UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

FERNANDA MENEZES FRANÇA-SALGUEIRO

Avaliação da toxicidade de agrotóxicos utilizados na cultura do arroz
irrigado para girinos de *Lithobates catesbeianus*

Lorena - SP

2013

FERNANDA MENEZES FRANÇA-SALGUEIRO

Avaliação da toxicidade de agrotóxicos utilizados na cultura do arroz irrigado para girinos de *Lithobates catesbeianus*

Tese apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na área de conversão de biomassa.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Teresa Cristina Brazil de Paiva

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a Cláudia Maris Ferreira Mostério

Edição reimpressa e corrigida

Lorena - SP

Fevereiro, 2013

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na Publicação
Biblioteca “Cel. Luiz Sylvio Teixeira Leite”
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

França-Salgueiro, Fernanda Menezes

Avaliação da toxicidade de agrotóxicos utilizados na cultura do arroz irrigado para girinos de *Lithobates catesbeianus* / Fernanda Menezes França-Salgueiro. – ed. reimpr., corr.– 2013.

101 p. : il.

Tese (Doutora em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de Biomassa) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2012.

Orientadora: Teresa Cristina Brazil de Paiva

Co-orientadora: Cláudia Maris Ferreira Mostério

1. Ecotoxicologia 2. Rã-touro 3. Hematologia 4. Micronúcleo. I. Título. II. Paiva, Teresa Cristina Brazil de, orient. III. Mostério, Cláudia Maris Ferreira, co-orient.

579.64 - CDU

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Rubens Vieira França e Clotilde M. Menezes França
pelo grande incentivo e apoio.*

*COM TODO MEU AMOR,
À MINHA FILHA ISABELLA FRANÇA SALGUEIRO
E AO MEU MARIDO ANDRÉ LUIS F. SALGUEIRO
POR TODO CARINHO E COMPREENSÃO.*

AGRADECIMENTOS

À Deus por mais esta etapa concluída.

À Dr^a Teresa Brazil de Paiva, USP/Lorena, pela orientação neste estudo e ensinamentos.

À Dr^a Cláudia Maris Ferreira, Instituto de Pesca, pela co-orientação, amizade e ajuda que me deu!

À EEL USP/Lorena, ao PRDTA/Pindamonhangaba, ao Instituto Biológico/SP e ao Instituto de Pesca/SP pela oportunidade de realizar este trabalho.

À Dr^a Adriana Sacioto Marcantônio e à Dr^a Cleide M. Pinto do PRDTA/Pindamonhangaba, pela oportunidade de realizar este trabalho e ajuda.

À Dr^a Patrícia Coelho Teixeira por TODA ajuda que me deu!!

Aos funcionários do PRDTA/Pindamonhangaba, Andréa, Olavo, Jorge, Sorriso, Chavone, João e Zé Menino.

Aos amigos do Instituto de Pesca/SP Ludmila, Jorgina e Pedro...Obrigada pelas ajudas nas coletas!

Ao Dr. Marcio Hipólito por toda a colaboração.

Aos funcionários e alunos do Laboratório de Ecotoxicologia/EEL, principalmente à Lucinha, que com muito carinho, ajudou bastante nesse projeto. À amiga Carol e à Letícia que colaboram nas coletas e análises da água.

Aos proprietários da Fazenda Regina, principalmente ao Juarez que, que colaborou MUITO para a realização dos testes. Obrigada mesmo!!!

Ao Dr. Omar que, com muita paciência, me ajudou a entender muitos assuntos importantes sobre a cultura do arroz.

À todos os funcionários da fitotecnia/Pindamonhangaba que colaboraram bastante.

Ao pessoal do LISA – Instituto Biológico/SP, em especial à Dr^a. Cristina Martins pelas análises histológicas.

Aos pesquisadores do Instituto de Pesca, Dr^a. Cláudia Maris Ferreira, Dr. Hécio Luiz de Almeida Marques, Dr. Júlio Vicente Lomardi, com quem pude aprender muitas coisas durante todos esses anos de convivência.

Ao João Batista, motorista do Instituto de Pesca/SP por toda ajuda durante as coletas.

Ao Alexandre Livramento pela amizade e ajuda.

À doutoranda Isabela Cristina, USP/SP pela grande ajuda nas análises estatísticas!

À CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

Ao meu marido André, que me apoiou e me incentivou muito durante esta etapa, obrigada por toda sua paciência.

À minha querida filha, Isabella.

Aos meus pais, que sempre estiveram ao meu lado e dividiram todos os momentos de alegrias e dificuldades, mostrando que a família sempre será o meu porto seguro. Obrigada por serem meus pais.

Aos colegas de turma da pós-graduação pelo convívio, auxílio e amizade.

A todos que, de alguma forma contribuíram para a elaboração deste trabalho.

*Se a aparência e a essência das coisas coincidissem,
a ciência seria desnecessária*

Karl Marx

RESUMO

FRANÇA-SALGUEIRO, F.M. **Avaliação da toxicidade de agrotóxicos utilizados na cultura do arroz irrigado para girinos de *Lithobates catesbeianus***. 2012. 101p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2013.

Os girinos de rã-touro, *Lithobates catesbeianus*, podem ser bons bioindicadores de condições ambientais. O objetivo desse trabalho foi determinar o potencial de toxicidade para *L. catesbeianus* de alguns dos principais agrotóxicos utilizados no cultivo de arroz irrigado. Foram realizados testes de toxicidade aguda para a determinação da CL_{50-96h} do bentazon, penoxsulam, óleo vegetal, permetrina e carbofuran, separadamente, e da mistura desses agrotóxicos. Com esses resultados foram estimados os índices de segurança dos produtos. Girinos em fase pré-metamorfose foram expostos aos agrotóxicos na própria lavoura de arroz e em laboratório por 21 dias, para avaliar os possíveis efeitos crônicos destas substâncias, separadamente e da mistura, sobre o quadro hematológico, metamorfose (regulada pelo eixo tiroideano), e também o possível potencial mutagênico através do teste do micronúcleo. A CL_{50-96h} para girinos foi de 4530 mg/L para o bentazon; 7,52 mg/L para o penoxsulam + 145,66 mg/L do óleo vegetal; 81,57 mg/L para o óleo vegetal, 0,10 mg/L para a permetrina, 29,90 mg/L para o carbofuran (ingredientes ativos) e, 38,79 vezes a dose utilizada no campo para a mistura desses produtos. Foi determinado risco ambiental apenas para o inseticida permetrina. Nos testes *in situ*, as águas de irrigação não apresentaram toxicidade aguda para os girinos. A taxa de metamorfose não diferiu entre os tratamentos, demonstrando que os agrotóxicos utilizados nas doses indicadas não tem ação desreguladora do eixo tiroideano. As análises do micronúcleo mostraram aumento significativo de eritrócitos micronucleados para os testes *in situ* e, no laboratório, para o herbicida bentazon e para a mistura dos agrotóxicos. As análises hematológicas mostraram diminuição da hemoglobina e número de eritrócitos no teste de campo, retornado aos padrões normais na semana seguinte. No laboratório houve queda na contagem de eritrócitos para o bentazon, aumento do VCM e HCM para o bentazon e penoxsulam; aumento do CHCM para o penoxsulam e para a mistura dos agrotóxicos. Para a série branca não houve diferenças no teste *in situ*, mas obtivemos aumento dos números de neutrófilos dos girinos tratados com o bentazon.

Palavras-chave: Ecotoxicologia, Rã-touro, Hematologia, Micronúcleo.

ABSTRACT

FRANÇA-SALGUEIRO, F.M. **Evaluation of toxicity of pesticides used in irrigated rice crops to *Lithobates catesbeianus* tadpoles**. 2012. 101p. Thesis (Doctoral of Sciences) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2013.

American bullfrogs, *Lithobates catesbeianus* could be good environmental indicators. The aim of this study was evaluate the potential toxicity of some principal pesticides used in irrigated rice crops to *L. catesbeianus* tadpoles. The pesticides Bentazon, Penoxsulam, Vegetable oil, Permetrina, Carbofuran and the mixture of them were assessed. Pre-metamorphose tadpoles were exposed to all of these agrochemicals in the laboratory to determinate de LC_{50-96h} and so estimate the index of security by each product. Animals in the same phase were exposed to these pesticides on the rice crops, *in situ* and in laboratory per 21 days to evaluate the possible chronic effects of the substances, separated and in the mixture of them. The hematological results, red and white series, the mutagenic potential (micronucleous test), and the metamorphose rate (regulated by thyroid axis) were evaluated. The LC_{50-96h} to tadpoles was 4530 mg/L to Bentazon; 7.52 + 145.66 mg/L to Penoxsulam + vegetable oil; 81.57 mg/L to vegetable oil; 0.10 mg/L to Permetrina; 29.90 mg/L to Carbofuran (active ingredients) and 38.79 times to the dose used in the field to the mixture of the products. Only to Permetrina insecticide was observed environmental risk. The metamorphose rate showed no difference between the treatments suggesting that these pesticides, used on indicated doses did not promote deregulated action on the thyroid axis. *In situ* tests the irrigated waters showed low mortality to the animals. The red series showed *in situ*, a decrease in the haemoglobin tax and in the counting of erythrocyte's number however return to the normal values in the follow week. In laboratory tests showed a decrease in the counting of erythrocyte's number to the animals exposed to Bentazon, an increase in the MCV and MCH to the animals exposed to Bentazon and Penoxsulam, an increase in the MCHC to those exposed to Penoxsulam and to the "mixture". The white series showed no difference *in situ* test however an increase in the neutrophils number was observed to the animals exposed to Bentazon in laboratory. The micronucleous analyze showed significant increase in the erythrocyte's micronucleated number *in situ* and in laboratorial tests to animals exposed to Bentazon and to the "mixture".

Keywords: Ecotoxicology, Bullfrog, Hematology, Micronuclei.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Diagrama apresentando as etapas dos processos metodológicos empregados no estudo.....	32
Figura 2	Imagem de satélite da propriedade onde foram realizados os estudos.....	33
Figura 3	A – Setor de reprodução. B – Setor de eclosão e desenvolvimento embrionário.....	35
Figura 4	Teste de toxicidade aguda com o herbicida bentazon.....	37
Figura 5	Imagem de satélite da área onde foram realizados os testes <i>in situ</i> preliminares.....	42
Figura 6	Girinos de <i>L. catesbeianus</i> (estágio 31 de Gosner, 1960).....	42
Figura 7	Gaiolas utilizadas para expor girinos de <i>L. catesbeianus</i> aos agrotóxicos da cultura do arroz irrigado.....	43
Figura 8	Tabela de Gosner (1960), classificação dos estágios de desenvolvimento de anfíbios	44
Figura 9	Imagem de satélite da área onde foram realizados os testes <i>in situ</i> definitivos.....	45
Figura 10	Manejo para a aplicação dos agroquímicos durante o teste definitivo e desenvolvimento.....	47
Figura 11	Condutividade elétrica da água durante os testes I e II <i>in situ</i>	59
Figura 12	Estágios de desenvolvimento dos girinos de <i>L. catesbeianus</i> ao final dos períodos de exposição aos agrotóxicos.....	60
Figura 13	Fotomicrografia de extensão do sangue periférico de girinos de <i>L. catesbeianus</i> intoxicados com agrotóxico. Micronúcleo no citoplasma do eritrócito (flecha preta). Coloração Fielgen/Fast Green. Aumento 1000X.....	61
Figura 14	Médias dos valores de micronúcleos em 1000 eritrócitos de girinos, durante os Experimentos I e II de campo. * e ** representam diferenças em relação ao controle, com $p < 0,05$ e $0,01$, respectivamente.....	61
Figura 15	Resultados da série vermelha das análises hematológicas dos girinos durante o Experimento II <i>in situ</i> . * e ** representam diferenças em relação ao controle, com p menor que $0,05$ e	

	0,01, respectivamente.....	64
Figura 16	Resultados da série branca (contagem total e diferencial de leucócitos) dos girinos durante o Experimento II <i>in situ</i>	66
Figura 17	Fotomicrografia da extensão sanguínea de girinos, Er = Eritrócito, Lf = Linfócito, Nt = Neutrófilo, Bs = Basófilo, Es = Eosinófilo e Mn = Monócito. Coloração Rosenfeld. Aumento de 1000 X.....	67
Figura 18	Mortalidade (%) dos girinos durante o experimento crônico de laboratório.....	68
Figura 19	Estágios de desenvolvimento dos girinos de <i>L. catesbeianus</i> ao final do experimento em laboratório	68
Figura 20	Médias dos valores de micronúcleos em 1000 eritrócitos de girinos, durante o Experimento crônico em laboratório. * e ** representam diferenças em relação ao controle, com $p < 0,05$ e 0,01, respectivamente.....	69
Figura 21	Resultados da série vermelha das análises hematológicas dos girinos durante o Experimento crônico de laboratório. * e ** representam diferenças em relação ao controle, com $p < 0,05$ e 0,01, respectivamente.....	71
Figura 22	Resultados da série branca (contagem total e diferencial de leucócitos) dos girinos durante o Experimento crônico de laboratório. * e ** representam diferenças em relação ao controle, com $p < 0,05$ e 0,01, respectivamente.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Concentrações dos produtos comerciais (p.c.) e ingredientes ativos (i.a.) por litro de água, utilizadas no teste definitivo agudo do penoxsulam associado ao óleo vegetal.....	38
Tabela 2	Concentrações das formulações comerciais na mistura de agrotóxicos por litro de água no teste definitivo de toxicidade aguda das misturas.....	40
Tabela 3	Mortalidade (%) cumulativa de girinos, <i>L. catesbeianus</i> em função do tempo no teste de toxicidade aguda definitivo com bentazon.....	51
Tabela 4	Médias das variáveis físicas e químicas da água (pH, condutividade e temperatura) no teste de toxicidade aguda do bentazon com <i>L. catesbeianus</i>	52
Tabela 5	Mortalidade (%) cumulativa de girinos, <i>L. catesbeianus</i> em função do tempo no teste de toxicidade aguda definitivo com penoxsulam + óleo vegetal.....	52
Tabela 6	Médias das variáveis físicas e químicas da água (pH, condutividade e temperatura) no teste de toxicidade aguda definitivo com penoxsulam + óleo vegetal com <i>L. catesbeianus</i> ...	53
Tabela 7	Mortalidade (%) cumulativa de girinos, <i>L. catesbeianus</i> em função do tempo no teste de toxicidade aguda definitivo com óleo vegetal.....	53
Tabela 8	Médias das variáveis físicas e químicas da água (pH, condutividade e temperatura) no teste de toxicidade aguda do óleo vegetal com <i>L. catesbeianus</i>	54
Tabela 9	Mortalidade (%) cumulativa de girinos, <i>L. catesbeianus</i> em função do tempo no teste de toxicidade aguda definitivo com a permetrina.....	54
Tabela 10	Médias das variáveis físicas e químicas da água (pH, condutividade e temperatura) no teste de toxicidade aguda da Permetrina com <i>L. catesbeianus</i>	55
Tabela 11	Mortalidade (%) cumulativa de girinos, <i>L. catesbeianus</i> em função do tempo no teste de toxicidade aguda definitivo com carbofuran.....	55

Tabela 12	Médias das variáveis físicas e químicas da água (pH, condutividade e temperatura) no teste de toxicidade aguda do carbofuran com <i>L. catesbeianus</i>	56
Tabela 13	Mortalidade (%) cumulativa de girinos, <i>L. catesbeianus</i> em função do tempo no teste de toxicidade aguda definitivo com a mistura de agrotóxicos.....	56
Tabela 14	Médias das variáveis físicas e químicas da água (pH, condutividade e temperatura) no teste de toxicidade aguda do carbofuran com <i>L. catesbeianus</i>	57
Tabela 15	Índice de segurança dos agrotóxicos avaliados para <i>L. catesbeianus</i>	58
Tabela 16	Médias e desvio padrão das variáveis físicas e químicas da água (pH, condutividade e temperatura) nos testes de toxicidade crônica <i>in situ</i>	58
Tabela 17	Resultados das análises da água realizadas no início e final do experimento II <i>in situ</i>	59
Tabela 18	Médias e desvio padrão de peso e taxa de sobrevivência dos girinos, ao final dos testes crônicos <i>in situ</i>	60
Tabela 19	Valores médios e erro padrão do eritrograma dos girinos durante o Experimento II <i>in situ</i>	63
Tabela 20	Média e erro padrão dos resultados da série branca (contagem total e diferencial de leucócitos) dos girinos durante o Experimento II <i>in situ</i>	65
Tabela 21	Médias e desvio padrão das variáveis físicas e químicas da água (pH, temperatura, condutividade, sólidos totais dissolvidos e oxigênio dissolvido) no teste de toxicidade crônica de laboratório	67
Tabela 22	Valores médios e erro padrão do eritrograma dos girinos durante o Experimento crônico de laboratório.....	70
Tabela 23	Média e erro padrão dos resultados da série branca (contagem total e diferencial de leucócitos) dos girinos durante o Experimento crônico de laboratório.....	73
Tabela 24	Quadro comparativo dos valores médios dos parâmetros hematológicos (série vermelha) de <i>Lithobates catesbeianus</i>	81

