambiental, permitindo que sejam tomadas ações de biorremediação antes que ocorram danos ecológicos severos (CAJARAVILLE ET AL. 2000; FUENTES-RIOS ET AL. 2005; MONSERRAT ET AL. 2007).

Xenobióticos de ação genotóxica e/ou mutagênica interagem quimicamente com o material genético promovendo quebras na molécula de DNA, contudo, esses danos podem ser reparados pelo próprio organismo, caso contrário a célula é eliminada, quando isso não ocorre, há mutação, pois a lesão é fixada na célula podendo se perpetuar nas células filhas durante o processo de replicação (OBE ET AL. 2004; WHITE & RASMUSSEN, 1998). As mutações geralmente são induzidas por agentes físicos, químicos ou biológicos (CALVIELLO ET AL. 2005).

A princípio desenvolvido para detectar efeitos genotóxicos em mamíferos, o Ensaio Cometa mostrou-se eficiente na percepção de substâncias genotóxicas em organismos do meio aquático. Este teste também demonstrou amplo emprego na área clínica em estudos de reparo ao DNA no biomonitoramento ambiental e no monitoramento humano. O princípio desta técnica se baseia no fato

de que o DNA da célula que não tiver dano migrará em conjunto formando um círculo. Os fragmentos menores tendem a migrar mais rapidamente do que os maiores. O dano ao DNA provocado por um agente genotóxico pode acarretar a formação de fragmentos de diversos tamanhos e esses fragmentos quando expostos a uma corrida eletroforética migrarão em velocidades diferentes, formando-se então a figura típica de um cometa (OLIVE; BANÁTH; DURAND, 1990; COLLINS ET AL. 2008).

O Teste do Micronúcleo é amplamente utilizado para detecção de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos), e de agentes aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal) (MACGREGOR ET AL. 1987; HAYASHI ET AL. 1994). É recomendado para a avaliação do potenciais mutagênicos de agentes físicos e químicos, para o registro de novos produtos químicos que entram no mercado mundial (RIBEIRO, 2003), no biomonitoramento de populações humanas ocupacionalmente expostos a agentes mutagênicos (MACHADO-SANTELLI ET AL. 1994; MAJER ET AL. 2001; LAFFON ET AL. 2002; BOLOGNESI ET AL. 2004) na pesquisa de compostos inibidores de carcinogênese (ROY ET AL. 2003; IZZOTTI ET AL. 2001) e em estudos toxicológicos (GAUTHIER ET AL. 1999; LORENTE ET AL. 2002).

Devido sua interação com o meio ambiente e sua facilidade de absorção e acumulação de compostos xenobióticos, os bioindicadores de qualidade ambiental são utilizados em estudos de avaliação de impacto ambiental (YOUNES, 2000). A resposta de cada organismo ao impacto ambiental é fortemente influenciada por suas condições fisiológicas, morfológicas estruturais e nutricionais assim como pelas condições físicas, químicas e biológicas do ambiente (temperatura, umidade, ventos e radiação) (MARTELETO, 2004; LOMÔNACO, 2004; KERR, 2004).

Entre os bioindicadores na investigação dos efeitos de substâncias lançadas no ambiente para estudos sobre os potenciais teratogênicos de substâncias tóxicas estão os répteis (BELL, 2006; SPOTILA, 2006; CONGDON, 2006), dentre esses, os Testudines estão entre os animais mais ameaçados do mundo (BONIN, 2006; DEVAUX, 2006; DUPRE, 2006). O Brasil possui 36 espécies distribuídas nos seus mais diversos ecossistemas aquáticos e terrestres, sendo 29 espécies de água doce, duas terrestres e cinco marinhas (COSTA & BÉRNILS, 2018).

Há relutância no uso dos répteis em estudos toxicológicos, provavelmente decorrente das características da história natural desses animais (HOPKINS, 2000). Ao contrário da maioria das espécies-modelo em toxicologia, os répteis não produzem proles numerosas em intervalos curtos e muitas vezes são considerados difíceis de serem mantidos em laboratório (HOPKINS, 2000). Apesar disso, a necessidade de identificar as espécies e populações de répteis que podem entrar em contato com agrotóxicos é indiscutível, assim como conhecer os potenciais efeitos desses compostos sobre os indivíduos e populações. Os estudos toxicológicos que envolve o grupo dos répteis são essenciais para

identificar as espécies vulneráveis à exposição aos agrotóxicos, fornecendo subsídios científicos importantes para a proposição de práticas de conservação das espécies (MINGO ET AL. 2016).

A espécie *Podocnemis expansa* (SCHWEIGGER, 1812) é popularmente conhecida como tartaruga-da-amazônia, tartaruga-verdadeira, aráu ou jurará-açu (LUZ, 1998; REIS, 1998) é considerada o maior Testudine de água doce do Brasil. Está inserida na família Chelidae, subfamília Podocnemididae, juntamente com outras 04 espécies, *Peltocephalus dumerilianus* (SCHWEIGGER, 1812), *Podocnemis erythrocephala* (SPIX, 1824), *Podocnemis sextuberculata* (CORNALIA, 1849) e *Podocnemis unifilis* (TROSCHER, 1848) (COSTA & BÉRNILS, 2018). A espécie *P. expansa*, assim como todos os representantes da ordem, apresentam a carapaça como instrumento de defesa e fuga dos predadores. Alimentam-se de frutos, raízes, folhas e sementes, bem como moluscos, crustáceos e alguns peixes (IBAMA, 1989).

Essa espécie é caracterizada por apresentar baixa capacidade de crescimento populacional, alta longevidade e maturidade sexual tardia (POUGH ET AL., 2003). São alvos de caça predatória para exploração da carne e ovos, sobretudo por populações ribeirinhas (CARVALHO, 1995; SANTOS ET AL., 2003). Esta espécie chega a medir 107 cm de comprimento de carapaça e 90 kg de massa corporal (PRITCHARD, 1979). Pode ser encontrada em rios e lagos e na época de cheia, indivíduos de todas as faixas etárias vão para áreas alagadas a procura de alimento (MOLINA, 1996). No período de seca, juvenis e subadultos tendem a permanecer nesses locais, enquanto os indivíduos adultos retornam aos rios (VOGT, 2008). O desenvolvimento desses animais é influenciado pela temperatura, trocas gasosas e hídricas (POUGH, 2008; HEISER, 2008; JANER, 2008). Sabe-se ainda que a própria determinação sexual depende de tais condições (MALVASIO, 2001).

Diante do avanço agrícola e do aumento do consumo de agrotóxicos nos últimos anos, os estudos sobre os efeitos tóxicos dos agrotóxicos em répteis, especialmente àqueles de vida aquática estão tornando-se cada vez mais escassos. O objetivo deste estudo foi avaliar através da investigação mutagênica e genotóxica os possíveis danos da exposição de recém-eclodidos de *P. expansa* aos agrotóxicos glifosato, atrazina e fipronil.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Coleta e incubação artificial dos ovos**

Os ovos de *Podocnemis expansa* foram coletados em período de desova na área de reprodução localizada nas praias da Área de Proteção Ambiental Meandros do Rio Araguaia (GO, Brasil) (13° 20' 38" S e 50° 38' 05" W), adotando-se os critérios de coleta descritos em Hirano et al. (2019). Após a coleta, os ovos foram acondicionados em sacos plásticos com vermiculita umedecida com água na

proporção de 2:1 v/v e transportados imediatamente ao Laboratório de Pesquisas e Ensino em Animais Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (LAPAS/FAMEV/UFU, MG, Brasil) para incubação artificial. Todos os procedimentos realizados na pesquisa foram previamente aprovados pela Comissão de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA/UFU protocolo nº 039/18,) com licença do SISBIO/RAN/ICMBio (nº 65167-1/2018).

A incubação artificial dos ovos de *P. expansa* foi realizada conforme procedimentos descritos em HIRANO ET AL. (2019). Os ovos foram acondicionados em bandejas plásticas de 30 cm x 50 cm x 10 cm (comprimento x largura x altura), utilizando como substrato areia advinda do local de coleta dos ovos. Essas bandejas foram introduzidas em incubadoras controladas por termostato acoplado a duas lâmpadas de 15W. A temperatura e a umidade relativa foram avaliadas de três em três dias com termohigrômetro digital e mantidas entre 28° e 31°C e entre 80 e 100%, respectivamente. Dos 49 ovos incubados, foram utilizados 35 recém-eclodidos.

## **2.2. Delineamento experimental e exposição aos agrotóxicos**

Visando simular a contaminação de bancos de areia utilizados na reprodução das *Podocnemis expansa*, misturou-se aos substratos de incubação, diferentes concentrações dos formulados comerciais de glifosato (Glifosato Atar 48®, registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, Brasil) n. 06205, Albaugh Agro Brasil Ltda, Resende, RJ, Brasil), fipronil (Reagent® 800 WG, registro MAPA n. 005794, BASF S.A., São Paulo, SP, Brasil) e atrazina (Atrazina Nortox 500 SC®, registro MAPA n. 00596, Nortox S/A, Arapongas, PR, Brasil) diluídos em água destilada. Para cada agrotóxico, duas concentrações foram avaliadas, sendo que as concentrações de glifosato e atrazina foram determinadas a partir dos limites máximos aceitos para a contaminação de águas superficiais no Brasil, de acordo com o Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) resolução n. 357/2005 e n. 20/1986. Já as concentrações de fipronil foram estabelecidas de acordo com os valores encontrados na literatura para a Concentração Letal Média (CL<sub>50</sub>) para peixes, já que não se tem tais valores para répteis e não há limites de detecção desse composto estabelecido na legislação brasileira.