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1. Agrotóxicos estudados.....	19
2.1.1. <i>Bentazon</i>	20
2.1.2. <i>Penoxulam</i>	20
2.1.3. <i>Carbofuran</i>	21
2.1.4. <i>Permetrina</i>	22
2.2. Biomonitoramento.....	22
2.3. Biomarcadores.....	23
2.3.1 <i>Hematologia</i>	24
2.3.2. <i>Teste do micronúcleo</i>	25
2.4. Disruptores endócrinos.....	26
2.5. Anfíbios e poluição aquática.....	28
3. OBJETIVOS.....	31
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1. Área de estudo.....	33
4.2. Agroquímicos estudados.....	34
4.3. Aquisição dos animais.....	35
4.4. Toxicidade aguda dos agrotóxicos para girinos de <i>Lithobates catesbeianus</i> – Laboratório.....	36
4.4.1. <i>Toxicidade aguda do Bentazon</i>	36
4.4.2. <i>Toxicidade aguda do Penoxsulam</i>	37
4.4.3. <i>Toxicidade aguda do Óleo vegetal</i>	38
4.4.4. <i>Toxicidade aguda da Permetrina</i>	39
4.4.5. <i>Toxicidade aguda do Carbofuran</i>	39
4.4.6. <i>Toxicidade aguda da mistura de agrotóxicos</i>	39
4.5. Índice de segurança.....	40
4.6. Testes de sensibilidade para <i>Lithobates catesbeianus</i>.....	40
4.7. Avaliação <i>in situ</i>.....	41
4.7.1. Experimento I – <i>in situ</i> : Estudo preliminar para avaliar a eficiência de girino de rã-touro como bioindicador em campos de arroz irrigado.....	41
4.7.2. Experimento II – <i>in situ</i> : Teste definitivo de toxicidade crônica.....	44

4.8. Toxicidade crônica – Laboratório.....	48
4.9. Tratamento Estatístico.....	49
4.10. Destino dos resíduos.....	50
4.11. Ética animal.....	50
5. RESULTADOS.....	51
5.1. Toxicidade aguda dos agrotóxicos para girinos de <i>Lithobates catesbeianus</i> – Laboratório.....	51
5.1.1. Toxicidade aguda do herbicida Bentazon.....	51
5.1.2. Toxicidade aguda do Penoxsulam.....	52
5.1.3. Toxicidade aguda do Óleo vegetal.....	53
5.1.4. Toxicidade aguda da Permetrina.....	54
5.1.5. Toxicidade aguda do Carbofuran.....	55
5.1.6. Toxicidade aguda da mistura de agrotóxicos.....	56
5.2. Índice de segurança.....	57
5.3. Toxicidade crônica - Avaliação <i>in situ</i>	58
5.4. Toxicidade crônica dos agrotóxicos para girinos de <i>L. catesbeianus</i> – Laboratório.....	67
6. DISCUSSÃO.....	75
6.1. Toxicidade aguda e índice de segurança.....	75
6.2. Toxicidade crônica – Experimentos <i>in situ</i> e laboratório.....	77
6.3. Considerações finais.....	83
7. CONCLUSÕES.....	84
REFERÊNCIAS.....	85
ANEXO A.....	95
ANEXO B.....	96
ANEXO C.....	100

1. INTRODUÇÃO

A cultura do arroz irrigado é a principal atividade agrícola do Vale do Paraíba, possui grande importância econômica e social e apresenta o uso intenso de agroquímicos. Na maioria das lavouras, as aplicações desses agroquímicos são seguidas por inundação ou em muitos casos, os produtos são aplicados diretamente na lâmina d'água, especialmente alguns herbicidas e inseticidas. Dependendo do tipo de manejo da água adotado pelos produtores e das condições de precipitação pluviométrica, após as aplicações existe o risco dos resíduos dos agroquímicos serem carregados para fora da lavoura, afetando os organismos aquáticos nas águas a jusante, além da contaminação dos indivíduos presentes dentro da lavoura.

No meio rural também é muito comum a utilização de misturas de agrotóxicos para a diminuição dos custos de aplicação, correndo o risco de potencializar ainda mais a toxicidade para os organismos não alvo.

Atualmente há um crescente interesse no estudo de anfíbios devido aos recentes declínios e extinções populacionais. A contaminação química é considerada um dos principais fatores responsáveis pelo declínio dessas populações. Um grande grupo de contaminantes, tais como pesticidas e fertilizantes pode afetar os anfíbios e as consequências desta contaminação podem ser letais ou subletais atuando direta ou indiretamente.

A rã-touro, *Lithobates catesbeianus*, apesar de ser uma espécie exótica, foi introduzida no Brasil para produção em cativeiro na década de 30. Atualmente, a rã-touro possui grande importância em decorrência de seu emprego em criações comerciais em todo país, passando a ser intensivamente estudada, sob o ponto de vista biológico e de produção.

Esta espécie tem se mostrado uma ferramenta poderosa, principalmente nos estudos dos efeitos crônicos da poluição da água. Além disso, se revela como sentinela das adversidades ambientais, respondendo de maneira precoce às agressões do meio através de mecanismos de defesa sensíveis. Ao mesmo tempo, tem se demonstrado resistente às imposições da manutenção e à experimentação animal. A ranicultura garante atualmente a demanda experimental desta espécie, permitindo seu uso em todas as fases de seu desenvolvimento.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O Rio Paraíba do Sul abastece três Estados: Rio de Janeiro, Minas Gerais e São Paulo. Seus afluentes abastecem cidades, alimentam indústrias, irrigam lavouras, afastam esgotos, diluem resíduos lançados ao longo do seu leito, drenam culturas, sustentam a piscicultura, a ranicultura e a biodiversidade hídrica, permitindo o lazer e a prática de esportes náuticos e aquáticos (DELFINO, 2001).

No Vale do Paraíba, a cultura do arroz irrigado é de grande importância econômica e social, apresentando uso intenso de agroquímicos, especialmente herbicidas e inseticidas (MOREIRA et al. 2004), além de adubos químicos e do emprego esporádico de fungicidas.

Os campos de arroz, circundados por ambientes aquáticos e terrestres, compreendem um mosaico de ambiente em transformação que abrigam uma rica biodiversidade, mantida pela rápida colonização, bem como reprodução e crescimento dos organismos (HOOK, 1994). A lavoura arrozeira irrigada tem sido alvo de especulações quanto aos efeitos nocivos sobre a qualidade da água. Este sistema utiliza um grande volume de água para irrigação, no qual a inundação da área inicia-se já na fase de preparo de solo, ocorrendo aplicação de agroquímicos diretamente na lâmina de água. Além disso, as plantações estão sempre localizadas próximo aos cursos de água, de modo que há um grande potencial contaminante (PRIMEL et al., 2005).

Entre as diferentes culturas, o arroz apresenta um lugar de destaque ao nível do “potencial de contaminação das águas superficiais com produtos químicos de origem agrícola”. A extensa área cultivada, o elevado número de tratamentos fitossanitários efetuados ao longo do seu ciclo cultural, a aplicação de alguns pesticidas de elevada toxicidade para a biota aquática e sua estreita relação com o meio hídrico, são fatores decisivos para esta classificação. Uma vez aplicados, esses compostos químicos são sujeitos a uma série de processos de transformação e transporte. A lixiviação, a descarga e a drenagem são importantes processos com ação sobre o destino final dos pesticidas presentes na água dos canteiros de arroz. A lixiviação pode conduzir à contaminação das águas subterrâneas. A descarga e a drenagem permitem o movimento lateral destes produtos, nomeadamente quando a água é descarregada dos canteiros ou quando ocorrem chuvas intensas. Na maioria dos casos, essas águas passam para valas de descarga ou diretamente para cursos de água vizinhos, que

deságuam por sua vez, nos rios e mar. Efetivamente, a exposição da água a elevados níveis de pesticidas pode conduzir a mortalidade de peixes ou outros organismos aquáticos, com efeitos diretos ao nível das suas populações (PEREIRA, 2003).

Deve-se ainda salientar que no meio rural, com a intenção de economizarem nos custos de aplicação, é pratica comum dos agricultores realizarem a mistura de vários agrotóxicos, as chamadas “misturas de tanques”. Do ponto de vista de toxicidade estas misturas são altamente imprevisíveis, pois as substâncias podem interagir potencializando seus efeitos mutagênicos, carcinogênicos e danosos aos ecossistemas (FERRARO, 2009).

2.1. Agrotóxicos estudados

A aplicação de agroquímicos aos solos e culturas tornou-se uma pratica comum na agricultura, com o objetivo de aumentar o suprimento de nutrientes, corrigir o pH do solo (fertilizantes e corretivos) e a proteção das lavouras pelo controle de doenças e pragas (agrotóxicos) (RAMALHO et al., 2000).

Algumas moléculas requerem a incorporação ao solo a fim de reduzir as perdas por volatilização e fotodecomposição. Os herbicidas sofrem a ação de microorganismos presentes no solo. Além disso, a alta umidade e a temperatura ainda podem favorecer sua decomposição. Se não forem absorvidos pelas plantas, podem ficar fortemente adsorvidos à matéria orgânica presente na fração coloidal do solo, ser carregados pela água das chuvas e/ou irrigação ou, ainda, sofrer lixiviação, chegando ao lençol freático. Os processos de adsorção e lixiviação dos herbicidas são particularmente interessantes para o monitoramento e a previsão de impacto destes xenobióticos no ambiente aquático (ROMAN et al., 2007). Após atingirem os sedimentos, os contaminantes podem ser alterados por diversos processos químicos, físicos e biológicos, que podem aumentar ou diminuir o seu poder tóxico, ou ainda ocasionar a sua deposição ou liberação (MOURA et al., 2008), fazendo com que os sedimentos tornem-se não só um depósito, mas também uma fonte crônica e não pontual de contaminantes para as comunidades aquáticas (BURTON, 1992).

Diversos agroquímicos registrados são indicados para uso na cultura do arroz irrigado no Brasil (IRGA, 2001), mas existe a necessidade de estudos para a

avaliação dos efeitos que os agrotóxicos podem exercer sobre o ambiente e, consequentemente, sobre os organismos não alvo (NAKAGOME et al., 2007).

2.1.1. Bentazon

O bentazon ou 3-isopropyl-1H-2,1,3-benzothiadiazin-4(3H)-one-2,2-dioxide (BENTAZONA) 600 g/L (em sua formulação comercial), é um herbicida seletivo de ação não sistêmico do grupo químico da benzotiadiazinona. Seu uso é caracterizado principalmente por aplicação em pós-emergência, via pulverização sobre a lavoura. Seu modo de ação dá-se sobre o fotossistema II (FSII), impossibilitando a realização da fotossíntese pelo vegetal.

O bentazon é classificado pelo Ministério da Saúde como um produto extremamente tóxico (classe toxicológica I). Pelo Ministério do Meio Ambiente possui classificação do potencial de periculosidade ambiental III - produto perigoso ao meio ambiente. Este produto possui alto potencial de deslocamento nos solos e altamente persistente (BASF, 2012).

Um estudo conduzido no Vale do Rio Sacramento, no sudoeste dos Estados Unidos, mostrou a alta persistência do composto em águas subterrâneas. Mesmo passados alguns anos após a proibição do uso do bentazon na Califórnia, seus resíduos foram encontrados em 71% de amostras de água subterrânea em níveis que variaram de 0,01 a 20 µg/L (DAWSON, 1997), o que demonstra e confirma sua persistência ambiental.

2.1.2. Penoxsulam

O penoxsulam ou 3-(2,2-difluoroethoxy)-N-(5,8-dimethoxy[1,2,4]triazolo[1,5-c] pyrimidin-2-yl)-a,a,a-trifluorotoluene-2-sulfonamide. (Penoxsulam) 240 g/L (em formulação comercial), é um herbicida seletivo, de ação sistêmica do grupo químico Sulfonanilida Triazolopirimidina. Recentemente vem sendo utilizado por muitos produtores de arroz irrigado em todo Brasil.

Sua classificação toxicológica é II - altamente tóxico. Classificação do potencial de periculosidade ambiental III - produto perigoso ao meio ambiente.

Para a aplicação do penoxsulam é obrigatória a adição de adjuvante à calda, sendo que o mais indicado é o óleo vegetal (Ésteres de Ácidos Graxos de origem vegetal, 930 g/L) na proporção de 1:5.

2.1.3. Carbofuran

O carbofuran ou 2,3-dihydro-2,2-dimethylbenzofuran-7-yl methyl carbamate (CARBOFURANO) 50 g/kg (em formulação comercial), é um inseticida e nematicida sistêmico, do grupo químico Metilcarbamato de Benzofuranila.

Sua classificação toxicológica é III - mediantemente tóxico. Classificação do potencial de periculosidade ambiental II - produto muito perigoso ao meio ambiente.

Na cultura do arroz irrigado, a bicheira da raiz, atribuída às larvas do gorgulho aquático (*Oryzophagus oryzae*) é uma praga que inviabiliza a cultura (EPAGRI, 2007). Para o controle da bicheira da raiz a prática usual na Bacia do Rio Paraíba do Sul é a utilização de carbofuran. Este é um inseticida sistêmico, do grupo dos carbamatos, muito eficiente no controle de uma ampla gama de pragas agrícolas e que atua por contato ou após ingestão (MOREIRA et al. 2004).

O comportamento ambiental de um pesticida pode ser estimado pelas suas características físico-químicas e pelos seus metabólitos ou produtos de degradação formados. O carbofuran é um composto relativamente solúvel em água e é hidrolisado com facilidade em meio básico formando dióxido de carbono, 7-hidroxicarbofurano e metilamina. O principal metabólito do carbofuran, tanto em plantas quanto por ação microbiológica, é um produto de oxidação, o 3-hidroxicarbofurano, que também pode sofrer outras transformações e ser eliminado por exsudação ou sofrer conjugações. O uso na agricultura de produtos comerciais contendo carbofuran, nas dosagens recomendadas fornecem níveis detectáveis desses metabólitos (FMC, 1977).

Santiago (2001) analisou a presença de resíduos do inseticida-nematicida carbofuran e do seu metabólito 3-Hydroxycarbofuran, em amostras de água do Rio Paraíba do Sul e observou que as concentrações encontravam-se abaixo do nível estabelecido pelas agências internacionais para águas ambientais. Entretanto, a prática usual de subdosagem pode induzir à resistência de pragas, tornando-se necessário usar concentrações cada vez mais altas ou outros produtos, comprometendo o ambiente.

2.1.4. Permetrina

A permetrina ou 3-phenoxybenzyl (1RS,3RS;1RS,3SR)-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclo propanecarboxylate (PERMETRINA) 250 g/L é um inseticida e formicida do grupo químico dos Piretróides

Sua Classificação Toxicológica pelo Ministério da Saúde: Classe III – Medianamente Tóxico. Classificação Ambiental (Ministério do Meio Ambiente): Classe II – Muito Perigoso ao Meio Ambiente.

Keenan (2003) realizou um importante estudo para investigar se a permetrina e o endossulfam induziam a apoptose em timócitos de camundongos *in vitro* e, se a mistura desses inseticidas promovia citotoxicidade. Ambos, endossulfam e permetrina, induziram apoptose e seu efeito foi potencializado quando estes inseticidas foram combinados.

2.2. Biomonitoramento

Devido à complexidade e variabilidade dos compostos orgânicos e inorgânicos que alcançam um corpo hídrico, bem como, os efeitos sinérgicos, nem sempre é possível estabelecer normas com valores numéricos máximos de concentrações permissíveis de lançamento nos ambientes aquáticos, por meio apenas das análises físicas e químicas. Sendo assim, recomenda-se que a caracterização do sistema aquático tenha a capacidade de extrapolar estas análises. Neste sentido, a avaliação dos efeitos sobre os componentes biológicos, por meio de biomonitoramento e testes de toxicidade, representa uma forma mais efetiva para prever ou detectar impactos adversos. Enquanto as análises químicas identificam e quantificam alguns dos poluentes presentes, os bioensaios avaliam o efeito global destes sobre os sistemas bióticos, medindo a capacidade que os compostos químicos têm de interferir nas vias bioquímicas celulares, causando-lhes efeitos adversos (COSTA; ESPÍNDOLA, 2000).

Diversos autores salientam a importância da realização de testes de toxicidade com organismos aquáticos, considerando-os como um instrumento de alerta para um possível problema ambiental, uma vez que os xenobióticos podem ser transmitidos indiretamente a outros organismos (SCHVARTSMAN, 1991; ZAGATTO; GOLDSTEIN, 1991; ABEL, 1998; SALDIVA; BÖHM, 1998). Estes autores enfatizam ainda que os relatos de efeitos teratogênicos, mutagênicos e carcinogênicos dessas substâncias, embora dificilmente confirmados na espécie

humana, justificam a necessidade da realização de testes toxicológicos e, da complementação dos dados através de projetos de biomonitoramento no campo. A execução simultânea de tais procedimentos auxiliaria a detecção de agentes tóxicos na água que, por sua vez, desempenham efeitos, mesmo que sutis, sobre espécies não aquáticas, incluindo os seres humanos, seja por meio do consumo de água, ou através da cadeia alimentar.

O monitoramento de ecossistemas aquáticos não deve estar limitado apenas às análises do compartimento água. Também deve incluir o sedimento, uma vez que o ambiente sedimentar pode alterar a qualidade das águas quando substâncias naturais e de origem antropogênica, introduzidas no sistema, são liberadas para a coluna d'água, devido a mudanças (físicas, químicas e biológicas – bioturvação) das condições ambientais (ADAMS et al., 1992).

2.3. Biomarcadores

Para avaliar os impactos dos poluentes na qualidade ambiental é necessário que sejam mensurados os efeitos que estas substâncias causam nos organismos vivos destes ecossistemas (WELLS et al., 2001). Neste contexto, um grupo apropriado de respostas biológicas - marcadores biológicos ou biomarcadores - pode ser útil para determinar os efeitos na saúde da biota, além de identificar os estressores ou poluentes responsáveis por estes (FUENTES-RIOS et al., 2005).

Os biomarcadores podem ser definidos como alterações bioquímicas, celulares, moleculares ou mudanças fisiológicas nas células, fluidos corpóreos, tecidos ou órgãos de um organismo que são indicativos da exposição ou efeito de um xenobiótico (LAM; GRAY, 2003). Entre os numerosos biomarcadores ecotoxicológicos propostos nos últimos anos, aqueles baseados na resposta ao nível molecular e celular trazem informações sobre os primeiros sinais de perturbação ambiental e vêm sendo comumente usados em programas de biomonitoramento (NIGRO et al., 2006).