Conforme destacado por HIRANO ET AL. (2019), em condições naturais os ovos de *P. expansa* são depositados em ninhos estabelecidos na areia, cujas águas constituem a principal fonte de contaminação dos ovos. Assim, os ovos foram distribuídos em seis grupos experimentais, mais um controle, totalizando sete grupos. Os substrato de incubação continhm glifosato nas concentrações de 65 ou 6500 partes por bilhão (ppb) (grupos Gly-65 e Gly-6500, respectivamente), atrazina nas concentrações de 2 ou 200 ppb (grupos Atra-2 e Atra-200, respectivamente) e fipronil à 4 ou 400 ppb (grupos Fip-4 e Fip-400, respectivamente), a diluição dos agrotóxicos foi realizada em água destilada.

O controle negativo (CN) foi incubado em substrato isento de qualquer poluente e umedecidos apenas com água destilada. Foi utilizado o mesmo volume de soluções contaminantes em todos os tratamentos, a fim de assegurar umectação equitativamente dos substratos.

O dia de acomodação dos ovos nas caixas de incubação foi considerado dia 0. A exposição dos ovos aos agrotóxicos compreendeu o período do início da incubação até a eclosão de todos os recém-eclodidos e visou simular uma possível contaminação em ambiente natural, visto que a água contaminada do rio seria absorvida pela areia das praias, umedecendo os ninhos. As soluções contaminantes foram repostas a cada três dias nos substratos, de modo a manter a umidade ideal ao longo da incubação. A incubação dos ovos durou 59 dias e, após o período de eclosão, os recém-eclodidos foram mantidos em piscinas com água durante dez dias.

### **2.3. Biomarcadores de toxicidade**

#### **2.3.1. Teste do micronúcleo e outras anormalidades nucleares eritrocitárias**

O teste do micronúcleo/outras anormalidades foi realizado de acordo com os procedimentos adotados por ARAÚJO ET AL. (2019) E MESAK ET AL. (2019), com modificações. Inicialmente, os recém-eclodidos de *P. expansa* foram anestesiados [seguindo os critérios propostos pela American Society of Ichthyologists and Herpetologists (ASIH, 2004)] e, por meio de uma agulha de seringa esterilizadas (30G 1/2",  $\varnothing$ : 0,3 mm e 13 mm comprimento), procedeu-se a coleta de 30  $\mu$ L de sangue periférico no seio occipital, como descrito por Olson et al. (1975). Em seguida, foram realizados esfregaços sanguíneos em lâminas previamente higienizadas (duas lâminas por animal – n=10/grupo), as quais foram fixadas em metanol frio a 100% (v/v) (Dinâmica<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil) por 10 minutos e coradas com Panótico Rápido<sup>®</sup> (Laborclin<sup>®</sup>, Paraná, Brasil). Posteriormente as lâminas foram analisadas em microscópio óptico com lente de imersão. Foram analisados 4000 eritrócitos circulantes por indivíduo, sendo contados (2,000/lâmina). As análises foram realizadas de maneira aleatória e não foram considerados eritrócitos sobrepostos.

#### **2.3.2. Ensaio cometa**

O ensaio cometa foi realizado utilizando o método alcalino, conforme procedimentos descritos em SINGH ET AL. (1988), POLETTA ET AL. (2009) E ZAPATA ET AL. (2016), com modificações. As amostras de sangue periférico (10  $\mu$ L) colhidas foram diluídas em 1:19 (v/v) com soro fetal bovino. As lâminas foram preparadas (duas por amostra) com 15  $\mu$ L de suspensão de células diluídas em 120  $\mu$ L de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%) a 37°C, com posterior submersão em solução de lise (Triton X-100, DMSO e solução de lise estoque) durante 24 h a 6°C e mantidas protegidas da luz.

Em seguida, as lâminas foram para eletroforese a 300 mA e 25 V (0.90 V/cm) durante 25 minutos sob ausência de luminosidade [adaptado de Poletta et al., (2008)]. Para averiguar as condições da eletroforese, foram incluídas lâminas de controle negativo em cada corrida eletroforética. Os dados só foram considerados quando os controles apresentaram resultados negativos. Após a eletroforese, as lâminas foram colocadas em tabuleiro de coloração, coberto com um tampão de neutralização (0,4 M, Tris-HCl, pH 7,5) e mantidas no escuro durante 5 min.

Para a análise, as lâminas foram coradas com SYBR™ Green (10ug/mL) e cobertas com uma lamínula. Foram analisados 50 nucleoides por lâmina, totalizando 100 núcleos por amostra. A análise foi realizada por um sistema de microscopia de fluorescência Axioplan-Imaging®, utilizando o software Comet Imager 2.2, com um filtro de excitação de 510-560 nm e um filtro barreira de 590 nm, em aumento de 200x. Para avaliação dos danos no DNA utilizamos o “Open comet” plugin no ImageJ software, ferramenta de código aberto que fornece análise automatizada de imagem de cometas, conforme procedimentos descritos em GYORI ET AL. (2014).

Os parâmetros utilizados para avaliação dos danos causados no DNA foram (i) comprimento da cauda (CC), (ii) porcentagem de DNA na cauda (%DNA) e (iii) momento de cauda Olive (MCO), conforme descrito por Collins (2004).

### **2.3.3. Processamento de imagem e morfometria eritrocitária**

Para avaliação morfométrica dos eritrócitos também foi utilizado o software ImageJ 1.52av. (<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>) (BAVISKAR, 2011; SCHNEIDER ET AL., 2012). Para isso, duas fotomicrografias aleatórias dos campos de visão (em aumento de 40x) de cada lâmina/espécime foram obtidas, totalizando 20 imagens por grupo experimental, semelhantemente à metodologia adotada por ARAÚJO ET AL. (2019) E ACHARYA & MOHANTY (2019). Em síntese, as imagens foram abertas no software ImageJ e convertidas para 8-bit (escala cinza) e sujeitadas ao formato automático limiar, na qual converte imagens na escala cinza no modo binário (preto e branco) usando um valor de corte estabelecido por algoritmos.

Os artefatos foram eliminados e utilizando o comando "analisar partículas" em ImageJ, foram identificadas e contadas as partículas limiaries (no presente estudo, ilhas de pixels pretos). Esse procedimento foi realizado para as análises dos eritrócitos e dos núcleos. Em cada campo de análise (i.e., em cada imagem) 30 eritrócitos foram medidos (totalizando 600 células/grupo experimental). As variáveis morfométricas registradas foram: área dos eritrócitos e dos respectivos núcleos; razão entre a área nuclear e eritrocitária (núcleo:eritrócito) e circularidade (dos eritrócitos e núcleos). Essa última é dada por  $4\pi A/p^2$ , onde A é a área da forma e P é o perímetro. O valor de A indica um círculo perfeito. Quanto mais próximo de 0 o valor, mais alongado é o polígono (BISCHIN ET AL., 2012).

## 2.4. Análises estatísticas

O teste Shapiro-Wilk e Levene foram utilizados para testar a normalidade e homocedasticidade dos dados, respectivamente. Por não atenderem os pressupostos da ANOVA, os dados foram submetidos ao teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dun's a 5% de probabilidade. As figuras foram elaboradas no GraphPad Prism software (version 7.00). As análises estatísticas foram realizadas no software BioEstat 5.0 (AYRES ET AL. 2007).