Como os aspectos comuns entre organismos diferentes se acentuam, principalmente, ao nível molecular, muitos biomarcadores moleculares possuem a vantagem de poderem ser aplicados a uma ampla variedade de organismos vivos (LAM; GRAY, 2003). Uma das características mais importantes dos biomarcadores molecular/celular é que sua avaliação antecipa mudanças nos altos níveis de organização biológica, isto é, população, comunidade ou

ecossistema. Antes da morte ou de manifestar doença, organismos podem responder ao stress, através de alterações moleculares ou celulares (MONSERRAT et al., 2003). A detecção e medição de efeitos sub-letais (uso de biomarcadores) vêm sendo favorecidas em relação à medição da mortalidade dos organismos em ensaios toxicológicos já que, na maioria dos ambientes, a exposição crônica aos agentes poluentes é significativa quanto aos efeitos sobre a biodiversidade, ocorrendo com maior frequência do que a mortalidade (MACEDO, 2007)

A importância da utilização de biomarcadores reside no fato do efeito medido ser uma alteração fisiológica detectada em curto prazo, antes do aparecimento dos efeitos mais drásticos sobre as estruturas, o crescimento, o comportamento e a reprodução do organismo (SARKAR et al., 2006). Desta forma, os biomarcadores podem ser usados de forma preditiva, permitindo que sejam tomadas ações de biorremediação antes que ocorram danos ambientais irreversíveis, com consequências ecológicas severas (CAJARAVILLE et al., 2000). Estes biomarcadores são de grande importância na avaliação da exposição e dos efeitos de diferentes contaminantes, tais como metais, xenobióticos orgânicos e compostos organometálicos, podendo ser medidos através de diferentes abordagens moleculares (ROSS et al., 2002). Podem, então, ser utilizados em estudos de campo que objetivam caracterizar áreas impactadas, onde uma complexa mistura de poluentes está normalmente presente (MONSERRAT et al., 2007).

2.3.1 Hematologia

Os parâmetros do sangue são considerados indicadores fisiohistopatológicos do corpo inteiro e, conseqüentemente, é um importante diagnóstico do status estrutural e funcional do animal exposto à substância tóxica. O sangue é uma excelente ferramenta com fundamental importância para a avaliação das condições fisiológicas, bioquímicas e patológicas nos animais, pois se encontra em contato com órgãos, tecidos e células e reage sensivelmente a todas as alterações que aí ocorrem (ADHIKARI et al., 2004).

O sangue dos anfíbios é composto por plasma e elementos figurados conhecidos como eritrócitos, leucócitos e trombócitos. Existe uma diferenciação hematológica conforme o sexo, espécie, fases da metamorfose, estado

nutricional, estação sazonal e temperatura (DUELLMAN; TRUEB, 1986). É observando quali e quantitativamente estes elementos que se pode estimar estado de saúde dos animais, refletindo através de seu aumento ou diminuição, problemas nutricionais (carências por alimentação inadequada em quantidade e/ou qualidade), má absorção intestinal, parasitoses, infecções, inflamações, estresse, distúrbios metabólicos, intoxicações, desidratações, hipóxia e outras anomalias. As variáveis da série vermelha, eritrograma, são de grande valia na identificação de processos anemiantes, enquanto o leucograma pode ser empregado como auxílio no diagnóstico dos processos infecciosos e outros estados de desequilíbrio homeostático, como a exposição a uma substância tóxica (RANZANI-PAIVA et al., 2004). A quantidade dos diferentes tipos de células sanguíneas circulantes constitui parâmetro importante para a detecção e a avaliação dos efeitos subletais de substâncias tóxicas (MADUENHO; MARTINEZ, 2008).

Essas respostas a variações do ambiente podem ser utilizadas em estudos de toxicidade e monitoramento, desde que padronizadas, uniformizadas e dirigidas para um propósito específico. A caracterização de variações hematológicas constitui-se, desta forma, em uma valiosa ferramenta na avaliação de risco ambiental (FERREIRA et al., 2003).

2.3.2. *Teste do micronúcleo*

Entre os métodos amplamente empregados como biomarcador de substâncias genotóxicas no ambiente e para detecção de mutações cromossômicas, destaca-se a análise de micronúcleos (SILVA et al., 2003).

Micronúcleos são formados por fragmentos de cromossomos acêntricos (efeito clastogênico) ou por cromossomos inteiros que não completaram a migração anafásica da divisão celular (efeito aneugênico) (PANTALEÃO et al., 2006), deixando de ser incorporados ao núcleo das células filhas durante a mitose. Estes pequenos fragmentos de cromatina, separados do núcleo principal, permanecerão durante toda a vida da célula e indicam quebra cromossômica ou disfunções do fuso mitótico, que podem ser ocasionadas por compostos tóxicos (BOLOGNESI et al., 2006).

Muitos dos compostos químicos lançados em ambientes aquáticos são genotóxicos, podendo causar mutagênese e até mesmo carcinogênese (OHE et

al., 2004). Por outro lado, o teste de micronúcleo, que avalia a frequência de formação destes pequenos fragmentos de cromatina, é uma técnica citogenética bem conhecida e facilmente aplicável para avaliar danos cromossômicos em diferentes organismos causados por estressores ambientais (BOLOGNESI et al., 2006). A metodologia utilizada para avaliar os micronúcleos é fácil e requer apenas o uso de um microscópio. Este teste consiste na contagem de células que contenham um ou mais micronúcleos citoplasmáticos (VIARENGO et al., 2007). Os eritrócitos periféricos têm sido mais comumente utilizados, pois evitam a complexidade associada aos procedimentos de preparação celular e sacrifício do animal. Além disso, a elevada taxa mitótica dos tecidos hematopoiéticos revela uma resposta rápida à exposição genotóxica, revelando os danos cromossômicos causados por esta exposição (BOLOGNESI et al., 2006).

O teste de micronúcleo tem sido amplamente utilizado em programas de biomonitoramento sendo uma valiosa ferramenta para avaliar exposições de organismos aquáticos a substâncias genotóxicas, uma vez que genotoxinas podem induzir mudanças no DNA que passam para gerações seguintes. Desta forma, o teste de micronúcleo é um importante sinalizador precoce de danos com consequências irreversíveis (FREIRE et al., 2008).

De acordo com Grisolia (2005), muitos agrotóxicos em uso apresentam risco de mutagenicidade, carcinogenicidade e teratogenicidade, sendo os organismos jovens freqüentemente mais sensíveis que os adultos e por este motivo, os testes de toxicidade devem, obrigatoriamente, empregar indivíduos nos primeiros estágios de desenvolvimento (USEPA, 2002).

2.4. Disruptores endócrinos

Disruptores endócrinos são agentes e substâncias químicas que promovem alterações no sistema endócrino e nos hormônios (WAISSMANN, 2002). Muitas destas substâncias são persistentes no ambiente, acumulam-se no solo e no sedimento de rios, são facilmente transportadas a longas distâncias, distribuindo-se ao longo da cadeia trófica, representando um sério risco à saúde daqueles que se encontram no topo da cadeia alimentar (MEYER et al, 1999).

Os disruptores podem ser substâncias orgânicas ou inorgânicas. Seu uso pode se dar tanto em áreas urbanas ou rurais e podem aparecer como resíduos ou subprodutos derivados de usos industriais dos mais diversos. São encontrados

em depósitos de lixo, contaminando solo, lençóis freáticos, mananciais de água para abastecimento público ou pela queima de resíduos hospitalares e industriais em incineradores (BAIRD, 2002).

Araújo (2005) realizou pesquisa para verificar a interferência dos inseticidas lamda-cialotrina, Carbaril e Metamidofós sobre o sistema endócrino de ratos, mimetizando ou inibindo efeitos hormonais. Resíduos destes inseticidas são encontrados em alimentos e os efeitos deletérios destas substâncias podem ser mais pronunciados nos seres em desenvolvimento (vida intra-uterina e lactente), quando a exposição ocorre através da difusão placentária e do leite materno. O trabalho concluiu que a ingestão diária aceitável de resíduos de pesticidas, proposta pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, mostrou-se segura para as variáveis avaliadas, quando estes pesticidas foram administrados de forma isolada. Porém, a exposição destes produtos concomitantemente pode induzir efeitos sinérgicos, reforçando a necessidade de investigações com misturas de pesticidas.

Até o momento, o debate sobre substâncias perturbadoras do sistema endócrino em sua maioria, girava em torno de esteróides gonadais, incluindo estrógenos e andrógenos, por causa da controvérsia quanto à sua eventual ligação a infertilidade, câncer de mama e baixas contagens de esperma. Assim, a tireóide tem recebido relativamente pouca atenção. Brucker-Davis (1998) analisou os efeitos de mais de 40 pesticidas e 45 produtos químicos industriais no eixo da tireóide. Esta análise confirmou a hipótese da perturbação da tireóide de animais de vida livre por substâncias químicas presentes no ambiente, apoiando a necessidade de estudos sobre compostos, já identificados como desreguladores tireóideanos, sobre a população humana e animais de laboratório.

A metamorfose dos anfíbios é controlada por hormônios da tireóide (TH), sendo mais amplamente estudada em anuros, principalmente devido à facilidade de utilização de algumas espécies em experimentos laboratoriais. O eixo da tireóide representa um alvo potencial de agentes químicos presentes no ambiente. Agentes tóxicos, produtos naturais e misturas complexas podem alterar a metamorfose, interagindo com o eixo da tireóide através de diversos mecanismos capazes de inibir os processos metamórficos de anfíbios em diferentes níveis bioquímico e molecular. Dessa forma, os anfíbios são ótimos modelos para representar possíveis perturbações da tireóide por químicos ou misturas

químicas, podendo ser extrapolados para outras espécies de vertebrados, incluindo a população humana (OECD, 2007).

2.5. Anfíbios e poluição aquática

Os anfíbios possuem sua pele em íntimo contato com vários componentes de seu ambiente natural – água, ar e solo. Esses organismos podem ser bons bioindicadores das condições ambientais, sendo especialmente úteis como indicadores da “saúde” geral de um ecossistema.

Há um crescente interesse no estudo de anfíbios devido aos recentes declínios e extinções populacionais (LA MARCA et al., 2005). Alguns fatores são propostos como as principais causas desses declínios, tais como a poluição de corpos d’água, radiação UV e doenças emergentes como as provocadas por vírus e fungos. Dentre estas a contaminação química é considerada um dos fatores principais responsáveis pelo declínio de populações de anfíbios (BLAUSTEIN et al., 2003). Um grande grupo de contaminantes, tais como pesticidas, herbicidas, fungicidas e fertilizantes pode afetar os anfíbios. As consequências desta contaminação química podem ser letais ou subletais e atuam direta ou indiretamente (MOREIRA et al. 2012).

Segundo Garcia et al. (2009), no Brasil poucos casos de declínio de anfíbios foram publicados até o momento, apesar de existirem relatos informais sobre muitas espécies antes abundantes e que hoje são dificilmente encontradas. O declínio de populações de anfíbios no país é pobremente documentado e pouco compreendido. Isto se deve, principalmente, à falta de conhecimento sobre a biologia das espécies, falta de estudos de monitoramento em longo prazo, associados à grande extensão territorial, diversidade de ambientes e alta riqueza.

Os anuros são dependentes de condições ambientais específicas e possuem pele permeável (SPARLING et al., 2000), o que permite o acúmulo de contaminantes químicos dissolvidos na água (DEGARADY; HALBROOK, 2006). É através da porosidade de sua pele que se processa a íntima relação destes animais com o meio externo, em especial o meio aquático, onde se estabelecem trocas gasosas e a manutenção hídrica, uma vez que sua hidratação ocorre através de sua pele em contato direto com a água (DUELLMAN; TRUEB, 1986). Cerca de 70% das espécies de anfíbios possuem o ciclo de vida com a formação de ovos e larvas aquáticas (SPARLING et al., 2000), o que os torna,

potencialmente, bons indicadores da qualidade da água. No entanto, o uso de espécies de anuros para monitoramento da qualidade da água não é comum, apesar de alguns estudos indicarem a efetividade do uso de espécies de anfíbios como indicadores biológicos (LEBBORONI et al., 2006).

A contaminação química pode afetar os anfíbios nos níveis de indivíduo, população e comunidade, e algumas evidências sugerem que contaminantes podem contribuir para declínios populacionais (BOONE et al., 2007). Se, por exemplo, o contaminante aumenta o tempo do período larval no ambiente aquático, torna os girinos mais susceptíveis aos predadores e a dessecação das poças, com a consequente diminuição do recrutamento de juvenis, levando ao declínio de uma população (BROOMHALL, 2002).

Os anfíbios anuros (semi-terrestres) permanecem intimamente ligados ao meio aquático. A água se faz importante para sua manutenção e é essencial para sua reprodução. Na temporada reprodutiva, geralmente no verão, a grande maioria das espécies procura águas calmas e rasas para deposição e fertilização de seus ovos. O desenvolvimento inicia-se imediatamente à fertilização, tornando-se cada ovo um embrião que, após alguns dias, emerge como uma pequena larva (girino) (STORER et al., 2002).

A rã-touro, anfíbio anuro da espécie *Lithobates catesbeianus*, apesar de ser uma espécie exótica, foi introduzida no Brasil para produção em cativeiro na década de 30 (FERREIRA et al., 2001) e, atualmente, encontra-se amplamente distribuída pelo território nacional, tanto em produções comerciais como na natureza.

Esta espécie tem se mostrado uma poderosa ferramenta nos estudos dos efeitos deletérios da poluição da água sobre um organismo aquático. Mais ainda, a rã-touro se revela como sentinela das adversidades ambientais, respondendo de maneira precoce às agressões do meio através de mecanismos de defesa sensíveis que, ao mesmo tempo, lhe permite resistir às imposições da manutenção e experimentação animal. Assim, considerando sua favorável contribuição aos estudos experimentais, de campo e laboratório, estes indivíduos representam uma espécie anfíbia com grande potencial experimental, devendo ser melhor explorada em investigações científicas como animal bioindicador das condições ambientais (BUENO-GUIMARÃES et al., 2001). Esta espécie também possui grande importância, em decorrência de seu emprego em criações

comerciais. Dado o interesse econômico que ela propicia ao país, passou a ser uma espécie intensivamente estudada, sob o ponto de vista biológico e de produção (FERREIRA, 2002).

Atualmente, a ranicultura garante a demanda experimental de *L. catesbeianus*, permitindo seu uso em todas as fases do seu desenvolvimento e nas mais variadas áreas de investigação científica. Finalmente, os avanços científicos no que diz respeito a um profundo conhecimento da biologia deste animal, certamente reverterão benefícios tecnológicos nos procedimentos da ranicultura, prática esta que, com presteza e qualidade, vem suprimindo a demanda científica experimental e acadêmica (BUENO-GUIMARÃES et al., 2001).

Este estudo poderá trazer informações sobre o impacto da descarga de agroquímicos, proporcionando um melhor entendimento das causas da toxicidade, auxiliando no estabelecimento de práticas adequadas de manejo na produção do arroz, de forma a minimizar o impacto ambiental desses poluentes nesses ambientes e nos corpos receptores, melhorando a qualidade das águas da bacia do rio Paraíba do Sul.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O objetivo principal deste estudo foi determinar o potencial de toxicidade de alguns dos principais agrotóxicos utilizados nas lavouras de arroz irrigado para girinos de *Lithobates catesbeianus*. Para realização deste estudo foi proposto os seguintes objetivos específicos:

3.2. Objetivos Específicos

- Determinar a CL_{50-96h} dos agrotóxicos bentazon, penoxsulam, óleo vegetal, permetrina e carbofuran, separadamente e de suas misturas, através de testes de toxicidade aguda para girinos de *L. catesbeianus*;
- Estabelecer os limites de concentrações de risco dos produtos avaliados, estimando seus índices de segurança;
- Avaliar efeitos crônicos destas substâncias presentes nas águas e sedimento, através de testes *in situ*, sobre o quadro hematológico, observando também o potencial mutagênico, através do teste do micronúcleo, e os efeitos sobre o eixo tireoideano, analisando a ação sobre a metamorfose dos girinos;
- Caracterizar a toxicidade crônica desses agrotóxicos separadamente e de suas misturas, através de testes em laboratório, para comparação com teste em campo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O processo metodológico empregado para o desenvolvimento do trabalho consiste nas seguintes etapas que serão explicadas mais detalhadamente a seguir:

- Determinação da sensibilidade dos girinos de *L. catesbeianus* aos principais agroquímicos utilizados na cultura do arroz. Consiste na realização de 6 ensaios de toxicidade aguda, determinando a CL_{50-96h} de formulações comerciais do bentazon, penoxsulam, óleo vegetal, permetrina, carbofuran separadamente e um último utilizando a mistura destes agroquímicos seguindo as proporções comumente utilizadas em campo.
- Exposição *in situ* dos girinos aos agrotóxicos em uma lavoura comercial de arroz. Realização de dois testes crônicos com a avaliação da qualidade da água.
- Realização de teste de toxicidade crônica em laboratório, utilizando as concentrações indicadas para o campo com cada agrotóxico separadamente, e da mistura dos 5 agrotóxicos.

A Figura 1 apresenta de forma esquematizada estes processos:

Figura 1 - Diagrama apresentando as etapas dos processos metodológicos empregados no estudo

4.1. Área de estudo

A propriedade escolhida para a realização dos testes foi uma lavoura comercial de referência na região do Médio Vale do Paraíba, município de Tremembé – SP, que utilizam os defensivos comumente aplicados, e realizam o manejo típico da cultura como na maioria das propriedades produtoras de arroz da região (Figura 2). Esta propriedade possui aproximadamente 100 hectares e produz cerca de 24.000 sacas de arroz/ano. A principal cultivar cultivada na propriedade é Epagri 109, destaca-se pelo excelente potencial em produtividade tendo alta capacidade de perfilhamento, boa qualidade de grãos, alto rendimento industrial e ciclo longo (142 dias). Junto com Epagri 108, foi a cultivar mais cultivada em todo Estado Catarinense, inclusive em outros Estados e países da América do Sul (VIEIRA et al. 2007).