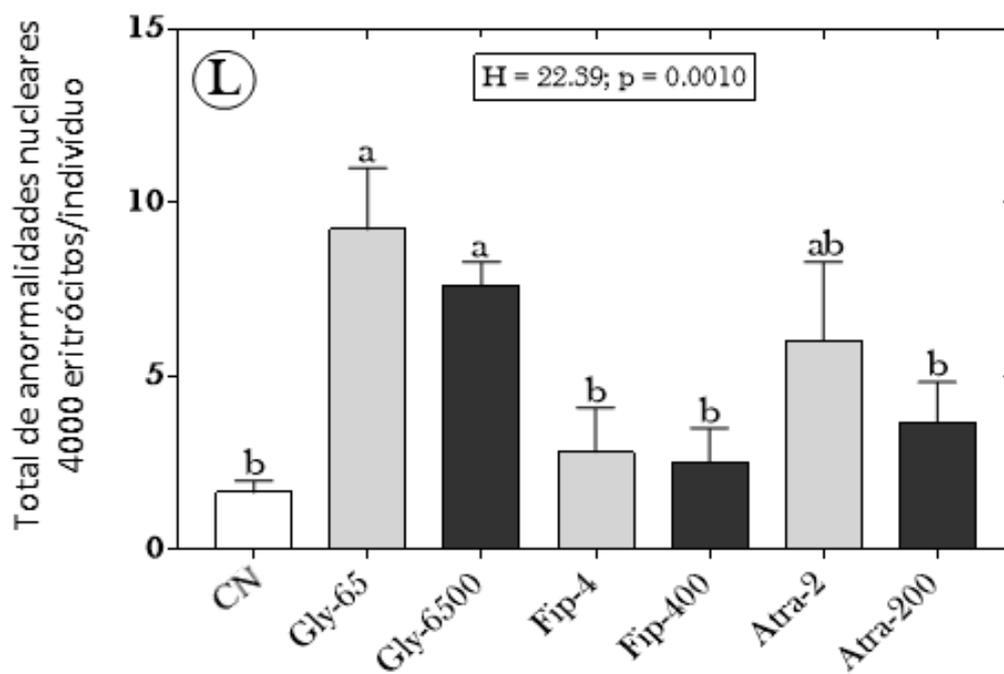
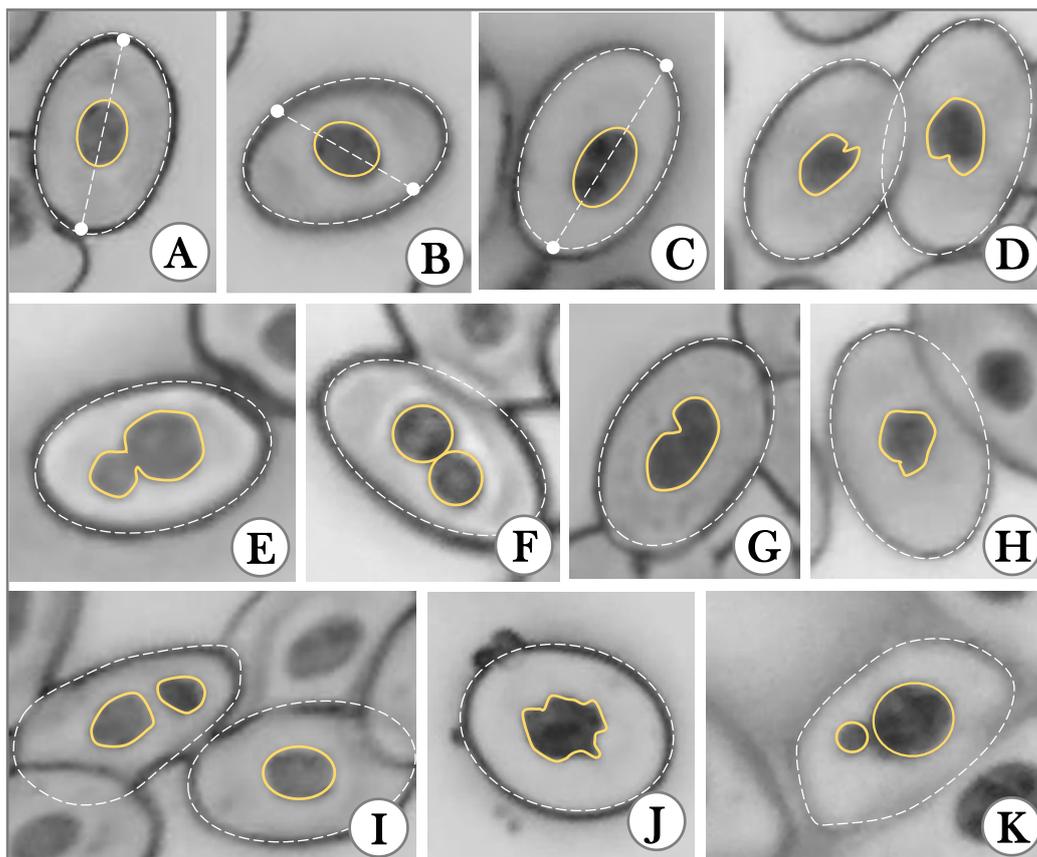
## 3. RESULTADOS

Não foram evidenciadas diferenças entre a frequência de micronúcleos nos grupos experimentais ( $H = 2,3119$ ;  $p = 0,80$ ); mas, outras anormalidades nucleares eritrocitárias foram identificadas nos tratamentos (Figura 1A-K). Nos grupos de *P. expansa* expostos ao glifosato (grupos Gly-65 e Gly-6500 ppb) e à atrazina (Atra-2 ppb) houve maior frequência de núcleos multilobulados ( $H = 13,1352$ ,  $p = 0,04$ ), deslocados ( $H = 26,1880$ ,  $p = 0,0002$ ) e entalhados ( $H = 15,1904$ ,  $p = 0,01$ ), quando comparadas ao grupo controle (Tabela 1). Os grupos expostos ao glifosato apresentaram maior número de anormalidades nucleares, conforme observado na Figura 1L.

**Tabela 1.** Frequência de micronúcleos e de outras anormalidades nucleares eritrocitárias evidenciadas em recém-eclodidos de *Podocnemis expansa* expostos a diferentes agrotóxicos.

Micronúcleo e outras anormalidades nucleares	Média ± desvio padrão de acordo com os tratamentos						
	Controle	Glifosato		Atrazina		Fipronil	
	0 ppb	65 ppb	6500 ppb	2 ppb	200 ppb	4 ppb	400 ppb
Eritrócitos micronucleados	0.00±0.00	0.33±0.50	0.30±0.48	0.20±0.42	0.00±0.00	0.10±0.32	0.17±0.39
Núcleos com brotamento	0.73±0.79	2.00±2.29	2.30±1.70	2.00±2.98	1.00±1.00	1.00±1.94	0.58±1.51
Constricção simétrica	0.09±0.30	0.33±0.50	0.00±0.00	0.20±0.63	0.00±0.00	0.10±0.32	0.00±0.00
Constricção assimétrica	0.18±0.60	0.22±0.44	0.00±0.00	0.30±0.48	0.11±0.33	0.20±0.42	0.25±0.62
Eritrócitos binucleados	0.27±0.65	0.11±0.33	0.10±0.32	0.50±0.30	0.67±1.12	0.00±0.00	0.25±0.62
Núcleos reniformes	0.09±0.30	0.11±0.33	0.00±0.00	0.80±1.03	0.22±0.67	0.30±0.48	0.08±0.29
Núcleos multilobados	0.00±0.00	1.22±1.39*	0.10±0.32	3.80±4.59*	0.22±0.44	0.00±0.00	0.00±0.00
Eritrócitos com núcleo deslocado	0.27±0.47	4.11±3.06*	4.80±1.23*	3.80±4.59*	1.22±1.48	0.70±1.89	1.25±2.14
Núcleos entalhados	0.00±0.00	1.11±0.93*	0.30±0.48	1.20±1.40*	0.22±0.44	0.50±0.71*	0.08±0.29

\*Indica diferença significativa (Kruskal-Wallis, seguido pelo teste Dun's); ppb (parte por bilhão), em relação ao grupo controle.



**Figura 1.** (A-K) Fotomicrografias representativas das anormalidades nucleares eritrocitárias identificadas em *P. expansa* expostas a diferentes pesticidas. (L) Frequência total de anormalidades nucleares eritrocitárias em *P. expansa* expostas ou não aos pesticidas glifosato,

atrazina e fipronil em diferentes concentrações. Em “L”, as barras indicam a média + erro padrão. Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais. (H) representa a frequência de anormalidade nucleares e (p) significância. Gly: glifosato; Fip: fipronil e Atra: atrazina.

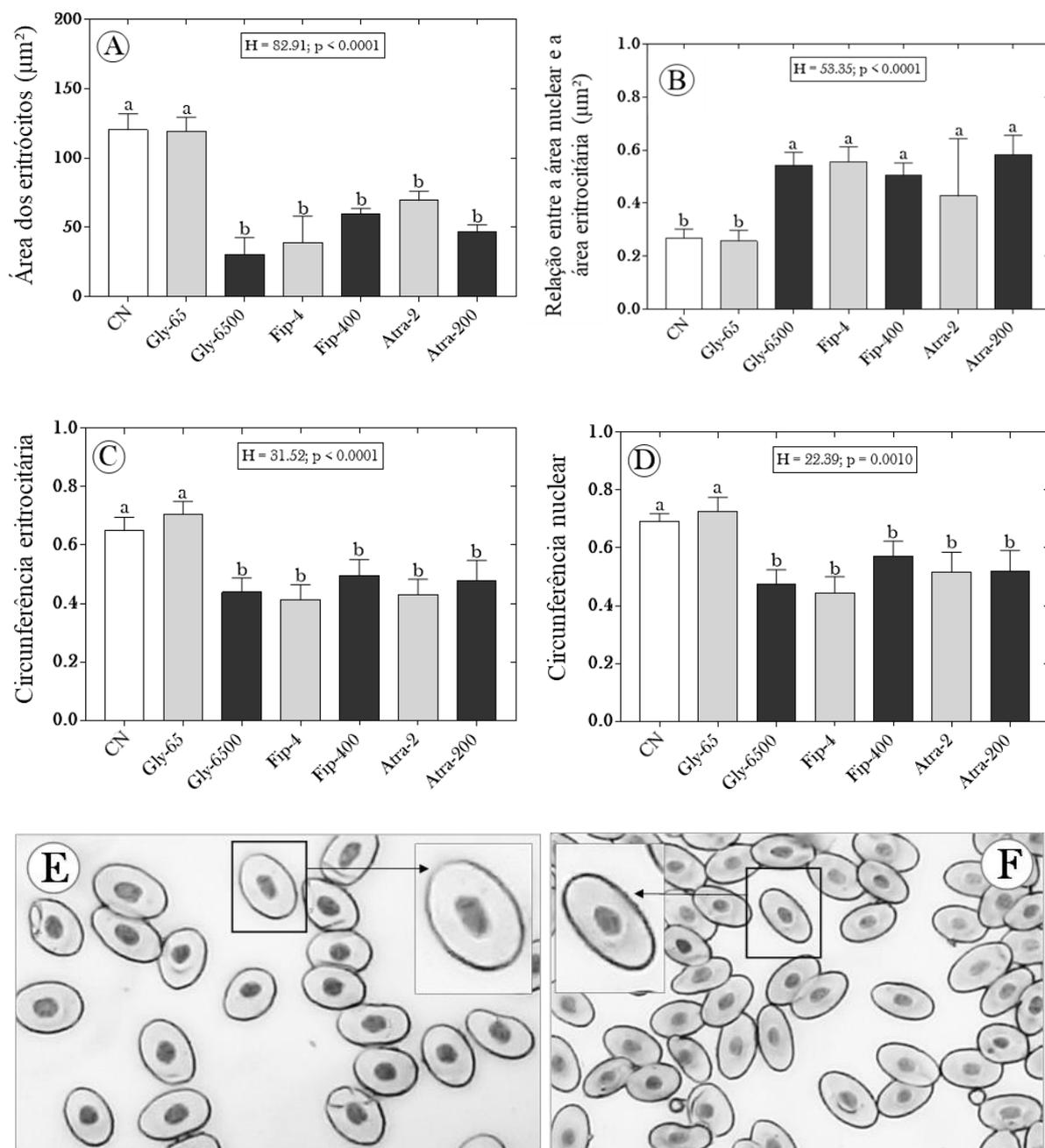
Não houve diferenças entre os tratamentos quanto aos parâmetros avaliados no ensaio cometa, comprimento da cauda (H = 9,925; p = 0,1279), %DNA na cauda (H = 5,619; p = 0,4671), e o momento da cauda de olive (H = 4,618; p = 0,5937) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Parâmetros avaliados no ensaio cometa em recém-eclodidos de *Podocnemis expansa* expostos a diferentes agrotóxicos.

Tratamentos	Concentrações	Média ± desvio padrão dos parâmetros do ensaio cometa		
		CC	MCO	%DNA
Controle	0 ppb	20.06±3.71	3.35±1.16	21.10±5.95
	2 ppb	21.00±7.37	3.40±1.42	22.39±8.88
Atrazina	200 ppb	25.30±14.54	5.74±3.07	33.99±8.79
	4 ppb	15.21±2.14	3.53±1.01	26.25±7.76
Fipronil	400 ppb	17.34±3.99	4.24±1.23	32.66±8.83
	65 ppb	19.35±3.73	4.06±1.58	29.35±12.04
Glifosato	6500 ppb	16.03±5.06	3.13±1.79	23.27±12.35

Legenda: ppb (parte por bilhão), CC (Comprimento da cauda), MCO (Momento da cauda de Olive) e %DNA (Porcentagem de DNA na cauda). One-way ANOVA, seguido pelo teste Tukey,  $p < 0,05$ .

Os parâmetros de morfometria eritrocitária apresentaram diferenças significativas entre os grupos experimentais, houve alterações no tamanho do núcleo e na forma dos eritrócitos. Com exceção do Gly-65 os eritrócitos das *P. expansa* dos demais tratamentos expressaram menores áreas citoplasmática (Figura 2A), bem como maior razão “área núcleo: área eritrócito” (Figura 2B), quando comparados aos animais do grupo controle. Além disso, houve (com exceção do glifosato a 65 ppb) uma redução na circularidade dos eritrócitos e de seus núcleos (Figura 2C-D), o que confirma alterações na forma dessas células. Uma visão representativa e comparativa entre os eritrócitos do grupo controle e aqueles que apresentaram alterações no tamanho e forma podem ser observados nas Figura 2E-F.



**Figura 2.** (A-E) Medidas morfométricas dos eritrócitos de *Podocnemis expansa* expostas ou não aos diferentes pesticidas avaliados. (A) Área eritrocitária, (B) razão “área nuclear/área eritrocitária”, (C-D) circularidade aferida nos eritrócitos e nos núcleos, respectivamente. (E-F) Fotomicrografias representativas dos eritrócitos de *P. expansa* não alterados (E) e com alterações no tamanho e na forma (F). Em “A-D”, as barras indicam a média + erro padrão. Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais. Os dados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dun’s, a 5% de probabilidade. Gly: glifosato; Fip: fipronil e Atra: atrazina.

#### 4. DISCUSSÃO

ALVAREZ-MOYA ET AL. (2014) ao estudarem a exposição de linfócitos humanos e de peixes a glifosato, observaram através de valores elevados do comprimento da cauda do cometa, a ação genotóxica desse herbicida, enquanto, SCHAUMBURG ET AL. (2016), notaram, durante a fase embrionária de *Salvator merianae* (Teiú), aumento de dano genotóxico e mutagênico ao serem expostos a concentrações subletais do Glifosato - Roundup Original®.

CARVALHO ET AL. (2018) evidenciaram através do ensaio cometa, aumento significativo de danos no DNA de *Dendropsophus minutus* (Pererequinha) expostos a doses baixas de glifosato, já RELYEA (2005) não observou danos no DNA de *Pseudacris crucifer* (Perereca) expostas a doses elevadas de glifosato - Roundup Original®. Os resultados encontrados pelos autores tornam críveis a hipótese de que a não detecção de danos pelo ensaio cometa no presente estudo decorra da intensidade elevada de agravos ao DNA das células expostas a altas doses de agrotóxicos. Nesse caso, os diminutos fragmentos do DNA se dispersam amplamente nas lâminas, não sendo possível visualizar o formato de um cometa. Análises voltadas aos mecanismos de proteção e/ou reparo do DNA nuclear eritrocitário podem auxiliar na compreensão da ausência de resposta genotóxica positiva (via ensaio cometa) nos animais expostos aos agrotóxicos, independente das concentrações testadas. Por outro lado, a avaliação da exposição dos animais à outras concentrações dos agrotóxicos podem ser úteis para testar a hipótese de que o efeito genotóxico nos Testudines seja intenso o suficiente para não ser detectado.

Possivelmente outros agrotóxicos podem ter comportamento semelhante em diferentes organismos. Embora no presente estudo não tenham sido detectados efeitos genotóxicos pelo ensaio cometa (Tabela 2) nos espécimes submetidos aos agrotóxicos utilizados nos tratamentos (glifosato, atrazina e fipronil), ponderando as observações de ALVAREZ-MOYA ET AL. (2014) E SCHAUMBURG ET AL. (2016) , é possível inferir que a ausência de resultados positivos no atual estudo para ação genotóxica, decorra do fato da exposição crônica aos agrotóxicos causar danos elevados no DNA celular, culminando na morte das células danificadas e assim impossibilitando a percepção da fragmentação do material genético, implicando provavelmente em falso negativo. No entanto para confirmar essa hipótese é mister a realização de estudos específicos à questão, os quais diferentemente do atual estudo, que realizou apenas controles negativos, devem considerar a realização tanto de controles negativos quanto de controles positivos, a fim de ter maior acurácia na interpretação dos resultados obtidos através do ensaio cometa.

Apesar de não terem sido notados efeitos genotóxicos através do ensaio cometa, foram detectados nos grupos Atra-2 e Gly-65, principalmente, eritrócitos com núcleos multilobulados, deslocados e

entalhados, cujas frequências individuais foram significativas em relação ao controle. Essas alterações estão comumente associadas a processos carcinogênicos e a impactos negativos na reprodução, crescimento e sobrevivência dos indivíduos afetados. A somatória das anormalidades nucleares referentes as exposições ao glifosato evidenciaram os fortes potenciais mutagênicos deste herbicida. Os processos biológicos em testudines podem ter sido afetados pela exposição crônica, especialmente ao glifosato e atrazina. Entretanto, pode-se inferir que a formação de micronúcleos nos grupos expostos ao glifosato, por exemplo, pode ter ocorrido predominantemente, no nível funcional do cinetócoro/fuso para induzir perda de cromossomos inteiros (aneuploidia), já que o efeito clastogênico dos tratamentos não foi evidenciado pelo ensaio cometa.

O glifosato pode ter ocasionado disfunção na segregação cromossômica durante o processo de divisão celular dos eritrócitos, sendo o micronúcleo constituído, por cromossomos que não migraram durante a anáfase resultando em efeitos aneugênicos, conforme relatado por DEGEN ET AL. (1997). Na ocasião, estes autores observaram que a maioria dos MNs formados eram cinetócoro-positivos, apontando para um efeito aneugênico da acratoxina. Certamente, uma análise minuciosa da região centromérica dos micronúcleos identificados no presente estudo será útil para confirmar essa hipótese (PINTO ET AL., 2010; THIERENS & VRAL, 2009; TERRADAS ET AL., 2010).