Figura 2 – Imagem de satélite da propriedade onde foram realizados os estudos

A implantação do sistema de plantio pré-germinado tem como objetivos o controle do arroz vermelho, aumento da produtividade, redução dos custos de produção, e melhoria na qualidade industrial do arroz (EMBRAPA, 2005). O

sistema de plantio inicia-se em uma área previamente sistematizada e preparada, o que pode ser feito em presença de água ou em condições de solo seco, dependendo dos procedimentos adotados. Neste sistema utilizado na propriedade estudada a semeadura é realizada em solo com lâmina de água de 5 cm através de semeadora a lanço. De 5 a 7 dias após a semeadura, retira-se a água para auxiliar o processo de desenvolvimento do sistema radicular e, conseqüentemente, melhorar a fixação da planta ao solo. À medida que as plântulas forem se desenvolvendo a lâmina de água é retornada gradativamente, mantendo-a de 5 a 10 cm.

Para o controle de pragas e plantas daninhas, são pulverizados herbicidas e inseticidas cerca de 25 dias após a semeadura em solo drenado respeitando-se o mecanismo de ação dos agroquímicos. O quadro é inundado novamente, aumentando gradativamente a lâmina d'água conforme o desenvolvimento. A adubação de cobertura é realizada diretamente na água, momento em que é realizada a aplicação de outro inseticida diretamente na água. Durante o período de ação do inseticida a água de irrigação permanece estagnada por 5 a 6 dias (sem retirada da área). Posteriormente são realizadas verificações constantes de pragas e doenças e manutenção da lâmina de água, os agroquímicos são utilizados apenas em casos especiais de necessidade.

4.2. Agroquímicos estudados

Os agrotóxicos mais utilizados pelos produtores de arroz da região, objetos de análise deste estudo, foram as seguintes formulações comerciais:

- Herbicidas:
 - bentazon 600 g/L;
 - penoxsulam 240 g/L;
- Adjuvante:
 - óleo vegetal;
- Inseticidas:
 - permetrina 250 g/L e
 - carbofuran 50 g/Kg.

4.3. Aquisição dos animais

Os girinos de *Lithobates catesbeianus* foram adquiridos do Ranário Experimental e de Produção do Pólo da Agência Paulista de Tecnologia do Agronegócio - APTA Vale do Paraíba, localizado no município de Pindamonhangaba.

Os reprodutores foram mantidos em baias de manutenção até o período reprodutivo (meses de setembro à abril para a região), então levados ao setor de reprodução (Figura 3.A) para a obtenção das desovas naturalmente, sem a utilização de hormônios para a indução. Os ovos foram levados ao setor de desenvolvimento embrionário (Figura 3.B) e posteriormente para tanques de girinagem, para um crescimento mais adequado, permanecendo neste até o momento de serem utilizados nos ensaios.

Figura 3.A – Setor de reprodução. B – Setor de eclosão e desenvolvimento embrionário

Os animais, desde os reprodutores até a obtenção dos girinos no estágio adequado, não tinham contato com nenhum tipo de medicamento ou produto químico capazes de causar alguma alteração aguda ou crônica nos organismos. Apenas foram alimentados com ração comercial própria para rãs.

4.4. Toxicidade aguda dos agrotóxicos para girinos de *Lithobates catesbeianus* – Laboratório

Os testes de toxicidade aguda utilizando *Lithobates catesbeianus* foram conduzidos no Laboratório de Bioensaios do setor de aquicultura do Pólo APTA Vale do Paraíba, localizado dentro do próprio ranário experimental.

Foi determinada a CL₅₀ dos principais herbicidas e inseticidas utilizados na região. Sendo realizado um teste para cada agroquímico isoladamente, além da mistura destes produtos comerciais. Os herbicidas utilizados foram bentazon 600 g/L e penoxsulam 240 g/L; o óleo vegetal, amplamente usado como adjuvante, e os inseticidas permetrina 250 g/L e carbofuran. Os testes foram realizados seguindo a metodologia descrita abaixo:

Após o período de aclimação de 7 dias em sala climatizada, com controle de temperatura (25 ± 1 °C) e fotoperíodo (12:12), utilizando água de poço artesiano, são iniciados os testes seguindo as recomendações feitas pela American Society for Testing and Materials – ASTM (1980) e American Public Health Association – APHA (1999).

Para determinar a CL₅₀ dos girinos foram utilizados 6 animais por aquário (réplica), na densidade de 1 girino/L. Foram realizados testes preliminares para determinação das concentrações a serem usadas nos testes definitivos. Após testes preliminares foram determinadas 5 concentrações a serem usadas nos testes definitivos, mais um grupo controle, realizados com 3 réplicas simultâneas. Os girinos foram distribuídos aleatoriamente em cada aquário. Os testes tiveram duração de 96 horas, conduzidos em sistema estático e os organismos não foram alimentados durante este período. A avaliação da mortalidade foi diária e os indivíduos mortos foram retirados dos recipientes e descartados.

Para determinação da CL₅₀ foi utilizado o método Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON et al., 1977).

4.4.1. Toxicidade aguda do Bentazon

Após testes preliminares utilizando 6 concentrações diferentes, determinou-se 5 concentrações a serem usadas nos testes definitivos, mais o grupo controle. Para cada tratamento foram utilizadas 3 réplicas simultâneas, totalizando 18 aquários, com 6 animais cada. As concentrações utilizadas nos

testes definitivos foram 0,6; 1,2; 2,4, 4,8, 9,6 g/L do ingrediente ativo (i.a.). Os girinos com peso médio de $1,98 \pm 0,33$ g foram distribuídos aleatoriamente em cada aquário (Figura 4).

Figura 4 – Teste de toxicidade aguda com o herbicida bentazon

4.4.2. Toxicidade aguda do Penoxsulam

O penoxsulam (240 g/L) é um herbicida amplamente utilizado no cultivo do arroz irrigado. Em um teste preliminar, utilizando as concentrações: 24, 48 e 96 mg/L, não foi observada mortalidade em nenhum dos tratamentos.

Para a aplicação do penoxsulam é obrigatória a adição de adjuvante à calda, sendo que o mais indicado é o óleo vegetal (Ésteres de Ácidos Graxos de origem vegetal, 930 g/L). Desta forma, os testes agudos com esse herbicida foram realizados com a adição do adjuvante, na proporção comumente utilizada no campo (1:5). As concentrações dos produtos comerciais e ingredientes ativos, utilizadas no teste definitivo agudo do penoxsulam associado ao óleo vegetal encontram-se na Tabela 1.

Após aclimação 108 girinos, com peso médio de $1,68 \pm 0,17$ g foram aleatoriamente distribuídos em aquários contendo 6 L de solução. Foram utilizados 5 tratamentos mais o grupo controle, com 3 réplicas simultâneas.

Tabela 1 – Concentrações dos produtos comerciais (p.c.) e ingredientes ativos (i.a.) por litro de água, utilizadas no teste definitivo agudo do penoxsulam associado ao óleo vegetal

Concentração dos produtos comerciais por litro de água	Concentração dos ingredientes ativos por litro de água
Controle	Sem adição de agrotóxicos
12 µL de penoxsulam + 60 µL de óleo vegetal	2,88 mg/L de penoxsulam + 55,8 mg/L de óleo vegetal
18 µL de penoxsulam + 90 µL de óleo vegetal	4,32 mg/L de penoxsulam + 83,7 mg/L de óleo vegetal
24 µL de penoxsulam + 120 µL de óleo vegetal	5,76 mg/L de penoxsulam + 111,6 mg/L de óleo vegetal
30 µL de penoxsulam + 150 µL de óleo vegetal	7,20 mg/L de penoxsulam + 139,5 mg/L de óleo vegetal
36 µL de penoxsulam + 180 µL de óleo vegetal	8,64 mg/L de penoxsulam + 167,4 mg/L de óleo vegetal

4.4.3. Toxicidade aguda do Óleo vegetal

O óleo vegetal é um inseticida e adjuvante que, apesar de ser indicado apenas para cultura de citrus, é intensamente utilizado como adjuvante para a aplicação de diversos agrotóxicos em diferentes culturas no Brasil.

A determinação da CL_{50} apenas o óleo vegetal seria uma etapa importante, para posteriormente realizarmos os testes com a mistura dos agrotóxicos.

Os girinos com peso médio de $2,31 \pm 0,46$ g foram aclimatados. Após testes preliminares utilizando 6 concentrações diferentes, determinou-se 5 concentrações a serem usadas nos testes definitivos, mais um grupo controle. Para cada tratamento foram utilizadas 3 réplicas simultâneas, totalizando 18 aquários, com 6 animais cada, na densidade de 1 girino/L. As concentrações utilizadas nos testes definitivos foram 55,8; 83,7; 111,6; 139,5; 167,4 mg/L do ingrediente ativo, sendo o equivalente a 60; 90; 120; 150 e 180 µL/L do produto comercial.

4.4.4. Toxicidade aguda da Permetrina

Após testes preliminares utilizando as concentrações de 1; 10; 100 e 1000 µg/L do ingrediente ativo permetrina, foram estabelecidas 5 concentrações a serem usadas nos testes definitivos sendo elas: 10; 30; 90; 270 e 810 µg/L (i.a.) além do grupo controle. Girinos com peso médio de $2,57 \pm 0,30$ g, após aclimação foram distribuídos aleatoriamente nos 18 aquários.

4.4.5. Toxicidade aguda do Carbofuran

Foram realizados testes preliminares utilizando 5 concentrações diferentes do carbofuran 50 g/Kg, para a definição das 5 concentrações a serem utilizadas nos testes definitivos sendo elas: 0,2; 1; 5; 25; 125 mg/L (i.a.) além do grupo controle. Após aclimação, os girinos com peso médio de $1,64 \pm 0,19$ g, foram distribuídos aleatoriamente nos 18 aquários.

4.4.6. Toxicidade aguda da mistura de agrotóxicos

Para a realização dos testes de toxicidade aguda com a mistura de agrotóxicos, as concentrações foram determinadas de acordo com a proporção da dose indicada de cada agrotóxico para o campo. Também foram realizados testes preliminares utilizando 5 concentrações diferentes da mistura para a determinação das 5 concentrações utilizadas nos testes definitivos.

Os girinos com peso médio de $1,24 \pm 0,07$ g foram aclimatados e distribuídos nos aquários. Para cada tratamento foram utilizadas 3 réplicas simultâneas, totalizando 18 aquários, com 6 animais cada, na densidade de 1 girino/L.

A mistura dos agrotóxicos, em suas formulações comerciais, foi feita imediatamente antes da exposição aos animais. As concentrações de cada agrotóxico, utilizadas nos testes definitivos com a mistura estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Concentrações das formulações comerciais na mistura de agrotóxicos por litro de água no teste definitivo de toxicidade aguda das misturas

Tratamento	Concentração das formulações comerciais na mistura/L de água
Controle	Sem adição de agrotóxicos
Dose de campo	0,96 mg/L de bentazon + 0,048 mg/L de penoxsulam + 0,93 mg/L de óleo vegetal + 0,02 mg/L de permetrina + 0,4 mg/L de carbofuran
Dose de campo X 4	3,84 mg/L de bentazon + 0,19 mg/L de penoxsulam + 3,72 mg/L de óleo vegetal + 0,08 mg/L de permetrina + 1,6 mg/L de carbofuran
Dose de campo X 16	15,36 mg/L de bentazon + 0,77 mg/L de penoxsulam + 14,88 mg/L de óleo vegetal + 0,32 mg/L de permetrina + 6,4 mg/L de carbofuran
Dose de campo X 32	30,7 mg/L de bentazon + 1,54 mg/L de penoxsulam + 29,76 mg/L de óleo vegetal + 0,64 mg/L de permetrina + 12,8 mg/L de carbofuran
Dose de campo X 64	61,4 mg/L de bentazon + 3,07 mg/L de penoxsulam + 59,52 mg/L de óleo vegetal + 1,28 mg/L de permetrina + 25,6 mg/L de carbofuran

4.5. Índice de segurança

Com os resultados obtidos da CL_{50} foi calculado o índice de segurança de cada produto, empregando-se a análise de risco proposta por Solomon (1996). Este índice é estimado pela razão entre a CL_{50} e a concentração ambiental estimada (CAE), calculada pela dose recomendada pelo fabricante (EPAGRI, 2007) e considerando a lâmina de água de irrigação na lavoura de 10 cm (RESGALLA JUNIOR et al., 2002; POLEZA et al. 2008). Valores resultantes menores que 20 indicam produtos que apresentam potencial risco ecológico.

4.6. Testes de sensibilidade para *Lithobates catesbeianus*

A utilização de substâncias de referência em estudos de toxicologia é um procedimento rotineiro em teste de toxicidade aguda e crônica, com o objetivo de avaliar as condições de sensibilidade dos organismos-teste.

A avaliação da sensibilidade para *Lithobates catesbeianus* foi feita utilizando-se solução de NaCl, conduzidos de acordo com a mesma metodologia descrita para os testes de toxicidade aguda. Devido à sua recente implantação no laboratório, foram realizados apenas 5 testes de sensibilidade durante o período de realização dos testes agudos (2010-2012). Baseada nos resultados desses

testes com a substância de referência NaCl, foi construída uma carta-controle preliminar que está apresentada no Anexo A.

MCNULTY et al. (1999) afirmam que os laboratórios devem fazer os testes com substâncias de referência para avaliar a sensibilidade dos organismos testes, porém, acreditam que o uso de outros critérios de aceitabilidade de testes, como sobrevivência mínima, crescimento ou reprodução de organismos no controle experimental ao final do teste, fornecem informações mais úteis sobre a condição dos organismos-teste do que os dados gerados por testes de sensibilidade com substâncias de referência. Sendo assim, os ensaios foram validados no presente estudo quando o grupo controle apresentou taxa de sobrevivência igual ou superior a 80% das réplicas.

4.7. Avaliação *in situ*

4.7.1. Experimento I – *in situ*: Estudo preliminar para avaliar a eficiência de girino de rã-touro como bioindicador em campos de arroz irrigado

A propriedade escolhida para a realização dos testes foi uma lavoura comercial, localizada na região do Médio Vale do Paraíba, município de Tremembé, estado de São Paulo, que utilizam os defensivos comumente aplicados na cultura.

O experimento I *in situ* foi realizado durante a safra 2009/2010, em um quadro de aproximadamente 8.000 m² de área inundada (Figura 5). Após 25 dias do plantio de sementes pré-germinadas, tratadas previamente com fipronil, o quadro foi drenado para aplicação dos seguintes defensivos: herbicidas penoxsulam 240 g/L (150 mL/ha) + óleo vegetal (1 L/ha) como adjuvante, bentazon 600 g/L (2 L/ha) e o inseticida permetrina 250 g/L (100 mL/ha). Após três dias, o quadro foi novamente inundado, momento em que os girinos foram expostos.

Figura 5 – Imagem de satélite da área onde foram realizados os testes *in situ* preliminares

Foram expostos à água contaminada dentro do próprio quadro de arroz 200 girinos de rã-touro, *Lithobates catesbeianus*, em fase pré-metamorfose, estágio 31 de Gosner, 1960 (Figura 6) com peso médio de $4,31 \pm 0,47$ g. Dois dias após o início da exposição foi feita a aplicação do carbofuran (500g/ha) junto com a 1ª adubação N:P:K 20:0:20 (220 Kg/ha). Permanecendo durante 5 dias sem renovação de água para o aproveitamento máximo da ação do inseticida no local.

Figura 6 – Girinos de *L. catesbeianus* (estágio 31 de Gosner, 1960)

Foram utilizadas duas gaiolas teladas de forma a permitir o fluxo de água e o contato dos animais com o sedimento, conforme mostra a Figura 7.

Figura 7 – Gaiolas utilizadas para expor girinos de *L. catesbeianus* aos agrotóxicos da cultura do arroz irrigado

As gaiolas medindo 0,80 x 0,80 x 0,40 m foram fixadas próximas ao sedimento por meio de estacas, a fim de evitar o deslocamento das mesmas. Neste momento, outros 200 girinos foram mantidos, nas mesmas condições (grupo controle), em gaiola fixada em uma pequena represa existente na mesma propriedade, de onde a água que irriga o arroz é captada, sem a presença dos contaminantes. Os animais não foram alimentados durante o período experimental, sendo sua alimentação garantida pelo fito e zooplâncton existentes naturalmente no local.

Antes do início do teste (momento zero) e aos dias 3, 7, 10 e 14 de experimento foram retirados 6 animais de cada tratamento, anestesiados com anestesia local (Lidocaína) para coleta de amostras de sangue por punção do vaso caudal para realização do teste do micronúcleo em extensões sanguíneas segundo metodologia descrita por Grisolia e Cordeiro (2000).

Após 14 dias de exposição todos os animais foram retirados dos tanques, contados, pesados e classificados em relação ao estágio de metamorfose de acordo com a tabela de Gosner (1960), conforme mostra a Figura 8, para verificar uma possível desregulação do eixo tireoideano.

Figura 8 – Tabela de Gosner (1960), classificação dos estágios de desenvolvimento de anfíbios

4.7.2. Experimento II – *in situ*: Teste definitivo de toxicidade crônica

O Experimento II *in situ* foi realizado na mesma propriedade em Tremembé, durante a safra de 2010/2011, em um quadro de aproximadamente 4.000 m² de área inundada (Figura 9).

A programação do uso dos defensivos foi a mesma do ano anterior. A Figura 10 mostra o manejo utilizado para a aplicação dos agroquímicos durante o teste e desenvolvimento do arroz. Os animais foram expostos após 28 dias do plantio, no momento em que o quadro foi novamente inundado após a aplicação dos defensivos. Os girinos permaneceram dentro do campo de arroz por um período de 21 dias. 5 dias após o início da exposição foi aplicado o carbofuran juntamente com os fertilizantes e o quadro permaneceu sem circulação de água durante 6 dias.

Foram usadas gaiolas teladas fixadas dentro do campo de arroz, de modo que os girinos tinham acesso ao sedimento.