O deslocamento anormal do núcleo eritrocitário observado, especialmente nos indivíduos expostos ao glifosato e à atrazina, reforça a ação aneuploidogênica dos agrotóxicos. Tal alteração, embora pouco comum em réptil, já foi relatada em estudos prévios envolvendo neonatos de *P. expansa* expostos a nanopartículas de óxido de zinco (NPs ZnO) (ARAÚJO ET AL., 2019) e aves expostas a efluente de curtume (SOUZA ET AL., 2017; SAMPAIO ET AL., 2019). É possível que os danos encontrados tenham ocorrido nas proteínas ou nos mecanismos que formam os microtúbulos, microfilamentos e/ou filamentos intermediários, cujos mecanismos de ação dos agrotóxicos podem estar relacionados à excessiva produção de tipos reativos de oxigênio (ROS). A indução de estresse oxidativo pela exposição ao glifosato e atrazina é bem documentada em diferentes modelos animais, incluindo animais do grupo dos répteis, reforçando essa hipótese (2018; LAJMANOVICH ET AL., 2019; HUSSAIN ET AL., 2019; BALI ET AL., 2019; TURKMEN ET AL., 2019; BURELLA ET AL., 2019).

Outra evidência que reforça o efeito aneuploidogênico do glifosato e da atrazina refere-se à alta frequência de núcleos eritrocitários multilobulados (Figura 1J, Tabela 1). Conforme discutido por SERRANO-GARCÍA & MONTERO-MONTOYA (2001), agentes aneuploidogênicos são, por definição, produtos químicos que impedem a formação ou que promovem alterações do aparelho do fuso mitótico durante os processos de divisão celular. Portanto, esses agentes podem não apenas gerar cromátides inteiras que são deixadas de fora dos núcleos, formando, por exemplo, os micronúcleos,

mas também a formação de células multinucleadas, como observado neste estudo (Figura 1I, Tabela 1), nas quais cada núcleo conteria um número diferente de cromossomos. Já a presença de núcleos entalhados, núcleos segmentados simetricamente e assimetricamente, eritrócitos binucleados, núcleos reniformes e núcleos com brotamento, representam diferentes precursores dos micronúcleos ou fenômenos binários, conforme proposto por distintos autores (SERRANO-GARCÍA & MONTERO-MONTOYA, 2001; CROTT & FENECH, 2001; HARABAWY & MOSLEH, 2014; ALKALADI ET AL., 2015).

Por outro lado, as alterações morfométricas observadas nos eritrócitos dos animais revelam que os agrotóxicos avaliados induziram alterações em processos que vão além daqueles envolvidos na divisão celular. A menor área dos eritrócitos e a maior razão “área nuclear: área eritrocitária” nas *P. expansa* expostas aos agrotóxicos, com exceção do grupo Gly-65 (Figura 1A-B), assim como a menor circularidade dos eritrócitos e dos núcleos (Figura 1C-D, respectivamente) revelaram mudanças no tamanho e na forma dos eritrócitos induzidas pelos agrotóxicos (sem concentração dose-resposta). Tais alterações também podem estar relacionadas à indução de estresse oxidativo pelos agrotóxicos, uma vez que a excessiva produção de ROS contribui diretamente para a ocorrência de alterações na forma e na viabilidade de eritrócitos (SIEMS & SOMMERBURG, 2000).

Diferentemente deste estudo, ARAÚJO ET AL. (2019) evidenciaram o aumento das medidas morfométricas eritrocitárias e menor relação “área nuclear: área eritrócitos” de recém-eclodidos de *P. expansa* expostas intramuscularmente à NPs ZnO. Na ocasião, os autores sugeriram que o aumento da produção de ROS, induzido pelas NPs ZnO, pode ter incrementado a demanda de oxigênio, uma vez que o metabolismo antioxidante requer alto gasto energético, e isso ter ativado mecanismos compensatórios para atendimento de maior demanda de oxigênio refletido no aumento das medidas eritrocitárias. Em outro estudo, JASPER ET AL. (2012) relataram aumento do volume corpuscular médio (VCM) de eritrócitos de machos e fêmeas de ratos submetidos a tratamento com Roundup® por 15 dias. Entretanto, no presente estudo, a oxidação das moléculas de hemoglobina induzida pelos agrotóxicos pode ser uma possível explicação para a diminuição da área eritrocitária, conforme discutido por KWIATKOWSKA ET AL. (2014).

A literatura relata a ação tóxica dos agrotóxicos em espécies aquáticas e terrestres, todavia os efeitos biológicos dessa toxicidade ainda são incógnitos, os agravos inerentes a exposição de organismos vivos a agrotóxicos varia de alterações físicas simples a morte (BÜNEMANN ET AL., 2005; DELORENZO ET AL., 2009; ULLA & ZORRIEHZAHRA, 2015; LUSHCHAK ET AL., 2018; CHOUDHARY ET AL., 2018). Os répteis, especialmente os Testudines, são pouco estudados em relação a ação mutagênica, genotóxica e morfotóxica dos agrotóxicos sobre si, por isso os resultados deste estudo são particularmente interessantes, pois não há qualquer estudo que tenha associado tais

mudanças a exposição de Testudines a quaisquer agrotóxicos. Conforme discutido por ARAÚJO ET AL. (2019), diferenças na morfometria eritrocitárias de répteis são, comumente, relacionadas à fatores como espécie (BONATTO ET AL. 2009; GALLO ET AL. 2015), idade (KOSTELECKA-MYRCHA ET AL., 1997), sexo (NOWACZEWSKI & KONTECKA 2012), biomassa corpórea (KOSTELECKA-MYRCHA & CHOŁOSTIAKOW-GROMEK 2001), e variações sazonais (JANIGA ET AL., 2017); mas não como consequência da exposição a agrotóxicos. Do ponto de vista fisiológico, essas alterações podem prejudicar o balanço/metabolismo energético, bem como a eficiência do transporte de oxigênio pelos eritrócitos, podendo afetar o desenvolvimento de recém-eclodidos de *P. expansa*, com impactos na vida adulta ainda desconhecidos.

Além disso, é questionável se a exposição *in ovo* aos agrotóxicos pode afetar o desenvolvimento e crescimento dos Testudines, bem como causar efeitos negativos na vida adulta dos animais. Portanto, neste estudo, além, de terem sido observadas alterações biológicas relevantes nos animais, através do estudo da contaminação por glifosato, atrazina e fipronil de simulações de bancos de areia, foram abertas possibilidades para novas pesquisas.

A contaminação por agrotóxicos em corpos de água doce, incluindo córregos, lagos e áreas alagadas, varia entre 1,4 a 7,6 mg ai./L (EDWARDS ET AL. 1980, MANN E BIDWELL 1999, GIESY ET AL. 2000, SOLOMON E THOMPSON 2003 E THOMPSON ET AL. 2004), por este motivo, estudos como este se fazem necessários, a fim de verificar quais são os níveis máximos toleráveis de contaminação dos corpos d'água, que provavelmente não afetarão, geneticamente, a fauna e a biodiversidade em regiões de grande uso de agrotóxicos.

## 5. CONCLUSÕES

Este estudo demonstra que mesmo em baixas concentrações, permitidas pela legislação ambiental brasileira, o glifosato, atrazina e fipronil induzem (via contaminação em substrato arenoso) modificações sugestivas de morfotoxicidade eritrocitária e efeito aneuploidogênico, sem efeito genotóxico identificado pelo ensaio cometa. A ausência de efeitos genotóxicos identificados pelo ensaio cometa possivelmente é explicada pela longa exposição aos agrotóxicos. Os longos períodos de exposição podem elevar os danos genotóxicos, causando morte celular.

Assim como muitos outros, este estudo comprova a ação danosa do glifosato, atrazina e fipronil à biota, contudo, além destes, diversos pesticidas são prejudiciais, muitos dos quais se tem pouco ou nenhum conhecimento dos impactos lesivos ao meio ambiente, e a própria vida humana, a longo prazo. Desse modo é desejável e prudente a realização de ações no sentido de instruir e sensibilizar os usuários desses produtos quanto aos riscos associados a eles, bem como o Governo brasileiro e as agências

fiscalizadoras de meio ambiente e reguladoras de produtos químicos, contrapondo os onos e bonos da utilização de tais produtos, determinando assim o custo benefício econômico e ambiental. O primeiro passo para isso é a realização de estudos imparciais e a troca de informações entre pesquisadores, governo, agricultores, indústrias químicas e população. No entanto, é imperativo a linguagem técnico-científica ser ajustada a realidade dos diversos atores envolvidos na questão para dessa maneira haver efetiva compreensão da problemática.

Dentre os diversos tipos de estudos possíveis para entendimento da dinâmica danosa, ou não, dos agrotóxicos, os estudos toxicológicos são alternativas relativamente baratas e eficazes, podendo através deles inferir quais as dosagens máximas aceitáveis, dos distintos agrotóxicos, para a saúde ambiental, a sustentabilidade e a saúde humana.

## **6. AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem ao Instituto Federal Goiano pelo apoio financeiro (Proc. 23219.001925.2019-36). Malafaia G. e Silva DM são bolsistas de produtividade do CNPq (processo nº 307743 / 2018-7 e 307743/2018, respectivamente). Este trabalho foi apoiado pelo Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Répteis e Anfíbios (RAN), do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio).

## **7. CUMPRIMENTO DAS NORMAS ÉTICAS**

**Conflitos de interesse:** Os autores declaram não terem conflito de interesse.

**Aprovação ética:** Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal de Uberlândia nº 039/18. Foram feitos esforços meticulosos para garantir que os animais sofressem o mínimo possível e reduzir as fontes externas de estresse, dor e desconforto. O presente estudo não excedeu o número de animais necessários para produzir dados científicos confiáveis. Este artigo não contém estudos com participantes humanos realizados por qualquer um dos autores.