Figura 9 – Imagem de satélite da área onde foram realizados os testes *in situ* definitivos

Um grupo controle foi mantido nas mesmas condições, mas dentro do Ranário Experimental em Pindamonhangaba, simulando as condições dos campos de arroz. O arroz irrigado, da variedade utilizada na propriedade rural, foi cultivado no mesmo momento em uma pequena área de 2,5 x 10 m existente no ranário; desta forma, foi possível acompanhar o manejo realizado pelo produtor em Tremembé, controlando nível de água, podendo assim aumentar ou diminuir o fluxo, de acordo com o manejo que estava sendo adotado na produção comercial, mas sem a adição dos agrotóxicos.

Em cada tratamento (controle e produção comercial) utilizou-se 150 girinos, a partir o estágio 31 de Gosner (1960), com peso médio de $7,08 \pm 0,49$ g.

Análises hematológicas

Antes do início do teste (momento zero) e aos dias 3, 7, 10, 14 e 21 de experimento foram retirados 6 animais de cada tratamento, anestesiados com anestesia local (Lidocaína) para coleta amostras de sangue por punção do vaso caudal para a análise de genotoxicidade através do teste do micronúcleo e determinação dos parâmetros hematológicos:

1. Hematócrito (Ht), pelo método de microhematócrito, segundo Goldenfarb et al. (1971);
2. Taxa de hemoglobina (Hb), pelo método da cianometahemoglobina (COLLIER, 1944);
3. Contagem de eritrócitos (Er) ou número total de células, realizada em câmara de Neubauer, utilizando-se a solução de Hayem como diluente;
4. Cálculo dos índices hematimétricos absolutos (VCM, HCM e CHCM), segundo Wintrobe (1934);
5. Contagem total e diferencial de leucócitos segundo método descrito por Rosenfeld (1947).

As análises hematológicas estão mais detalhadas no ANEXO B.

Análise de genotoxicidade através do teste do micronúcleo

O teste do micronúcleo seguiu basicamente a metodologia descrita por Grisolia e Cordeiro (2000). O sangue obtido foi utilizado para a extensão sanguínea em lâmina. Após secas, as lâminas foram fixadas em metanol absoluto por 10 minutos e coradas pelo método Fuelgen/Fast Green adaptado para organismos aquáticos por Ferreira (2002) (ANEXO C). Foi realizada análise em teste cego, ao microscópio de luz para a contagem de micronúcleos em eritrócitos. Os micronúcleos foram considerados os corpúsculos que, em relação ao núcleo, apresentarem aproximadamente 1/3 do seu tamanho, ou menor, estando nitidamente separados, com bordas distinguíveis, mesma cor e refringência. A análise foi realizada em 2000 células de cada indivíduo e a seguir o número de micronúcleos expresso por 1000 células.

Os dois experimentos de campo seguiram basicamente a mesma programação de uso de agrotóxicos, nas mesmas dosagens e forma de aplicação. A metodologia utilizada para expor os animais e a forma de coleta dos dados nos permitiu analisar alguns dos resultados como repetição, auxiliando na interpretação dos resultados.

Figura 10 - Manejo para a aplicação dos agroquímicos durante o teste definitivo e desenvolvimento do arroz

Caracterização da água

Coleta das amostras

As amostras de água foram coletadas em três pontos da unidade produtora, sendo um no canal de abastecimento, um na entrada e um na saída do quadro de arroz em estudo, antes e após a aplicação dos agrotóxicos comumente utilizados, além do monitoramento da água utilizada para o grupo controle.

A forma de coleta das amostras de água, sua preservação para análises físico-químicas e a definição dos parâmetros determinados em campo, seguiram os critérios apresentados na Norma Técnica da ABNT *NBR 9898 – “Preservação e técnicas de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores”* (ABNT, 1987).

Caracterização físico-química da água

As variáveis da água (pH, temperatura, condutividade elétrica e sólidos totais dissolvido) foram determinadas em campo com uma sonda multiparamétrica, HANNA modelo HI 98129.

A água coletada no campo foi encaminhada ao Laboratório de Ecotoxicologia do Departamento de Biotecnologia da Faculdade de Engenharia de Lorena – USP para a determinação dos seguintes parâmetros: oxigênio dissolvido (titulometria) seguindo a metodologia descrita na Norma Técnica L5.169 da CETESB (1978); Demanda Química de Oxigênio (DQO) por espectrofotometria, segundo o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater Analysis* (APHA, 1999); Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) segundo a norma L5.120 CETESB (1991); dureza por titulação do EDTA; Turbidez, determinada com turbidímetro (TECNOPON mod. TB 1000); e os íons amônio, nitrato, nitrito em cromatógrafo de íons (METROHM, modelo 850 Professional IC).

4.8. Toxicidade crônica – Laboratório

Para o experimento de toxicidade crônica, a aclimação dos animais foi realizada da mesma maneira que o teste de toxicidade aguda. 360 girinos com peso médio de $5,95 \pm 1,72$ g foram coletados aleatoriamente no tanque de aclimação e transferidos para 24 aquários com capacidade de 15 L dotados de aeração artificial. A densidade utilizada foi de 1 girino/L. Os animais foram

divididos em 6 grupos, com 4 replicas simultâneas, sendo um grupo controle (C) com água proveniente de poço artesiano, e 5 tratamentos com os soluções contendo os agrotóxicos: T1 - bentazon, T2 – penoxsulam + óleo vegetal, T3 - permetrina, T4 - carbofuran e, T5 - mistura destes agrotóxicos. As concentrações utilizadas foram baseadas nas concentrações utilizadas no campo, considerando a dose recomendada pelo fabricante e a lâmina de água de irrigação na lavoura de 10 cm.

O experimento foi conduzido em sistema semi-estático, com duração de 21 dias e renovação das soluções a cada 96 horas, sendo que 24 horas antes desta renovação os animais foram alimentados. Os parâmetros físicos e químicos da água (pH, oxigênio dissolvido, condutividade elétrica e temperatura) foram aferidos semanalmente. A cada 24 horas, os animais que vieram a óbito foram retirados e o volume de água no aquário foi adequado para a manutenção da densidade inicial.

Antes do início do teste (momento zero) e aos dias 3, 10 e 21 de experimento foram retirados 2 animais de cada aquário (8 animais/tratamento), anestesiados com anestesia local (Lidocaína) para coleta de amostras de sangue através da punção do vaso caudal para a análise de genotoxicidade através do teste do micronúcleo e determinação dos parâmetros hematológicos:

- Hematócrito (Ht), pelo método de microhematócrito;
- Taxa de hemoglobina (Hb), pelo método da cianometahemoglobina;
- Contagem de eritrócitos (Er) ou número total de células, realizada em câmara de Neubauer, utilizando-se a solução de Hayem como diluente;
- Cálculo dos índices hematimétricos absolutos (VCM, HCM e CHCM);
- Contagem total e diferencial de leucócitos em extensões sanguíneas;

4.9. Tratamento Estatístico

Para o cálculo da CL_{50-96h} foi utilizado o método estatístico "Trimmed Spearman-Kärber" (HAMILTON et al., 1977).

A avaliação dos resultados obtidos nos testes de toxicidade crônica foi realizada através da comparação entre as observações do grupo controle e aquelas registradas nos tratamentos. Os dados dos testes foram submetidos primeiramente aos testes de normalidade e homogeneidade. As comparações entre os dados numéricos realizadas através de Análises de Variância (ANOVA),

com utilização de testes paramétricos ou não paramétricos, dependendo da natureza de cada observação (LOMBARDI, 2004). As diferenças entre os grupos foram analisadas utilizando o teste de Tuckey.

No teste do Micronúcleo, devido a inflação de zeros, os dados originais foram somados a constante 1,5, o resultado foi então submetido a $\log_{10}$. Esta constante foi determinada de modo a retirar os zeros entre os dados e atingir o pressuposto de homocedasticidade. Após transformação, os dados foram submetidos a Teste-t ou Mann-Whitney, comparando cada tratamento ao controle, nos diferentes tempos.

Para as análises hematológicas os dados foram somados a constante 1,0, e o resultado submetido a $\log_{10}$. Os dados também foram submetidos ao Teste-t ou Mann-Whitney, comparando cada tratamento ao controle.

As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$ (ZAR, 1999).

4.10. Destino dos resíduos

A água utilizada nos testes de toxicidade contendo os agrotóxicos, após o período de experimentação foram condicionadas em bombonas plásticas e encaminhadas para a propriedade onde os testes foram realizados para serem reutilizadas na própria plantação.

Os resíduos biológicos tais como seringas, agulhas, lâminas utilizadas e animais mortos, após congelamento, foram retirados pela Empresa Pioneira através de acordo com a Prefeitura Municipal de Pindamonhangaba e posteriormente incinerados junto ao lixo hospitalar.

4.11. Ética animal

Os estudos desenvolvidos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Pesca de São Paulo, SP (CEEAI), (Protocolo N°. 004/09).

5. RESULTADOS

5.1. Toxicidade aguda dos agrotóxicos para girinos de *Lithobates catesbeianus* – Laboratório

5.1.1. Toxicidade aguda do Bentazon

Após testes preliminares utilizando 6 concentrações diferentes do herbicida, foram determinadas as 5 concentrações a serem usadas no teste agudo definitivo. A taxa de mortalidade em porcentagem cumulativa do teste definitivo é apresentada na Tabela 3.

Tabela 3 - Mortalidade (%) cumulativa de girinos, *L. catesbeianus* em função do tempo no teste de toxicidade aguda definitivo com bentazon

Concentração mg/L (Bentazon)	TEMPO (Horas)	24			48			72			96		
	Réplicas	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
	Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16,7	0	0
600		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1200		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2400		0	0	33,3	0	0	33,3	0	0	33,3	0	0	33,3
4800		50	66,7	16,7	66,7	66,7	16,7	66,7	66,7	16,7	66,7	66,7	16,7
9600		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Utilizando-se o método Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON et al., 1977) foi determinada a CL_{50-96h} de 4530,00 mg do ingrediente ativo (i.a.)/L do bentazon para girinos de *L. catesbeianus*, indicando baixa toxicidade.

As médias das variáveis físicas e químicas da água (pH, condutividade e temperatura) monitoradas diariamente durante o teste agudo definitivo estão apresentadas na Tabela 4.

As médias da condutividade elétrica apresentaram-se elevadas, principalmente nas concentrações mais altas do herbicida. As demais variáveis permaneceram nas faixas adequadas para os organismos.

Tabela 4 – Médias das variáveis físicas e químicas da água (pH, condutividade e temperatura) no teste de toxicidade aguda do bentazon com *L. catesbeianus*

		pH	Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
	Concentração mg/L (Bentazon)			
	Controle	7,11 $\pm$ 0,08	13,50 $\pm$ 3,56	26,42 $\pm$ 0,24
	600	7,08 $\pm$ 0,07	163,83 $\pm$ 1,60	26,05 $\pm$ 0,12
	1200	7,05 $\pm$ 0,14	309,17 $\pm$ 5,15	26,05 $\pm$ 0,12
	2400	7,00 $\pm$ 0,16	586,50 $\pm$ 2,74	25,92 $\pm$ 0,17
	4800	7,16 $\pm$ 0,23	1149,00 $\pm$ 7,54	25,90 $\pm$ 0,25
	9600	7,06 $\pm$ 0,08	2196,67 $\pm$ 4,04	26,00 $\pm$ 0,25

Estas concentrações são muito elevadas em comparação com as comumente utilizadas nos campos de arroz, indicando resistência dos girinos de *L. catesbeianus* aos efeitos agudos desta substância.

5.1.2. Toxicidade aguda do Penoxsulam

A adição de adjuvante à calda para a aplicação do penoxsulam é obrigatória. O óleo vegetal (Ésteres de Ácidos Graxos de origem vegetal, 930 g/L) o indicado como sendo o adjuvante que apresenta melhores resultados.

Determinou-se 5 concentrações a serem usadas nos testes definitivos com o penoxsulam associado ao óleo vegetal, mais um grupo controle. Os resultados de mortalidade (porcentagem cumulativa) obtidos nos testes definitivos estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Mortalidade (%) cumulativa de girinos de *L. catesbeianus*, em função do tempo, no teste de toxicidade aguda definitivo com penoxsulam + óleo vegetal

Concentração (mg/L) penoxsulam + óleo vegetal	Repetições	TEMPO (Horas)											
		24			48			72			96		
		A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
	Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2,88 + 55,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4,32 + 83,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5,76 + 111,6	0	0	0	0	0	16,7	0	0	16,7	0	0	16,7
	7,20 + 139,5	0	0	16,7	0	0	33,3	16,7	0	33,3	16,7	0	33,3
	8,64 + 167,4	66,7	50	66,7	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Foi determinada a $\text{CL}_{50-96\text{h}}$ de 7,52 mg de penoxsulam + 145,66 mg do óleo vegetal i.a./L para girinos de *L. catesbeianus*.

As médias das variáveis físicas e químicas da água (pH, condutividade e temperatura) monitoradas durante o teste agudo definitivo estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6 - Médias das variáveis físicas e químicas da água (pH, condutividade e temperatura) no teste de toxicidade aguda definitivo com penoxsulam + óleo vegetal com *L. catesbeianus*

Concentração (mg/L) peróxido de hidrogênio + óleo vegetal	Características			
		pH	Condutividade ($\mu\text{S/cm}$)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
Controle		$6,81 \pm 0,23$	$26,00 \pm 6,23$	$24,32 \pm 1,25$
2,88 + 55,8		$6,78 \pm 0,18$	$23,17 \pm 2,40$	$24,27 \pm 1,47$
4,32 + 83,7		$6,69 \pm 0,23$	$25,00 \pm 2,10$	$24,23 \pm 1,51$
5,76 + 111,6		$6,67 \pm 0,33$	$22,33 \pm 1,51$	$24,23 \pm 1,55$
7,20 + 139,5		$6,62 \pm 0,32$	$22,67 \pm 0,52$	$24,20 \pm 1,58$
8,64 + 167,4		$6,59 \pm 0,34$	$20,67 \pm 1,03$	$24,21 \pm 1,59$

As variáveis da água deste teste agudo, não apresentaram variações entre os tratamentos.

5.1.3. Toxicidade aguda do Óleo vegetal

Após testes preliminares utilizando 6 concentrações diferentes, observou-se elevadas taxas de mortalidades já nas primeiras 24 horas de experimento.

Determinou-se 5 concentrações a serem usadas nos testes definitivos, mais um grupo controle. Os resultados de mortalidade (porcentagem cumulativa) obtidos nos testes definitivos estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Mortalidade (%) cumulativa de girinos, *L. catesbeianus* em função do tempo no teste de toxicidade aguda definitivo com óleo vegetal

		TEMPO (Horas)											
		24			48			72			96		
Concentração (mg/L) Óleo vegetal	Réplicas	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
	Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	55,8	0	0	0	0	0	16,7	0	0	16,7	0	16,7	33,3
	83,7	16,7	50	50	16,7	50	50	33,3	50	50	33,3	50	50
	111,6	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	139,5	83,3	100	83,3	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	167,4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Utilizando-se o método Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON et al., 1977) foi determinada a CL_{50-96h} de 81,57 mg i.a./L (87,71 µL do produto comercial (p.c.)/L) para girinos de *L. catesbeianus*.

As médias das variáveis físicas e químicas da água no teste de toxicidade aguda definitivo do óleo vegetal estão apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8 – Médias das variáveis físicas e químicas da água (pH, condutividade e temperatura) no teste de toxicidade aguda do óleo vegetal com *L. catesbeianus*

Concentração (mg/L) (Óleo vegetal)	pH				Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
Controle	7,17 $\pm$ 0,04	23,67 $\pm$ 3,17	25,90 $\pm$ 0,33			
55,8	7,06 $\pm$ 0,06	20,50 $\pm$ 3,32	25,62 $\pm$ 0,36			
83,7	6,93 $\pm$ 0,05	22,58 $\pm$ 2,27	25,50 $\pm$ 0,34			
111,6	6,88 $\pm$ 0,10	28,67 $\pm$ 5,13	25,03 $\pm$ 0,06			
139,5	6,96 $\pm$ 0,07	20,40 $\pm$ 1,14	25,36 $\pm$ 0,55			
167,4	6,94 $\pm$ 0,03	24,33 $\pm$ 1,15	25,03 $\pm$ 0,06			

As variáveis da água permaneceram sem alterações significativas, neste teste agudo.

5.1.4. Toxicidade aguda da Permetrina

Baseado nos testes preliminares com 6 concentrações diferentes da permetrina, foram determinadas as 5 concentrações a serem usadas no teste agudo definitivo. O resultado da mortalidade em porcentagem cumulativa do teste definitivo está apresentado na Tabela 9.

Tabela 9 - Mortalidade (%) cumulativa de girinos de *L. catesbeianus*, em função do tempo, no teste de toxicidade aguda definitivo com a permetrina

		24			48			72			96		
TEMPO (Horas)													
Concentração (mg/L) Permetrina	Réplicas	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
	Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0,01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0,03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0,09	0	0	0	16,7	50	50	16,7	50	50	16,7	50	50
	0,27	0	0	0	83,3	100	83,3	100	100	100	100	100	100
	0,81	0	0	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100

A CL_{50-96h} da permetrina determinada neste estudo para girinos de *L. catesbeianus* foi de 0,102 mg/L.

As médias das variáveis físicas e químicas da água (pH, condutividade e temperatura) monitoradas diariamente durante o teste agudo definitivo com a permetrina estão apresentadas na Tabela 10.

Tabela 10 - Médias das variáveis físicas e químicas da água (pH, condutividade e temperatura) no teste de toxicidade aguda da Permetrina com *L. catesbeianus*

Concentração mg/L (Permetrina)	pH		Condutividade ($\mu S/cm$)	Temperatura ($^{\circ}C$)
	Controle			
		$7,29 \pm 0,07$	$15,00 \pm 1,00$	$24,84 \pm 1,05$
0,01		$7,17 \pm 0,04$	$15,33 \pm 2,52$	$24,66 \pm 1,12$
0,03		$7,13 \pm 0,02$	$17,00 \pm 2,65$	$24,68 \pm 1,10$
0,09		$7,11 \pm 0,05$	$23,33 \pm 2,08$	$24,70 \pm 1,11$
0,27		$7,16 \pm 0,06$	$23,67 \pm 4,04$	$24,70 \pm 1,16$
0,81		$7,16 \pm 0,02$	$22,33 \pm 2,89$	$24,82 \pm 1,05$

Um pequeno aumento da condutividade elétrica nas concentrações mais elevadas da permetrina não foi suficiente para interferir nos resultados dos testes.

5.1.5. Toxicidade aguda do Carbofuran

Após testes preliminares, foram determinadas as 5 concentrações do inseticida a serem usadas no teste agudo definitivo. Os resultados da mortalidade em porcentagem cumulativa do teste agudo definitivo com o carbofuran estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Mortalidade (%) cumulativa de girinos, *L. catesbeianus* em função do tempo no teste de toxicidade aguda definitivo com carbofuran

		TEMPO (Horas)											
		24			48			72			96		
		A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Concentração (mg/L) carbofuran	Repetições												
	Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	16,7	0	0	16,7	0	0	16,7	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	25	16,7	16,7	0	16,7	16,7	0,0	33,3	16,7	0	83,3	16,7	0
	125	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

A CL_{50-96h} do carbofuran determinada para girinos de *L. catesbeianus* foi de 29,90 mg/L.

As médias das variáveis físicas e químicas da água (pH, condutividade e temperatura) monitoradas durante o teste agudo definitivo com o carbofuran estão apresentadas na Tabela 12.

Tabela 12 - Médias das variáveis físicas e químicas da água (pH, condutividade e temperatura) no teste de toxicidade aguda do carbofuran com *L. catesbeianus*

		pH	Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
Concentração mg/L (carbofuran)	Controle	6,88 $\pm$ 0,15	18,50 $\pm$ 2,43	24,93 $\pm$ 1,20
	0,2	6,69 $\pm$ 0,06	17,83 $\pm$ 1,94	24,98 $\pm$ 1,22
	1	6,75 $\pm$ 0,03	17,00 $\pm$ 1,26	24,99 $\pm$ 1,22
	5	6,46 $\pm$ 0,31	16,67 $\pm$ 1,37	24,93 $\pm$ 1,20
	25	6,68 $\pm$ 0,20	19,67 $\pm$ 5,72	24,92 $\pm$ 1,20
	125	6,58 $\pm$ 0,03	21,33 $\pm$ 1,15	24,93 $\pm$ 1,20

As variáveis da água deste teste agudo, não apresentaram variações significativas entre os tratamentos.

5.1.6. Toxicidade aguda da mistura de agrotóxicos

Para o teste de toxicidade aguda com a mistura de agrotóxicos, as concentrações foram baseadas na proporção da dose de campo indicada de cada agrotóxico. A partir desta proporção e dos resultados dos testes preliminares foram determinadas as 5 concentrações da mistura a serem utilizados nos testes definitivos. Os resultados da mortalidade em porcentagem cumulativa, do teste agudo definitivo com a mistura dos agrotóxicos, estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 - Mortalidade (%) cumulativa de girinos de *L. catesbeianus*, em função do tempo, no teste de toxicidade aguda definitivo com a mistura de agrotóxicos

		TEMPO (Horas)											
		24			48			72			96		
		A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Concentração Mistura de agrotóxicos	Repetições												
	Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	D.C.*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	D.C. x 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	D.C. x 16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	D.C. x 32	0	0	0	0	16,7	33,3	0	16,7	50	0	16,7	50
	D.C. x 64	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

* D.C. = Dose de campo: 0,96 mg/L de bentazon + 0,048 mg/L de penoxsulam + 0,93 mg/L de óleo vegetal + 0,02 mg/L de permetrina + 0,4 mg/L de carbofuran

Utilizando-se o método Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON et al., 1977) foi determinada a CL_{50-96h} de 38,79 vezes a dose de campo indicada para a mistura de agrotóxicos, ou seja, 37,24 mg/L de bentazon + 1,86 mg/L de penoxsulam + 36,07 mg/L de óleo vegetal + 0,78 mg/L de permetrina + 15,52 mg/L de carbofuran (ingredientes ativos de cada produto).

As médias das variáveis físicas e químicas da água (pH, condutividade e temperatura) monitoradas durante o teste agudo definitivo com a mistura de agrotóxicos estão apresentadas na Tabela 14.

Tabela 14 - Médias das variáveis físicas e químicas da água (pH, condutividade e temperatura) no teste de toxicidade aguda do carbofuran com *L. catesbeianus*

		pH	Condutividade ($\mu S/cm$)	Temperatura ($^{\circ}C$)
Concentração de agrotóxicos	Controle	7,09 $\pm$ 0,04	39,00 $\pm$ 1,67	24,23 $\pm$ 1,57
	D.C.*	7,06 $\pm$ 0,10	38,67 $\pm$ 1,37	24,23 $\pm$ 1,59
	D.C. x 4	7,08 $\pm$ 0,14	39,00 $\pm$ 2,00	24,12 $\pm$ 1,76
	D.C. x 16	7,09 $\pm$ 0,16	42,83 $\pm$ 1,33	24,10 $\pm$ 1,79
	D.C. x 32	7,09 $\pm$ 0,15	43,83 $\pm$ 1,72	24,18 $\pm$ 1,67
	D.C. x 64	7,08 $\pm$ 0,14	63,33 $\pm$ 1,53	24,21 $\pm$ 1,61

* **D.C. = Dose de campo:** 0,96 mg/L de bentazon + 0,048 mg/L de penoxsulam + 0,93 mg/L de óleo vegetal + 0,02 mg/L de permetrina + 0,4 mg/L de carbofuran

Um pequeno aumento da condutividade elétrica, nas concentrações mais elevadas dos agrotóxicos, não foi suficiente para interferir nos resultados dos testes.

5.2. Índice de segurança

A Tabela 15 apresenta o risco ecológico dos produtos avaliados no presente estudo. A concentração ambiental estimada (CAE) apresentada foi calculada considerando uma lâmina de água de 10 cm e a dose máxima indicada do produto (EPAGRI, 2007). Quanto maior o valor do índice de segurança, menor seria o risco desses produtos causarem efeito letal sobre os organismos. O risco ecológico (menor que 20) foi confirmado apenas para o inseticida permetrina.

Tabela 15 – Índice de segurança dos agrotóxicos avaliados para *L. catesbeianus*

Agrotóxico	Dose indicada (p.c./ha) ¹	Dose indicada (i.a./ha)	Concentração ambiental estimada (mg/L de água)	CL _{50-96h} (mg/L)	Índice de Segurança ²
Bentazon	1,6 L	960 g	0,96	4530,00	4718,75
Penoxsulam	200 mL	48 g	0,05	7,52	150,40
Óleo Vegetal	1 L	930 g	0,93	81,57	87,71
Permetrina	80 mL	20 g	0,02	0,10	5,05*
Carbofuran	8 Kg	400 g	0,40	29,90	74,75
Mistura	-	-	D.C.	38,79 x D.C.	38,79

p.c. = Produto comercial

i.a. Ingrediente ativo

¹ EPAGRI (2007)² SOLOMON (1996). Índice de segurança = CL₅₀/concentração estimada

*Risco de impacto ecológico

D.C.= Dose de campo: 0,96 mg/L de bentazon + 0,048 mg/L de penoxsulam + 0,93 mg/L de óleo vegetal + 0,02 mg/L de permetrina + 0,4 mg/L de carbofuran

5.3. Toxicidade crônica - Avaliação *in situ*

Na Tabela 16 então apresentados os resultados de temperatura, pH e condutividade média da água durante os testes I (safra de 2009) e II (safra de 2010) *in situ*. Além das temperaturas obtidas em ocasião das coletas de água para análise (médias), foram observadas as temperaturas máximas e mínimas durante todo o período de exposição.

Tabela 16 - Médias e desvio padrão das variáveis físicas e químicas da água (pH, condutividade e temperatura) nos testes de toxicidade crônica *in situ*.

	pH	T°C (°C)	Condutividade (µS/cm)	T°C mínima	T°C máxima
Controle I	6,71 ± 0,28	23,47 ± 1,18	11,33 ± 0,82	23,13	30,25
Controle II	6,55 ± 0,13	23,60 ± 2,43	45,83 ± 8,47	18,67	36,00
Campo de Arroz I	6,60 ± 0,41	23,93 ± 3,03	55,33 ± 66,67	18,40	32,40
Campo de Arroz II	6,88 ± 0,49	24,90 ± 3,74	55,17 ± 62,82	18,00	36,00

A Figura 11 mostra a variação da condutividade elétrica da água durante os testes *in situ*. Observa-se a elevação brusca logo após a aplicação dos

fertilizantes com o carbofuran, voltando aos padrões normais cerca de 4 a 6 dias após a aplicação desses produtos.

Figura 11 – Condutividade elétrica da água durante os testes I e II *in situ*

Os demais resultados das análises da água, realizados no início e no final do experimento II *in situ*, estão apresentados na Tabela 17.

Tabela 17 – Resultados das análises da água realizadas no início e final do experimento II *in situ*

	Inicial				Final			
	Entrada na propriedade	Entrada no quadro	Saída do quadro	Controle (ranario)	Entrada na propriedade	Entrada no quadro	Saída do quadro	Controle (ranario)
pH	7,1	7,6	7,81	6,67	6,81	6,82	6,93	6,56
Temperatura (°C)	25,6	25,7	30,5	21,2	26,5	27,2	28,1	26,1
STD (ppm)	10	9	8	20	9	10	9	21
Condutividade (µS)	23	19	16	41	18	19	18	42
Dureza (mg/L CaCO ₃)	16,53	37,19	47,52	29,96	13,43	13,43	14,46	20,66
OD (mg/L O ₂)	7,3	7,7	8,2	6,4	7,1	8,3	9,1	7,7
Turbidez (NTU)	11,7	11	11,1	15,5	24	31	28	47
ST (mg/L)	129	56	1259	84	59	54	56	83
DQO (mg/L O ₂)	2,6	3,98	10,88	15,22	*	4,96	10,49	6,54
NH ₄ (ppm)	0,193	0,241	0,228	0,392	0,219	0,194	0,158	0,106
NO ₃ (ppm)	0,66	0,616	0,385	0,762	0,365	0,172	0,234	0,000
DBO (mg/L O ₂)	1,76	0,71	0,94	0,67	4,01	4,10	5,27	2,87

STD = sólidos totais dissolvidos; OD = oxigênio dissolvido; ST = sólidos totais; DQO = demanda química de oxigênio; DBO = demanda bioquímica de oxigênio; * não realizado.

A Tabela 18 apresenta as médias de peso e porcentagem de sobrevivência dos girinos ao final dos dois testes *in situ*.

Tabela 18 - Médias e desvio padrão de peso e taxa de sobrevivência dos girinos, ao final dos testes crônicos *in situ*

Campo	Peso inicial (g)	Tratamento	Peso final (g)	Sobrevivência (%)
Experimento I	4,28 ± 0,39	Controle	3,82 ± 0,29	97,5
	4,34 ± 0,55	Campo de arroz	4,31 ± 0,31	100
Experimento II	7,16 ± 0,38	Controle	6,33 ± 0,31	100
	7,01 ± 0,53	Campo de arroz	5,72 ± 0,28	92,7

Através do teste de Mann-Whitney, avaliando a diferença de peso (final-inicial), dos dois experimentos de campo, não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos ($p=0,23$).

A análise estatística da mortalidade foi realizada agrupando os resultados dos dois experimentos para o teste do Qui-Quadrado. As diferenças não foram significativas ($p=0,21$).

Os resultados dos estágios de desenvolvimento, ao final dos experimentos I e II *in situ* estão apresentados na Figura 12.

Figura 12 – Estágios de desenvolvimento dos girinos de *L. catesbeianus* ao final dos períodos de exposição aos agrotóxicos.

Através do teste de Mann-Whitney as taxas de metamorfose, dos dois experimentos mostraram ser similares, comparando grupo controle e os girinos expostos ao arroz para cada experimento ($p=0,06$ para o experimento I e $p=0,24$ para o experimento II).

Teste do micronúcleo

Durante os dois períodos de exposição foram retiradas amostras de sangue para realização do teste do micronúcleo.

A Figura 13 mostra micronúcleos encontrados em eritrócitos dos girinos, durante a exposição aos agrotóxicos.

Figura 13 - Fotomicrografia de extensão do sangue periférico de girinos de *L. catesbeianus* intoxicados com a mistura de agrotóxicos nos testes *in situ*. Micronúcleo no citoplasma do eritrócito (flecha preta). A - Experimento I *in situ*. B - Experimento II *in situ*. Coloração Fielgen/Fast Green. Aumento 1000X

As análises estatísticas do teste do micronúcleo foram realizadas agrupando os resultados dos testes I e II de campo. Foram realizados Testes-t, comparando o grupo controle e o campo de arroz, a cada dia de coleta.

Os resultados do teste do micronúcleo dos Experimentos I e II de campo estão apresentados da Figura 14.

Figura 14 - Médias dos valores de micronúcleos em 1000 eritrócitos de girinos, durante os Experimentos I e II de campo. ** representam diferenças em relação ao controle, com $p < 0,01$.

As análises estatísticas mostram o aumento do número de micronúcleos aos 7 ($p=0,005$) e 10 ($p=0,008$) dias de experimentação, para os animais expostos aos agrotóxicos nos testes de campo.

Análises hematológicas

As análises hematológicas dos girinos expostos ao campo foram realizadas apenas durante o Experimento II.

Eritrograma

Os dados do eritrograma: hematócrito (Ht), taxa de hemoglobina (Hb), contagem de eritrócitos (Er), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), obtidos durante o Experimento II *in situ*, estão apresentadas na Tabela 19 e Figura 15.

O número de eritrócitos e a taxa de hemoglobina, quando comparamos os tratamentos controle e campo de arroz, apresentou queda significativa aos 14 dias, nos girinos expostos aos agrotóxicos. Os valores encontrados para Ht, VCM, HCM e CHCM não apresentaram diferenças significativas.

Após a aplicação do inseticida carbofuran, juntamente com os fertilizantes (5º dia), podemos observar a elevação no número de eritrócitos, com posterior queda após o 10º dia de exposição, seguindo de diminuição dos valores de hemoglobina entre o 10º e o 14º dia de exposição no grupo tratado com agrotóxicos.

Tabela 19 – Valores médios e erro padrão do eritrograma dos girinos durante o Experimento II *in situ*: hematócrito (Ht), taxa de hemoglobina (Hb), contagem de eritrócitos (Er), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).

	Ht	Er	Hb	VCM	HCM	CHCM
Inicial	21,08 ± 1,73	14,33 ± 0,94	4,69 ± 0,38	1502,34 ± 117,53	332,00 ± 25,55	22,87 ± 1,90
3 dias						
Controle	17,93 ± 1,69	20,00 ± 1,72	3,80 ± 0,30	913,92 ± 79,13	205,07 ± 16,11	21,63 ± 1,59
Campo de arroz	19,38 ± 1,22	15,38 ± 3,58	4,11 ± 0,22	1539,89 ± 265,25	306,67 ± 62,37	21,73 ± 2,08
7 dias						
Controle	19,00 ± 1,89	18,42 ± 4,27	3,07 ± 0,55	1217,64 ± 270,71	181,58 ± 43,37	17,28 ± 3,96
Campo de arroz	23,00 ± 1,80	25,50 ± 5,45	3,45 ± 0,23	1155,42 ± 403,12	180,68 ± 50,76	15,24 ± 0,38
10 dias						
Controle	17,26 ± 2,11	24,83 ± 2,89	3,12 ± 0,51	735,65 ± 114,64	138,41 ± 32,56	20,84 ± 1,85
Campo de arroz	21,53 ± 0,84	27,50 ± 4,05	3,54 ± 0,15	859,26 ± 122,74	139,97 ± 17,90	16,47 ± 0,46
14 dias						
Controle	22,25 ± 1,78	27,42 ± 4,28	4,39 ± 0,28	928,73 ± 195,94	181,79 ± 34,09	19,89 ± 0,51
Campo de arroz	19,47 ± 2,19	15,60 ± 1,33*	2,74 ± 3,47**	1317,41 ± 260,02	171,42 ± 9,01	14,99 ± 2,13
21 dias						
Controle	15,78 ± 0,74	17,00 ± 1,34	3,96 ± 0,33	969,77 ± 108,43	240,65 ± 28,96	26,48 ± 2,84
Campo de arroz	18,08 ± 1,15	21,33 ± 1,49	3,47 ± 0,39	894,21 ± 103,06	166,87 ± 23,67	19,59 ± 1,66

Ht = hematócrito (%); Hb = taxa de hemoglobina (g/100 mL); Er = número de eritrócitos ($10^4/\text{mm}^3$); VCM = volume corpuscular médio (fL); HCM = hemoglobina corpuscular média (pg.cel⁻¹); CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média (%). * e ** representam diferenças em relação ao controle, com $p < 0,05$ e 0,01, respectivamente

Figura 15 – Resultados da série vermelha das análises hematológicas dos girinos durante o Experimento II *in situ*. * e ** representam diferenças em relação ao controle, com p menor que 0,05 e 0,01, respectivamente.

Leucograma

Os dados da contagem diferencial de leucócitos do Experimento II de campo estão apresentados na Tabela 20 e Figura 16.

Tabela 20 – Média e erro padrão dos números absolutos/mm³ da série branca (contagem total e diferencial de leucócitos) dos girinos durante o Experimento II *in situ*.