## **8. REFERÊNCIAS**

Abarikwu, S.O., Adesiyani, A.C., Oyeloja, T.O., Oyeyemi, M.O., Farombi, E.O, 2009. Changes in sperm characteristics and induction of oxidative stress in the testis and epididymis of experimental rats by a herbicide, atrazine. *Arch Environ Contam Toxicol.* Apr;58(3):874-82. doi: 10.1007/s00244-009-9371-2.

Acharya, G., Mohanty, P.K., 2019. Comparative cytomorphometry of red blood cells of some fishes. *African Journal of Biological Sciences.* 1(1): 23-32.

- Aktar, M.W., Sengupta D., Chowdhury, A., 2009. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdiscip Toxicol*, 2(1): 1-12.
- Alkaladi, A., El-Deen, N.A., Afifi, M., Zinadah, O.A., 2015. Hematological and biochemical investigations on the effect of vitamin E and C on *Oreochromis niloticus* exposed to zinc oxide nanoparticles. *Saudi J Biol Sci*. 22(5):556-63. doi: 10.1016/j.sjbs.2015.02.012.
- Anderson, T.D., Lydy, M.J., 2002. Increased toxicity to invertebrates associated with a mixture of atrazine and organophosphate insecticides. *Environ Toxicol Chem*. 21(7):1507-14.
- Araújo, A.P.C., Lima, V.S., Vieira, J.E.A.V., Mesak, C., Malafaia, G., 2019. First report on the mutagenicity and cytotoxicity of ZnO nanoparticles in reptiles. *Chemosphere*. 235:556-564. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.06.164.
- Avery, M.L., Primus, T.M., Mihiach, E.M., Decker, D.G., Humphrey, J.S., 1998. Consumption of Fipronil-Treated Rice Seed Does Not Affect Captive Blackbirds. *Pestic. Sci*. 52, 91-96.
- Ayres, M., Ayres Jr, M., Ayres, D.L., Santos, A.A.S., 2007. *Bioestat: aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Biomédicas. Versão 5.0*. Belém, Pará: Sociedade Civil Mamirauá, MCT-CNPq. 324 p.
- Babalola, O.O., Truter, J.C., van-Wyk, J.H., 2019. Mortality, teratogenicity and growth inhibition of three glyphosate formulations using Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus. *Journal of Applied Toxicology*, 39(9): 1257-1266.
- Bali, Y.A., Kaikai, N., Ba-M'hamed, S., Bennis. M., 2019. Learning and memory impairments associated to acetylcholinesterase inhibition and oxidative stress following glyphosate based-herbicide exposure in mice. *Toxicology*, 415: 18-25.
- Borges, F.F.V., Silva, C.R., Goes, W.M., Godoy, F.R., Franco, F.C., Véras, J.H., Bailão, E.F.L.C., Silva, D.M., Cardoso, C.G., Cruz, A.D., Chen-Chen, L. 2018. Protective Effects of Silymarin and Silibinin against DNA Damage in Human Blood Cells. *Biomed Research International*. ID: 2;2018:6056948. doi: 10.1155/2018/6056948.
- Bünemann, E.K., Schwenk, G.D., Zwieter, V., 2005. Impact of agricultural inputs on soil organisms – a review. *Australian Journal of Soil Research*, 44(4): 379-406.
- Burella, P.M., Odetti, L.M.L., Simoniello, M.F., Poletta, G.L., 2018. Oxidative damage and antioxidant defense in *Caiman latirostris* (Broad-snouted caiman) exposed in ovo to pesticide formulations. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2018 Oct;161:437-443. doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.06.006.
- Carneiro, I.V., Vierira, L.G., Mendonça, J.S., Hirano, L.Q.L, Valdes, S.A.C, Menezes-Reis, L.T., Santos, A.Q., 2019. Development of scleral ossicles in *Podocnemis expansa* (Testudines: Podocnemididae) embryos exposed to atrazine. *Drug Chem Toxicol*. 14:1-6. doi: 10.1080/01480545.2019.1598427.
- Cederlund, H. 2017. Effects of spray drift of glyphosate on nontarget terrestrial plants-A critical review. *Environ Toxicol Chem*, 36(11):2879-2886. doi: 10.1002/etc.3925.

Critical Ecosystem Partnership Fund (CEPF) - Announcing the World's 36th Biodiversity Hotspot: The North American Coastal Plain. Retrieved on February 14, 2016 from [http://www.cepf.net/news/top\\_stories/Pages/Announcing-the-Worlds-36thBiodiversity-Hotspot.aspx](http://www.cepf.net/news/top_stories/Pages/Announcing-the-Worlds-36thBiodiversity-Hotspot.aspx).

Choudhary, S., Raheja, N., Yadav, S.K., Hamboj, M.L., Sharma, A.A., 2018. Review: pesticide residue: cause of many animal health problems. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 6(3): 300-333.

Collins, A.R., 2004. The Comet assay for DNA damage and repair principles, applications, and imitations. *Mol Biotechnol*. 26:249–260.

Cooper, J., Dobson, H. 2007. The benefits of pesticides to mankind and the environment. *Crop Protection*, 26(9): 1337-1348.

Costa, M.J., Monteiro, D.A., Oliveira-Neto, A.L., Rantin, F.T., Kalinin, A.L. 2008. Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original. *Ecotoxicology*. (3):153-63.

Crott, J., Fenech, M. 2001. Preliminary study of the genotoxic potential of homocysteine in human lymphocytes in vitro. *Mutagenesis*. 16(3):213-7.

Daam, M.A., Moutinho, M.F., Espíndola, E.L.G., Schiesari, L. 2019. Lethal toxicity of the herbicides acetochlor, ametryn, glyphosate and metribuzin to tropical frog larvae. *Ecotoxicology*. (6):707-715. doi: 10.1007/s10646-019-02067-5.

Dalton, R.L., Boutin, C. 2010. Comparison of the effects of glyphosate and atrazine herbicides on nontarget plants grown singly and in microcosms. *Environ Toxicol Chem*. 29(10):2304-15. doi: 10.1002/etc.277.

Degen, G.H., Gerber, M.M., Obrecht-Pflumio, S., Dirheimer, G. 1997. Induction of micronuclei with ochratoxin A in ovine seminal vesicle cell cultures. *Arch. Toxicol*. 71 365–371

DeLorenzo, M.E., Scott, G.I, Ross, P.E. 2001. Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: a review. *Environ Toxicol Chem*.20(1):84-98.

Dill, G.M., Sammons, R.D., Feng, P.C.C., Kohn, F., Kretzmer, K., Mehrsheikh, A., Bleeke, M., Honegger, J.L., Farmer, D., Wright, D. and Hauptfear, E.A. 2010. Glyphosate: Discovery, development, applications, and properties. In: Nandula, V.K., Ed., *Glyphosate Resistance in Crops and Weeds: History, Development, and Management*, John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, 1-33. doi:10.1002/9780470634394.ch1.

Dornelles, M.F., Oliveira, G.T. 2013. Effect of atrazine, glyphosate and quinclorac on biochemical parameters, lipid peroxidation and survival in bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*). *Arch Environ Contam Toxicol*. 2014 Apr;66(3):415-29. doi: 10.1007/s00244-013-9967-4.

European Food Safety Authority (EFSA), 2009. Guidance of EFSA: risk assessment for birds and mammals. *EFSA J*. 7, 1438.