	Leucócitos Totais	Linfócitos	Neutrófilos	Basófilos	Eosinófilos	Monócitos
Inicial	3140,02 ± 538,31	2700,72 ± 510,72	119,37 ± 41,78	215,86 ± 24,37	79,50 ± 18,29	24,57 ± 6,83
3 dias						
Controle	4747,56 ± 1357,79	4488,98 ± 1254,36	102,97 ± 23,45	179,86 ± 134,67	9,04 ± 8,25	6,19 ± 0,00
Campo de arroz	5848,95 ± 469,09	5505,72 ± 437,19	224,57 ± 72,69	90,01 ± 16,58	28,66 ± 16,05	5,92 ± 0,00
7 dias						
Controle	3944,17 ± 797,34	3626,21 ± 719,50	207,68 ± 43,60	220,42 ± 95,38	11,50 ± 7,48	0,00 ± 0,00
Campo de arroz	5571,35 ± 1624,85	4284,45 ± 1201,39	509,70 ± 244,45	602,85 ± 229,29	74,48 ± 32,36	2,61 ± 2,39
10 dias						
Controle	8346,67 ± 1653,49	7858,10 ± 1548,09	291,45 ± 124,29	94,48 ± 24,57	116,49 ± 53,28	15,17 ± 10,78
Campo de arroz	8189,11 ± 786,31	7210,90 ± 914,89	463,02 ± 169,72	191,79 ± 45,50	253,49 ± 230,33	0,00 ± 0,00
14 dias						
Controle	7775,47 ± 1130,13	7259,05 ± 1047,70	157,41 ± 95,08	181,36 ± 45,97	105,22 ± 41,67	19,23 ± 19,23
Campo de arroz	5347,45 ± 921,22	5167,95 ± 935,15	103,17 ± 14,46	99,01 ± 31,55	14,22 ± 9,20	7,57 ± 4,28
21 dias						
Controle	5540,00 ± 1069,42	5394,12 ± 1069,32	117,01 ± 19,14	65,52 ± 26,61	5,81 ± 4,10	0,00 ± 0,00
Campo de arroz	5704,34 ± 1513,33	5396,88 ± 1324,65	168,46 ± 126,81	60,40 ± 21,29	73,53 ± 59,32	3,58 ± 3,58

Figura 16 – Resultados da série branca (contagem total e diferencial de leucócitos) dos girinos durante o Experimento II *in situ*.

Os testes estatísticos (teste t ou Mann–Whitney) demonstraram não haver diferenças significativas na contagem de leucócitos durante o Experimento II *in situ*.

A Figura 17 mostra os diversos tipos de células sanguíneas encontradas nos girinos durante a contagem diferencial de leucócitos.

Figura 17 – Fotomicrografia da extensão sanguínea de girinos, Er = Eritrócito, Lf = Linfócito, Nt = Neutrófilo, Bs = Basófilo, Es = Eosinófilo e Mn = Monócito. Coloração Rosenfeld. Aumento de 1000 X

5.4. Toxicidade crônica dos agrotóxicos para girinos de *L. catesbeianus* – Laboratório

Os resultados das médias e desvio padrão das variáveis físicas e químicas da água: pH, temperatura (T°C), condutividade elétrica, sólidos totais dissolvidos (STD) e oxigênio dissolvido (OD) no teste de toxicidade crônica de laboratório, estão apresentados na Tabela 21.

Tabela 21 - Médias e desvio padrão das variáveis físicas e químicas da água (pH, temperatura, condutividade, sólidos totais dissolvidos e oxigênio dissolvido) no teste de toxicidade crônica de laboratório.

	pH	T°C (°C)	Condutividade (µS/cm)	STD (ppm)	OD (mg/L)
Controle	6,89 ± 0,32	24,61 ± 1,87	48,42 ± 18,52	24,00 ± 9,24	5,46 ± 1,02
Bentazon	6,77 ± 0,35	24,42 ± 1,79	47,60 ± 16,46	23,60 ± 8,21	5,65 ± 0,78
Penoxsulam	6,72 ± 0,34	24,12 ± 1,65	48,16 ± 17,50	24,00 ± 8,77	4,58 ± 1,57
Permetrina	6,83 ± 0,40	24,04 ± 1,86	50,89 ± 18,70	25,21 ± 9,30	5,75 ± 0,57
Carbofuran	6,85 ± 0,31	24,12 ± 1,64	46,88 ± 16,28	23,24 ± 8,14	5,75 ± 0,57
Mistura	6,91 ± 0,26	24,13 ± 1,68	43,75 ± 12,81	22,00 ± 6,51	6,17 ± 0,57

STD = sólidos totais dissolvidos; OD = oxigênio dissolvido

A Figura 18 apresenta as porcentagens de mortalidade dos girinos durante o experimento crônico de laboratório. Observa-se através da ANOVA, que as taxas de mortalidade dos animais expostos aos agrotóxicos não diferiram do grupo controle.

Figura 18 - Mortalidade (%) dos girinos durante o experimento crônico de laboratório

As taxas de metamorfose foram similares entre os tratamentos, segundo teste de Kruskal-Wallis ($p=0,17$). Os resultados dos estágios de desenvolvimento segundo Gosner (1960), ao final do experimento de laboratório estão apresentados na Figura 19.

Figura 19 – Estágios de desenvolvimento dos girinos de *L. catesbeianus* ao final do experimento em laboratório.

Teste do micronúcleo

O resultado do teste do micronúcleo durante o experimento crônico de laboratório está apresentado na Figura 20.

Figura 20 - Médias dos valores de micronúcleos em 1000 eritrócitos de girinos, durante o Experimento crônico em laboratório.
* representam diferenças em relação ao controle, com $p < 0,05$.

As análises estatísticas (teste t ou Mann–Whitney) mostram um aumento significativo do número de micronúcleos nos grupos tratados com o bentazon e na mistura dos agrotóxicos aos 10 dias de coleta quando comparados com o controle. Sendo semelhantes quando comparamos os grupos bentazon x mistura.

Eritrograma

Os resultados obtidos durante o experimento em laboratório para a série vermelha estão apresentados na Tabela 22 e Figura 21.

Tabela 22 – Valores médios e erro padrão do eritrograma dos girinos durante o Experimento crônico de laboratório: hematócrito (Ht), taxa de hemoglobina (Hb), contagem de eritrócitos (Er), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).

	Ht	Er	Hb	VCM	HCM	CHCM
Inicial	21,13 ± 0,72	15,75 ± 1,43	3,94 ± 0,23	1442,44 ± 168,39	265,76 ± 28,93	18,80 ± 1,21
3 dias	23,43 ± 1,34	15,50 ± 2,49	4,15 ± 0,35	1758,36 ± 263,65	283,88 ± 41,34	16,68 ± 1,26
Controle						
10 dias	26,00 ± 1,94	16,13 ± 1,79	3,41 ± 0,52	1693,66 ± 179,84	218,25 ± 34,44	13,36 ± 1,92
21 dias	19,00 ± 1,89	12,25 ± 0,74	3,43 ± 0,28	1514,89 ± 119,01	281,32 ± 18,69	19,18 ± 0,80
Bentazon						
3 dias	24,75 ± 0,65	16,25 ± 2,09	4,24 ± 0,43	1697,75 ± 220,72	281,48 ± 41,93	17,26 ± 1,77
10 dias	23,71 ± 1,19	19,63 ± 1,90	3,57 ± 0,35	1289,95 ± 101,73	194,35 ± 26,18	15,53 ± 2,06
21 dias	20,50 ± 0,82	8,31 ± 0,52**	3,83 ± 0,25	2519,80 ± 158,14**	473,32 ± 42,20**	18,68 ± 0,99
Penoxsulam						
3 dias	22,00 ± 1,86	15,75 ± 1,30	3,77 ± 0,24	1516,07 ± 192,26	255,26 ± 32,07	17,22 ± 1,41
10 dias	18,43 ± 2,71	15,31 ± 1,77	4,14 ± 0,48	1188,97 ± 160,72	280,20 ± 34,89	25,84 ± 4,92*
21 dias	22,33 ± 0,62	9,67 ± 0,94	3,87 ± 0,03	2426,39 ± 182,80**	426,82 ± 42,05*	17,40 ± 0,48
Permetrina						
3 dias	19,71 ± 1,80	15,81 ± 2,21	4,18 ± 0,35	1299,79 ± 193,84	281,52 ± 42,41	22,53 ± 3,17
10 dias	20,25 ± 1,83	12,75 ± 0,76	3,80 ± 0,39	1614,07 ± 166,32	308,41 ± 42,32	19,66 ± 2,12
21 dias	18,71 ± 0,93	12,21 ± 1,33	3,31 ± 0,17	1691,44 ± 236,21	294,08 ± 34,84	18,00 ± 1,31
Carbofuran						
3 dias	22,50 ± 1,34	16,31 ± 1,48	4,04 ± 0,26	1491,25 ± 197,21	262,97 ± 30,43	18,09 ± 0,95
10 dias	21,50 ± 1,40	13,81 ± 1,36	3,93 ± 0,31	1689,44 ± 212,07	299,54 ± 34,86	18,64 ± 1,67
21 dias	22,25 ± 1,17	12,25 ± 0,71	4,26 ± 0,18	1839,87 ± 111,71	352,77 ± 21,43	19,33 ± 0,90
Mistura						
3 dias	21,13 ± 1,61	13,64 ± 1,16	4,46 ± 0,39	1716,79 ± 177,64	360,63 ± 33,93	21,29 ± 1,31*
10 dias	22,57 ± 1,24	15,31 ± 1,53	4,59 ± 0,34	1512,56 ± 181,63	322,89 ± 39,31	21,17 ± 1,57*
21 dias	16,67 ± 0,66	11,42 ± 0,63	3,39 ± 0,15	1473,32 ± 52,49	303,61 ± 21,81	20,52 ± 1,10

Ht = hematócrito (%); Hb = taxa de hemoglobina (g/100 mL); Er = número de eritrócitos ($10^4/\text{mm}^3$); VCM = volume corpuscular médio (fL); HCM = hemoglobina corpuscular média (pg.cel⁻¹); CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média (%). * e ** representam diferenças em relação ao controle, com $p < 0,05$ e $0,01$, respectivamente.

Figura 21 – Resultados da série vermelha das análises hematológicas dos girinos durante o Experimento crônico de laboratório. * e ** representam diferenças em relação ao controle, com $p < 0,05$ e $0,01$ respectivamente.

Os testes estatísticos (teste t ou Mann–Whitney) da série vermelha demonstraram uma diminuição significativa do número de eritrócitos dos girinos expostos ao bentazon aos 21 dias. Por outro lado, foi observado um aumento dos valores de VCM e HCM dos girinos expostos ao bentazon e penoxsulam, também aos 21 dias. Para a CHCM foi observado um aumento significativo aos 10 dias de exposição ao penoxsulam, e aos 3 e 10 dias para a mistura de agrotóxicos. A porcentagem do hematócrito e a taxa de hemoglobina não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos.

Leucograma

Os dados da contagem diferencial de leucócitos do Experimento II de campo estão apresentados na Tabela 23 e Figura 22

Os testes estatísticos (teste t ou Mann–Whitney) demonstraram um aumento significativo dos valores absolutos de neutrófilos dos girinos expostos ao bentazon aos 21 dias de exposição. Não apresentando diferenças significativas nos outros parâmetros da série branca dos girinos durante o Experimento crônico de laboratório.

Tabela 23 – Média e erro padrão dos números absolutos/mm³ da série branca (contagem total e diferencial de leucócitos) dos girinos durante o Experimento crônico de laboratório.

	Leucócitos Totais			Linfócitos	Neutrófilos	Basófilos	Eosinófilos	Monócitos
Inicial	5398,76 ± 574,61	5028,60 ± 464,19	118,75 ± 34,88	215,42 ± 47,50	35,98 ± 17,87	0,00 ± 0,00		
3 dias	3462,39 ± 535,19	3346,09 ± 496,16	48,03 ± 15,97	58,42 ± 30,91	9,86 ± 4,12	0,00 ± 0,00		
Controle	5166,60 ± 1215,26	4898,18 ± 1159,11	66,66 ± 17,12	166,45 ± 38,55	35,31 ± 21,59	0,00 ± 0,00		
21 dias	4185,79 ± 616,34	3990,40 ± 601,26	69,14 ± 24,62	118,49 ± 33,19	7,76 ± 4,83	0,00 ± 0,00		
3 dias	4603,08 ± 730,26	4461,42 ± 718,59	43,51 ± 15,60	70,38 ± 18,93	27,76 ± 10,99	0,00 ± 0,00		
Bentazon	6319,20 ± 988,34	5933,47 ± 913,69	94,80 ± 44,52	257,32 ± 43,94	33,61 ± 11,51	0,00 ± 0,00		
21 dias	3507,46 ± 312,83	3214,92 ± 291,66	179,22 ± 34,19*	90,20 ± 16,37	23,10 ± 11,20	0,00 ± 0,00		
3 dias	3259,49 ± 468,61	3158,91 ± 464,68	35,94 ± 11,62	54,03 ± 19,92	10,61 ± 4,48	0,00 ± 0,00		
Penoxsulam	6201,12 ± 1157,00	6001,77 ± 1153,28	47,61 ± 18,89	131,93 ± 23,52	19,81 ± 8,79	0,00 ± 0,00		
21 dias	3323,45 ± 596,75	3094,75 ± 550,89	89,27 ± 28,51	124,89 ± 38,29	10,70 ± 3,54	3,84 ± 3,32		
3 dias	4139,35 ± 688,56	3920,63 ± 656,23	67,62 ± 22,39	130,91 ± 37,19	18,16 ± 6,92	2,02 ± 2,02		
Permetrina	3569,78 ± 289,56	3245,12 ± 277,89	68,80 ± 20,53	229,45 ± 45,28	24,17 ± 11,30	2,24 ± 2,24		
21 dias	4657,91 ± 1199,90	4197,59 ± 1023,74	208,31 ± 106,31	240,46 ± 74,98	7,04 ± 4,99	4,52 ± 4,22		
3 dias	4583,06 ± 574,70	4367,15 ± 565,35	89,51 ± 45,92	90,93 ± 38,32	35,47 ± 13,33	0,00 ± 0,00		
Carbofuran	4207,09 ± 1139,99	3886,21 ± 1100,42	167,54 ± 51,84	127,14 ± 27,50	24,35 ± 10,59	1,85 ± 1,85		
21 dias	4266,44 ± 659,82	3904,90 ± 609,17	160,10 ± 30,11	152,32 ± 23,13	49,13 ± 15,39	0,00 ± 0,00		
3 dias	2671,53 ± 488,39	2528,36 ± 357,34	54,58 ± 21,06	51,28 ± 18,30	37,31 ± 15,27	0,00 ± 0,00		
Mistura	5078,51 ± 1578,85	4913,98 ± 1555,95	62,68 ± 23,63	95,99 ± 16,42	4,27 ± 2,10	1,59 ± 1,59		
21 dias	3149,70 ± 344,18	2802,78 ± 259,56	196,79 ± 83,75	129,53 ± 25,95	15,40 ± 6,84	5,20 ± 3,19		

*. representam diferenças em relação ao controle, com $p < 0,05$.

Figura 22 – Resultados da série branca (contagem total e diferencial de leucócitos) dos girinos durante o Experimento crônico de laboratório. * representam diferenças em relação ao controle, com $p < 0,05$.

6. DISCUSSÃO

6.1. Toxicidade aguda dos agrotóxicos para girinos de *L. catesbeianus* e índice de segurança

Os índices de risco ecológico dos agroquímicos foram calculados para a obtenção de parâmetros mais criteriosos na avaliação da periculosidade desses sobre organismos não-alvos. Esses índices podem representar a toxicidade real dos agroquímicos porque, em seus cálculos, são consideradas as concentrações de aplicação dos produtos e, conseqüentemente, valores máximos de resíduos no meio.

Os resultados observados nos testes agudos indicaram grande variação dos valores da CL_{50-96h} e do índice de segurança entre os agrotóxicos testados. O risco ecológico foi confirmado apenas para o inseticida permetrina.

O herbicida bentazon apresentou valores elevados da CL_{50-96h} e índice de segurança, demonstrando baixa toxicidade aguda para girinos de *Lithobates catesbeianus*. Os valores da condutividade elétrica apresentaram-se elevados nas concentrações mais altas do herbicida ($>2000 \mu S/cm$), mas nos testes de sensibilidade com o NaCl foram obtidas condutividades acima de $4000 \mu S/cm$ que não afetaram na mortalidade dos girinos no período de 96 horas, demonstrando que esta espécie possui ampla faixa de tolerância à salinidade da água.

Um alto índice de segurança foi determinado para o herbicida penoxsulam devido à baixa dose indicada para utilização no campo. Conforme mencionado anteriormente, os testes de toxicidade com este herbicida foram realizados com a associação ao óleo vegetal, seguindo a indicação da bula do produto sobre a obrigatoriedade da adição de um adjuvante à calda.

No teste de toxicidade aguda do óleo vegetal, as elevadas taxas de mortalidade nas primeiras 24 horas de experimento, provavelmente foram causadas por asfixia dos girinos pelo óleo. A pele e as brânquias são responsáveis pela respiração dos girinos, podendo ser prejudicada pela adição do óleo à água, causando a morte desses animais.

Segundo Grisolia (2005), os anfíbios são extremamente sensíveis aos agentes surfactantes dos agrotóxicos, alguns componentes comuns das formulações, como o nonilfenol etoxilado podem produzir uma espécie de narcose

nos girinos, alterando seus padrões de permeabilidade da membrana. Os animais ficam impossibilitados de nadar para obter oxigênio e assim, morrem por asfixia.

O índice de segurança estabelecido para o óleo vegetal alerta para os cuidados que devem ser tomados durante a aplicação e no manejo da água de irrigação das lavouras de arroz, apesar de ser um produto classificado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) como sendo pouco perigoso ao ambiente (classe IV). O óleo vegetal, apesar de não ser um produto registrado para cultura do arroz, é amplamente utilizado como adjuvante para diversos agroquímicos desta cultura. A concentração ambiental estimada apresentada na Tabela 15 foi calculada com base nas doses indicadas como adjuvante para o herbicida penoxsulam. Apesar de não apresentar risco ecológico no presente estudo, este produto é amplamente utilizado em altas concentrações na cultura de citrus como inseticida.