- Florencia, F.M., Carolina, T., Enzo, B., Leonardo, G. 2017. Effects of the herbicide glyphosate on non-target plant native species from Chaco forest (Argentina). *Ecotoxicol Environ Saf.* 144:360-368. doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.06.049.
- Gibbons, D., Morrissey, C., Mineau, P. 2015. A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. *Environ Sci Pollut Res Int.* 22(1):103-18. doi: 10.1007/s11356-014-3180-5.
- Gill, J.P.K., Sethi, N., Mohan, A., Datta, S., Girdhar, M. 2018. Glyphosate toxicity for animals. *Environmental Chemistry Letters*, 16(2): 401-426.
- Glinski, D., Henderson, M., Purucker, T., VanMeter, R. 2013. Metabolism of pesticides after dermal exposure to amphibians. Presented at 34th Annual SETAC North America, Nashville, TN.
- Gonçalves, M.W. Gambale, P.G., Godoy, F.R., Alves, A.A., Rezende, P.H.A., Cruz, A.D., Maciel, N.M., Nomura, F, Bastos, R., Marco-Jr, P., Silva, D.M.. 2017. The agricultural impact of pesticides on *Physalaemus cuvieri* tadpoles (Amphibia: Anura) ascertained by comet assay. *Zoologia*, 34: 1-8.
- Gyori, B.M., Venkatachalam, G., Thiagarajan, P.S., Hsu, D., Clement, M.V. 2014. OpenComet: an automated tool for comet assay image analysis. *Redox Biol.* 9;2:457-65. doi: 10.1016/j.redox.2013.12.020. eCollection 2014.
- Harabawy, A.S., Mosleh, Y.Y. 2014. The role of vitamins A, C, E and selenium as antioxidants against genotoxicity and cytotoxicity of cadmium, copper, lead and zinc on erythrocytes of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2014. 104:28-35. doi: 10.1016/j.ecoenv.2014.02.015.
- Hayes, T.B., Anderson, L.L., Beasley, V.R., de Solla, S.R., Iguchi, T., Ingraham, H., Kestemont, P., Kniewald, J., Kniewald, Z., Langlois, V.S., Luque, E.H., McCoy, K.A., Muñoz-de-Toro, M., Oka, T., Oliveira CA, Orton F, Ruby S, Suzawa M, Tavera-Mendoza LE, Trudeau VL, Victor-Costa AB, Willingham, E. 2011. Demasculinization and feminization of male gonads by atrazine: consistent effects across vertebrate classes. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 127(1-2):64-73. doi: 10.1016/j.jsbmb.2011.03.015.
- Hirano, L.Q.L., Alves, L.S., Menezes-Reis, L.T., Mendonça, J.S., Simões, K., Santos, A.L.Q., Vieira, L.G. 2019. Effects of egg exposure to atrazine and/or glyphosate on boné development in *Podocnemis unifilis* (Testudines, Podocnemididae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 182: 109400.
- Hopkins, W.A. 2000 Reptile toxicology: challenges and opportunities in the last frontier in vertebrate ecotoxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(10): 2391-2393.
- Humpage, A.R., Fenech, M., Thomas, P., Falconer, I.R. 2000. Micronucleus induction and chromosome loss in transformed human white cells indicate clastogenic and aneugenic action of the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *Mutat Res.* 20;472(1-2):155-61.
- Hussain, R., Ali, F., Rafique, A., Ghaffar, A., Jabeen, G., Rafay, M., Liaqat, S., Khan, I., Malik, R., Khan, M.K., Niaz, M., Akram, K., Masood, A. 2019. Exposure to Sub-Acute Concentrations of Glyphosate Induce Clinico-Hematological, Serum Biochemical and Genotoxic Damage in Adult Cockerels. *Pak Vet J.* <http://dx.doi.org/10.29261/pakvetj/2019.064>.

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). 2013. Aplicação de critérios e categorias da IUCN na avaliação da fauna brasileira. ICMBioMMA.

Jasper, R., Locatelli, G.O., Pilati, C., Locatelli, C. 2012. Evaluation of biochemical, hematological and oxidative parameters in mice exposed to the herbicide glyphosate-Roundup®. *Interdiscip Toxicol.* 5(3):133-40. doi: 10.2478/v10102-012-0022-5.

Jin, Y., Zhang, X., Shu, L., Chen, L., Sun, L., Qian, H., Liu, W., Fu, Z. 2010. Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposure in adult female zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere.* 78(7):846-52. doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.11.044.

Kartheek, R.M., David, M. 2018. Assessment of fipronil toxicity on wistar rats: A hepatotoxic perspective. *Toxicol Rep*, 5: 448-456.

Kidd, H., James, D.R. 1991. *The agrochemicals handbook*. Royal Society of Chemistry Information Services, Cambridge.

Kwiatkowska, M., Huras, B., Bukowska, B. 2014. The effect of metabolites and impurities of glyphosate on human erythrocytes (in vitro). *Pestic Biochem Physiol.* 109:34-43. doi: 10.1016/j.pestbp.2014.01.003.

Lajmanovich, R.C., Peltzer, P.M., Attademo, A.M., Martinuzzi, C.S., Simoniello, M.F., Colussi, C.L., Boccioni, P.C., Sigríst, M. 2019. First evaluation of novel potential synergistic effects of glyphosate and arsenic mixture on *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) tadpoles. *Heliyon*, 5(10): e02601.

Langiano, V.C., Martinez, C.B. 2008. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 147(2):222-31.

Lindsay, E.A., French, K. 2004. The impact of the herbicide glyphosate on leaf litter invertebrates within Bitou bush, *Chrysanthemoides monilifera* ssp *rotundata*, infestations. *Pest Manag Sci.* 60(12):1205-12.

Linz, G.M., Blixt, D.C., Bergman, D.L., Bleier, W.J. 1996. Responses of red-winged blackbirds, yellow-headed blackbirds and marsh wrens to glyphosate-induced alterations in cattail density (Respuesta de *Agelaius phoeniceus*, *Xanthocephalus xanthocephalus* y *Cistothorus palustris* a Alteración en la Densidad de Eneas Tratadas con Yerbicidas. *J Field Ornithol* 167–176.

Loro, V.L., Glusczak, L., Moraes, B.S., Leal, C.A.M., Menezes, C., Murussi, C.R., Leitemperger, J., Schetinger, M.R.C., Morsch, V.M. 2015. Glyphosate-based herbicide affects biochemical parameters in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824 and) *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1837). *Neotrop Ichthyol*, 13(1): 229-236.

Lushchak, V.I., Matviishyn, T.M., Husak, V.V., Storey, J.M., Storey, K.B. 2018. Pesticide toxicity: a mechanistic approach. *Excli j*, 17: 1101-1136.

Ma, J., Zhu, J., Wang, W., Ruan, P., Rajeshkumar, S. 2019. Biochemical and molecular impacts of glyphosate-based herbicide on the gills of common carp. *Environmental Pollution*, 252:1288-1300.

- McComb, B.C., Curtis, L., Chambers, C.L., Newton, M., Bentson, K. 2008. Acute toxic hazard evaluations of glyphosate herbicide on terrestrial vertebrates of the Oregon coast range. *Environ Sci Pollut Res Int.* 15(3):266-72.
- Mendonça, J.S., Vieira, L.G., Valdes, S.A.C., Vilca, F.Z., Tornisielo, V.L., Santos, A.L.Q. 2016. Effects of the exposure to atrazine on bone development of *Podocnemis expansa* (Testudines, Podocnemididae). *Ecotoxicology.* 25(3):594-600. doi: 10.1007/s10646-016-1618-x.
- Mesak, C., Montalvão, M.F., Paixão, C.F.C., Mendes, B.O., Araújo, A.P.D.C., Quintão, T.C., Malafai, G. 2019. Do Amazon turtles exposed to environmental concentrations of the antineoplastic drug cyclophosphamide present mutagenic damages? If so, would such damages be reversible? *Environ Sci Pollut Res Int.* 26(6):6234-6243. doi: 10.1007/s11356-019-04155-9.
- Mingo, V., Lötters, S., Wagner, N. 2016. Risk of pesticide exposure for reptile species in the European Union. *Environmental Pollution*, 215: 164-169.
- Mitra, J., Raghu, K. 1998. Pesticides-non target plants interactions: An overview. *Archives of Agronomy and soil Science*, 43(6): 445-500.
- Mittermeier, R.A., Gil, R.P., Hoffman, M., Pilgrim, J., Brooks, T., Mittermeier, C.G., Lamoreux, J., Fonseca, G.A.B. 2005. Hotspots revisited: earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions, 2. ed. University of Chicago Press, Boston.
- Mossa, A.T.H., Swelam, E.S., Mohafrash, S.M.M. 2015. Sub-chronic exposure to fipronil induced oxidative stress, biochemical and histopathological changes in the liver and kidney of male albino rats. *Toxicology Reports*, 2: 775-784.
- Noss, R.F., Platt, W.J., Sorrie, B.A., Weakley, A.S., Means, D.B., Costanza, J., Peet, R.K. 2015. How global biodiversity hotspots may go unrecognized: lessons from the North American Coastal Plain. *Diversity and Distributions* 21:236-244.
- Nwani, C.D., Lakra, W.S., Nagpure, N.S., Kumar, R., Kushwaha, B., Srivastava, S.K. 2010. Toxicity of the herbicide atrazine: effects on lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in the freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch). *Int J Environ Res Public Health.* 2010 (8):3298-312. doi: 10.3390/ijerph7083298.
- Nwani, C.D., Nagpure, N.S., Kumar, R., Kushwaha, B., Lakra, W.S. 2013. DNA damage and oxidative stress modulatory effects of glyphosate-based herbicide in freshwater fish, *Channa punctatus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 36(2): 539-547.
- Olson, G.A., Hessler, J.R., Faith, R.E. 1975. Technics for blood collection and intravascular infusion of reptiles. *Lab Anim Sci.* 25(6):783-6.
- Paganelli, A., Gnazzo, V., Acosta, H., López, S.L., Carrasco, A.E. 2010. Glyphosate-based herbicides produce teratogenic effects on vertebrates by impairing retinoic acid signaling. *Chem Res Toxicol.* 18;23(10):1586-95. doi: 10.1021/tx1001749.
- Pinto, M.M.P.L.; Santos, N.F.G. 2010. Amaral, A. Current status of biodosimetry based on standard cytogenetic methods. *Radiation and Environmental Biophysics*, v.49, p.567-581.

Pisa, L.W., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L.P., Bonmatin, J.M., Downs, C.A., Goulson, D., Kreutzweiser, D.P., Krupke, C., Liess, M., McField, M., Morrissey, C.A., Noome, D.A., Settele, J., Simon-Delso, N., Stark, J.D., Van-der-Sluijs, J.P., Van-Dyck, H., Wiemers, M. 2015. Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(1): 68-102.

Poletta, G.L., Larriera, A., Kleinsorge, E., Mudry, M.D. 2008. Caiman latirostris (broad-snouted caiman) as a sentinel organism for genotoxic monitoring: basal values determination of micronucleus and comet assay. *Mutat Res.* 29;650(2):202-9. doi: 10.1016/j.mrgentox.2007.12.001.

Poletta, G.L., Larriera, A., Kleinsorge, E., Mudry, M.D. 2009. Genotoxicity of the herbicide formulation Roundup (glyphosate) in broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) evidenced by the Comet assay and the Micronucleus test. *Mutat Res.* 31;672(2):95-102. doi: 10.1016/j.mrgentox.2008.10.007.

Ramos, J.S., Alves, A.A., Lopes, M.P., Pedrosa, T.M., Felício, L.P., Carvalho, W.F., Franco, F.C., Melo, C.O.A., Gonçalves, M.W., Soares, T.N., Cruz, A.D., Silva, D.M. 2016. DNA damage in peripheral blood lymphocytes and association with polymorphisms in the promoter region of the CYP2E1 gene in alcoholics from Central Brazil. *Alcohol.* 57:35-39. doi: 10.1016/j.alcohol.2016.08.007.

Reindl, A.R., Falkowska, L., Grajewska, A. 2015. Chlorinated herbicides in fish, birds and mammals in the Baltic Sea. *Water, Air, & Soil Pollution*, 226: 276.

Sampaio, D.M.D.R., Estrela, F.N., Mendes, B.O., Estrela, D.D.C., Montalvão, M.F., Mesak, C., Silva, F.G., Araújo, A.P.D.C., de Freitas, C.S., Gontijo, B.V., Rodrigues, A.S.L., Malafaia, G. 2019. Ingestion of tannery effluent as a risk factor to the health of birds: A toxicological study using *Coturnix coturnix japonica* as a model system. *Sci Total Environ.* 1;681:275-291. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.05.046.

Santo, G.D., Grotto, A., Boligon, A.A., Da Costa, B., Rambo, C.L., Fantini, E.A., Sauer, E., Lazzarotto, L.M.V., Bertoncello, K.T., Júnior, O.T., Garcia, S.C., Siebel, A.M., Rosemberg, D.B., Magro, J.D., Conterato, G.M.M., Zanatta, L. 2018. Protective effect of *Uncaria tomentosa* extract against oxidative stress and genotoxicity induced by glyphosate-Roundup® using zebrafish (*Danio rerio*) as a model. *Environ Sci Pollut Res Int.* (12):11703-11715. doi: 10.1007/s11356-018-1350-6.

Serrano-García, L., Montero-Montoya, R. 2001. Micronuclei and chromatid buds are the result of related genotoxic events. *Environ Mol Mutagen.* 38(1):38-45.

Shehata, A.A., Schrödl, W., Aldin, A.A., Hafez, H.M., Krüger, M. 2013. The effect of glyphosate on potential pathogens and beneficial members of poultry microbiota in vitro. *Curr Microbiol* 66(4):350–358.

Siems, W.G., Sommerburg, O., Grune, T. 2000. Erythrocyte free radical and energy formation. *Clin Nephrol* 53(Suppl 1):S9–S17.

Simon-Delso, N., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L.P., Bonmatin, J.M., Chagnon, M., Downs, C., Furlan, L., Gibbons, D.W., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreutzweiser, D.P., Krupke, C.H., Liess, M., Long, E., McField, M., Mineau, P., Mitchell, E.A., Morrissey, C.A., Noome, D.A., Pisa, L., Settele, J., Stark, J.D., Tapparo, A., Van Dyck, H., Van Praagh J, Van der Sluijs, J.P., Whitehorn, P.R.,

- Wiemers, M. 2015. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environ Sci Pollut Res Int.* 22(1):5-34. doi: 10.1007/s11356-014-3470-y.
- Slaninova, A., Smutna, M., Modra, H., Svobodova, Z. 2009. A review: oxidative stress in fish induced by pesticides. *Neuro Endocrinol Lett.* 30 Suppl 1:2-12.
- Souza, J.M., Montalvão, M.F., da Silva, A.R., Rodrigues, A.S.L., Malafaia, G. 2017. A pioneering study on cytotoxicity in Australian parakeets (*Melopsittacus undulates*) exposed to tannery effluent. *Chemosphere.* 175:521-533. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.02.087.
- Terradas, M., Martín, M., Tusell, L., Genescà, A. 2010. Genetic activities in micronuclei: is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell? *Mutat Res.* 2010 705(1):60-7.
- Thierens, H., Vral, A. 2009. The micronucleus assay in radiation accidents. *Ann Ist Super Sanità,* v.45, p.260-264.
- Tingle, C.C., Rother, J.A., Dewhurst, C.F., Lauer, S., King, W.J. 2003. Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 176:1-66.
- Turkmen, R., Birdane, Y.O., Demirel, H.H., Yavuz, H., Kabu, M. 2019. Ince S. Antioxidant and cytoprotective effects of N-acetylcysteine against subchronic oral glyphosate-based herbicide-induced oxidative stress in rats. *Environ Sci Pollut Res* 26(11):11427-11437. doi: 10.1007/s11356-019-04585-5.
- Ulla, S., Zorriehzaha, M.J. 2015. Ecotoxicology: a review of pesticides induced toxicity in fish. *Advances in Animal and Veterinary Sciences,* 3(1): 40-57.
- United States Environmental Protection Agency (EPA). About Pesticide Registration. Available in: <https://www.epa.gov/pesticide-registration/about-pesticide-registration#registration>. Access on: 07 December 2019.
- United States Environmental Protection Agency (EPA). Atrazine - Background and Updates. Available in: <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/atrazine-background-and-updates>. Access on: 08 December 2019a.
- Valdes, S.A.C., Vieira, L.G., Ferreira, C.H., Mendonça, J, S., Ribeiro, P.R.Q., Fernandes, E.A., Santos, A.L.Q. 2015. Effects of Exposure to Methyl Parathion on Egg Hatchability and Eggshell Chemical Composition in *Podocnemis expansa* (Testudines, Podocnemididae). *Zoolog Sci.* 32(2):135-40. doi: 10.2108/zs140164.
- Wacksman, M.N., Maul, J.D., Lydy, M.J. 2006. Impact of atrazine on chlorpyrifos toxicity in four aquatic vertebrates. *Arch Environ Contam Toxicol.* 51(4):681-9.
- Wech, J., Suren, A., Brady, M., Kilroy, C. 2018. The effect of willow control using a glyphosate formulation on aquatic invertebrates within a New Zealand wetland. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research,* 52(1): 16-41.
- Wilhelms, K.W., Cutler, S.A., Proudman, J.A., Anderson, L.L., Scanes, C.G. 2005. Atrazine and the Hypothalamo-Pituitary-Gonadal Axis in Sexually Maturing Precocial Birds: Studies in Male Japanese Quail. *Toxicological Sciences,* 86(1): 152-160.

Williams, K.J., Ford, A., Rosauer, D.F., De Silva, N., Mittermeier, R.A., Bruce, C., Larsen, F.W., Margules, C. 2011. Forests of East Australia: The 35th Biodiversity Hotspot. In: Zachos FE, Habel JC (eds) Biodiversity Hotspots: Distribution and Protection of Priority Conservation Areas (pp 295-310). Springer-Verlag, Berlin.

World Health Organization (WHO). 2010. International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides. Guidelines for the registration of pesticides.

World Health Organization (WHO). WHO Pesticide Evaluation Scheme (WHOPES). Available in: [https://www.who.int/whopes/resources/who\\_htm\\_ntd\\_whopes\\_2010.7/en/](https://www.who.int/whopes/resources/who_htm_ntd_whopes_2010.7/en/). Access in: 07 December, 2019.

Yoon, D.S., Park, J.C., Park, H.G., Lee, J.S., Han, J. 2019. Effects of atrazine on life parameters, oxidative stress, and ecdysteroid biosynthetic pathway in the marine copepod *Tigriopus japonicus*. *Aquatic Toxicology*, 213: 105213.

Zapata, L.M., Bock, B.C., Orozco, L.Y., Palacio, J.A. 2016. Application of the micronucleus test and comet assay in *Trachemys callirostris* erythrocytes as a model for in situ genotoxic monitoring. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2016 May;127:108-16. doi: 10.1016/j.ecoenv.2016.01.016.

Zhang, B., Zhang, L., He, L., Yang, X., Shi, Y., Liao, S., Yang, S., Cheng, J., Ren, T. 2018. Interactions of Fipronil within Fish and Insects: Experimental and Molecular Modeling Studies. *J Agric Food Chem.* 66(23):5756-5761. doi: 10.1021/acs.jafc.8b00573.

Zhang, C., Qin, L., Dou, D.C., Li, X.N., Ge, J., Li, J.L. 2018. Atrazine induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in quail (*Coturnix C. coturnix*) kidney via modulating Nrf2 signaling pathway. *Chemosphere.* 212:974-982. doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.08.138.

Zhang, L., Rana, I., Shaffer, R.M., Taioli, E., Sheppard, L. 2019. Exposure to glyphosate-based herbicides and risk for non-Hodgkin lymphoma: A meta-analysis and supporting evidence. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 781: 186-206.

Zhang, W. 2018. Global pesticide use: profile, trend, cost/benefit and more. *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences*, 8(1): 1-27.