Atualmente o MAPA não exige testes ecotoxicológicos para a aprovação de alguns produtos classificados como “inertes” como o óleo vegetal e o óleo mineral. A ação destes produtos deve ser melhor estudada pois, em geral, não se tem consciência do risco que estes produtos aparentemente “inofensivos” podem causar ao ambiente, especialmente, ao declínio da população de anfíbios.

A permetrina deve ser manuseada com cautela por apresentar elevada toxicidade. Embora a concentração da permetrina utilizada nos campos de arroz seja inferior à CL_{50} estabelecida neste estudo (0,102 mg/L), este agrotóxico apresenta risco ecológico (SOLOMON, 1996).

Sánchez-Bayo (2012), em uma revisão de dados de toxicidade para organismos não-alvo, define os piretróides como sendo os inseticidas mais tóxicos para os anfíbios (CL_{50} 0,01 – 0,5 mg/L).

Os girinos de rã-touro, no presente estudo, apresentaram resistência ao inseticida carbofuran (CL_{50} 29,90 mg/L). Sánchez-Bayo (2012) demonstra também que alguns inibidores da colinesterase, como os carbamatos, não são tão tóxicos para os anfíbios (CL_{50} 12-39 mg/L).

Hammond et al. (2012) em estudo sobre padrões filogenéticos de sensibilidade do inseticida endosulfan, utilizando 15 diferentes espécies de girinos das famílias Bufonidae, Hylidae e Ranidae, observaram maior sensibilidade dos girinos de *L. catesbeianus* ao inseticida em relação às outras espécies de anfíbios.

Os resultados do teste agudo com a mistura dos agrotóxicos, comparado com o teste da permetrina, demonstraram que existe efeito antagônico deste inseticida com algum dos agrotóxicos utilizados. A CL_{50} estabelecida no teste agudo com a permetrina isolada foi de 0,102 mg/L, enquanto este inseticida associado aos outros agrotóxicos (0,780 mg/L) demonstrou ser menos tóxico.

6.2. Toxicidade crônica –Testes *in situ* e laboratório

Qualidade da água

Experimentos *in situ*

As variáveis da água durante os testes crônicos *in situ* foram adequadas para garantir a sobrevivência dos girinos. As grandes diferenças observadas entre as temperaturas máximas e mínimas se deram devido à pequena lâmina d'água dos campos de arroz, com rápida perda de calor durante a noite, seguido por elevado aquecimento pelo sol.

Com relação à condutividade elétrica, foi observada uma elevação brusca logo após a aplicação dos fertilizantes com o carbofuran, voltando aos padrões normais cerca de 4 a 6 dias após a aplicação desses produtos.

Foi observada uma elevação nos sólidos totais (ST) no dia em que se iniciou a exposição, devido ao manejo da água adotado pelo produtor. O quadro, após dias sem água para melhor efeito dos agrotóxicos aplicados anteriormente, encontrava-se com uma lâmina d'água muito baixa, na ocasião da coleta.

As demais análises realizadas demonstraram que as águas de irrigação do arroz apresentaram-se dentro dos limites aceitáveis para a manutenção da biota aquática e adequadas para a realização dos testes.

Experimento em laboratório

As variáveis da água no teste de toxicidade crônica de laboratório permaneceram constantes, mesmo em relação à condutividade elétrica, que não variou entre os tratamentos. Assim, podemos observar que nestas concentrações, apenas a aplicação dos fertilizantes foram capazes de elevar a condutividade nos testes *in situ*.

Mortalidade e desenvolvimento

As taxas de mortalidade dos girinos nos testes de campo foram baixas. No Experimento I a mortalidade foi zero para os girinos expostos e 2,5 % no grupo controle. Já no Experimento II obtivemos 7,3 % de mortalidade para os animais expostos e zero para o controle. Essa mortalidade foi observada durante o período que a água permaneceu 6 dias sem circulação, após a aplicação do carbofuran juntamente com os fertilizantes. Neste período a temperatura máxima da água foi mais elevada (36°C) que no ano anterior (32,4°C), o que pode, além de aumentar a toxicidades dos produtos aplicados, diminuir os níveis de oxigênio da água.

A mortalidade observada no experimento de laboratório, apesar de mais elevada quando comparada ao campo, não foi diferente entre os tratamentos, com média de 17,8 % para o grupo controle, e 26,7 % para os girinos expostos aos agrotóxicos (média dos tratamentos).

O peso dos girinos nos testes de campo não apresentou diferença significativa, apresentando pouca perda de peso, em todos os tratamentos. Provavelmente a alimentação natural encontrada no campo não foi suficiente para manter o padrão nutricional desses girinos, como tinham anteriormente em cativeiro com a ração balanceada. Em laboratório, o peso também se apresentou similar ao final do experimento, apesar de se alimentarem de ração balanceada, esta era fornecida a cada 96 horas, para manter adequada a qualidade da água dos aquários. Em estágios avançados do desenvolvimento, existe uma tendência desses animais perderem um pouco de peso, até atingirem o clímax da metamorfose (FERREIRA et al. 2001).

As taxas de metamorfose e os estágios de desenvolvimento ao final dos experimentos foram similares entre os tratamentos, tanto no campo, quanto em laboratório, indicando que esses agrotóxicos, nas concentrações utilizadas para o arroz, não são capazes de afetar a glândula tireoide dos girinos.

A avaliação da metamorfose em girinos de rã-touro demonstrou não ser uma técnica adequada para avaliar o potencial de desregulação do eixo tireideano, devido ao longo período para atingir o clímax da metamorfose para a espécie estudada. Um artigo de revisão detalhada sobre ensaio da metamorfose em anfíbios da OECD (2007), considera utilizar *L. catesbeianus* em laboratório, para

estudos de metamorfose, uma prática inviável devido ao longo período de desenvolvimento, sendo *Xenopus laevis* a espécie mais indicada.

Teste do micronúcleo

O número de micronúcleos observados nos eritrócitos de girinos expostos aos agrotóxicos foi maior em relação ao controle, nos dois testes de campo, apresentando diferenças altamente significativas aos 7 e 10 dias de exposição.

No teste de laboratório, foi observado um aumento significativo do número de micronúcleos nos grupos tratados com o bentazon e na mistura dos agrotóxicos aos 10 dias de coleta.

Observa-se a mesma tendência em relação aos testes *in situ* e em laboratório em resposta ao teste do micronúcleo, obtendo valores próximos, principalmente, quando comparados os animais expostos ao campo, aos expostos à mistura desses agrotóxicos em laboratório.

Diversos estudos demonstram que o bentazon não causa efeitos mutagênicos. US-EPA (1998) apresentam resultados negativos de estudos realizados com mutações gênicas, aberrações cromossômicas, e outros efeitos genotóxicos com o bentazon.

Geralmente, os estudos de mutagenicidade são realizados com os ingredientes ativos com alto poder de pureza, mas na realidade, são as formulações que vão a campo, formando um coquetel de substâncias químicas com atividades biológicas diferentes (GRISOLIA, 2005).

Análises hematológicas

Eritrograma

No teste *in situ*, após a aplicação do inseticida carbofuran, juntamente com os fertilizantes (5º dia), observamos a elevação no número de eritrócitos, com posterior queda significativa ao 14º dia de exposição. Esta resposta evidencia um inicial estímulo da eritropoiese, que pode ser explicado por um estado de hipóxia dos girinos, seguida pela exaustão do tecido hematopoiético.

O fato da água permanecer sem renovação durante 6 dias, provavelmente resultou em quedas nos níveis de oxigênio da água durante a noite. Este fato, somado à exposição a elevadas concentração de Sulfato de Amônio e Cloreto de Potássio dos fertilizantes, além do inseticida, agravariam o estado de hipóxia

interna e estímulo da eritropoiese, aumentando a taxa de hemoglobina no sangue, que é responsável pelo transporte do oxigênio no organismo. A queda na taxa de hemoglobina no 14º dia de exposição aos agrotóxicos ocorreu seguindo a diminuição do número de eritrócitos desses animais aos 14 dias de experimento. GILMOUR (1997) observou alterações do volume e do número das células vermelhas relacionadas ao processo de transporte de oxigênio.

O teste crônico em laboratório não seguiu as mesmas tendências do campo em relação à séria vermelha, mesmo no grupo tratado com a mistura dos agrotóxicos. Os valores que mais se aproximam do campo foram relacionados ao herbicida bentazon, que podemos observar um estímulo da eritropoiese aos 10 dias, com posterior queda, altamente significativa aos 21 dias de coleta.

Houve um aumento significativo dos valores de VCM e HCM aos 21 dias, para os girinos tratados com bentazon e penoxsulam, quando comparados ao controle. Esses índices sugerem que ao longo do experimento de laboratório células vermelhas “jovens”, de maior volume e quantidade de hemoglobina, foram sendo recrutadas ao sistema sanguíneo para dar o aporte necessário diante dos confrontos agressivos. A queda significativa do número de eritrócitos neste período demonstra que as células maduras e contaminadas foram removidas do organismo de maneira mais rápida, prevalecendo as células jovens.

Aguiar et al. (2000) estudaram os efeitos das concentrações de methyl parathion (0,5; 1,0; 2,0; 5,0 e 7,0 mg/L) sobre matrinxã (*Brycon cephalus*), com 4 horas de exposição. Verificaram que os parâmetros hematológicos foram relacionados à resposta de estresse, com elevações dos valores de hematócrito e hemoglobina nas menores concentrações (0,5 e 1,0) e elevação, apenas das taxas de hemoglobina, nos peixes expostos a concentrações mais elevadas do pesticida. Segundo os autores, esta seria uma resposta característica de perda da capacidade de manutenção da homeostase, provavelmente devido à exaustão ou lesão do tecido hematopoiético.

Adhikari et al., 2004 avaliaram os efeitos subletais da cipermetrina e carbofuran através dos parâmetros hematológicos do peixe *Labeo rohita* em função do tempo de exposição, verificando a redução nos números de eritrócitos, taxa de hemoglobina e hematócrito, em relação ao grupo controle. Em contrapartida, houve um aumento do VCM, HCM e na contagem de leucócitos no grupo tratado com pesticidas. Segundo estes autores, o quadro de anemia em

peixes causado pela exposição à xenobióticos se deve à hemólise, inibição da eritropoiese e da hemossíntese e ao aumento na taxa de destruição de eritrócitos em órgãos hematopoiéticos.

A Tabela 24 compara os resultados médios obtidos no presente trabalho em relação aos parâmetros hematológicos encontrados na literatura para a espécie em estudo.

Tabela 24 - Quadro comparativo dos valores médios basais dos parâmetros hematológicos (série vermelha) de *Lithobates catesbeianus*, obtidos por outros autores

Autor	Parâmetros hematológicos de <i>Lithobates catesbeianus</i>					
	Ht	Er	Hb	VCM	HCM	CHCM
Presente trabalho (girino/campo)	19,37	21,3	3,57	1053,19	191,31	19,41
Presente trabalho (girino/laboratório)	21,46	14,11	3,91	1651,41	301,03	18,82
TEIXEIRA (2007) (girino)	18,33	25,43	3,67	816,05	158,89	22,81
FRANÇA (2007) (girino)	15,94	29,53	3,20	584,5	117,0	20,23
FRANÇA et al. (2008) (imago)	19,76	28,38	5,33	688,20	191,24	28,01
ROCHA et al. (2010) (girino)	30,22	49,66	5,92	732,1	147,87	18,88

Ht = hematócrito (%); Hb = taxa de hemoglobina (g/100 mL); Er = número de eritrócitos ($10^4/\text{mm}^3$); VCM = volume corpuscular médio (fL); HCM = hemoglobina corpuscular média (pg/cel); CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média (%).

Quando observadas as médias dos resultados das análises hematológicas em comparação com outros trabalhos realizados com a mesma espécie de anfíbio, verifica-se que estes se aproximam dos valores encontrados na literatura. Pequenas variações são esperadas, principalmente por serem animais ectotérmicos, o quadro hematológico dos anfíbios pode variar de acordo com as condições em que se encontram, como clima, alimentação, idade, peso, linhagem e sexo (PALENSKE; SAUNDERS, 2003; FIORANELLI et al., 2004; COPPO et al., 2005).

Durante a análise das lâminas observou-se também, nos animais intoxicados pelo bentazon, um grande número de eritrócitos em divisão. Segundo Thrall (2004) os anfíbios podem muitas vezes apresentar várias células imaturas, como resultado de certos estímulos externos ou internos. Estas células imaturas irão desaparecer gradualmente, pela continuidade de seu processo de

diferenciação nos vasos sanguíneos. Este processo de diferenciação não acontece no homem e em outros mamíferos.

Leucograma

A série branca é composta de granulócitos (neutrófilos, basófilos e eosinófilos) e agranulócitos (linfócitos e monócitos), onde os neutrófilos e monócitos apresentam atividade fagocitária e estão intimamente relacionados com os mecanismos de defesa celular do hospedeiro. Os eosinófilos e basófilos estão relacionados aos processos inflamatórios e alérgicos e os linfócitos à atividade citotóxica e humoral (ALLENDER; FRY, 2008).

A contagem diferencial de leucócitos não apresentou diferença significativa durante todo o teste *in situ*. No experimento de laboratório apenas os valores absolutos de neutrófilos foram significativamente mais altos no grupo tratado com bentazon, quando comparado ao controle, aos 21 dias de exposição.

Em uma revisão voltada para ecologistas DAVIS et al. (2008) analisa o perfil de leucócitos para medir o nível de estresse de vertebrados. Esses autores concluem que o estresse é capaz de aumentar os números e a porcentagem de neutrófilos e diminuir linfócitos nas cinco classes de vertebrados. Thrall (2004) sugerem que os neutrófilos demonstram grande sensibilidade a modificações do ambiente, sendo os primeiros leucócitos a apresentarem ação fagocítica em resposta a infecções, inflamações e estresse. Aumento do número de neutrófilos em anfíbios expostos a pesticidas agrícolas também têm sido registrada por outros autores (CABAGNA et al. 2005).

Os linfócitos são os leucócitos mais abundantes no sangue de girinos de *L. catesbeianus* (FERREIRA et al., 2003). No presente estudo os linfócitos (Lf) correspondem a 91,31 e 94,01 % dos leucócitos nos experimentos de campo e laboratório, respectivamente. A porcentagem média determinada para os outros leucócitos foram: neutrófilos (Nt) de 2,18 e 3,71 %, basófilos (Bs) com 3,27 e 3,83 %, eosinófilos (Es) com 0,51 e 1,01 % e monócitos (Mn) com 0,03 e 0,13 % para os experimento de campo e laboratório, respectivamente. Os resultados médios obtidos na contagem diferencial de leucócitos são semelhantes aos obtidos, por outros autores, para girinos da mesma espécie (FERREIRA et al., 2003; FRANÇA, 2006; ROCHA et al., 2010).

6.3. Considerações finais

Assim, considerando sua favorável contribuição aos estudos experimentais, de campo e laboratório, a rã-touro, *Lithobates catesbeianus*, representa uma espécie anfíbia com grande potencial experimental, devendo ser melhor explorada em investigações científicas como animal bioindicador das condições ambientais. Demonstrando resistência aos efeitos agudos a esses agroquímicos, o que, somados às análises complementares podem esclarecer alguns mecanismos de ação aos possíveis efeitos crônicos dessas substâncias.

As concentrações dos agrotóxicos que causam efeito de mortalidade (CL₅₀) são muito superiores às concentrações estabelecidas para efeitos metabólicos crônicos e encontrados no ambiente. Esse fato limita a utilização dos valores de CL₅₀, tornando-os práticos somente para situações críticas.

Apesar do bentazon ter apresentado um elevado índice de segurança, com concentrações letais muito acima das recomendadas para o seu uso na lavoura, este agrotóxico foi o que mais causou efeitos crônicos nos girinos, mesmo em baixas concentrações como as encontradas nos ambientes de plantio de arroz. Os girinos apresentaram elevada incidência de micronúcleos e alterações hematológicas na série vermelha e branca.

Atenção deve ser dada a este herbicida, em estudos adicionais, pois o bentazon apresenta alto potencial de deslocamento no solo, podendo atingir principalmente, águas subterrâneas (altamente móvel), além de ser altamente persistente no meio ambiente.

Os resultados apresentados neste estudo alertam, também, para os cuidados que devem ser tomados em relação à utilização do óleo vegetal, tanto na cultura de arroz, quanto em outras culturas. Por ser considerado como pouco perigoso ao ambiente (classe IV) e, relativamente barato, pode ser usado indiscriminadamente em diversas culturas, causando danos irreversíveis às populações de anfíbios ao redor das zonas agrícolas.

7. CONCLUSÕES

- Os testes agudos com os agrotóxicos em laboratório demonstraram grandes variações nas CL_{50-96h} determinadas para girinos de *Lithobates catesbeianus*. Os agrotóxicos demonstraram baixa toxicidade aguda por apresentarem valores de CL_{50} muito superiores às concentrações encontradas no ambiente;
- O índice de segurança apresentou risco ambiental (< 20) apenas para o inseticida permetrina, e alerta para os cuidados que devem ser tomados ao utilizar o óleo vegetal;
- Nas concentrações encontradas no ambiente (testes crônicos) os agrotóxicos não provocaram mortalidades nem alteraram a metamorfose dos girinos;
- O herbicida bentazon e a mistura desses agrotóxicos apresentaram potencial mutagênico. O número de micronúcleos foi elevado aos 7 e 10 dias, nos testes *in situ*, e, em laboratório, aos 10 dias, para o bentazon e mistura dos agrotóxicos. Os agrotóxicos penoxsulam, permetrina e carbofuran não apresentaram potencial genotóxico quando avaliados isoladamente;
- As análises hematologias, para o teste *in situ*, mostraram diminuição da hemoglobina e do número de eritrócitos aos 14 dias;
- Em laboratório houve diminuição na contagem de eritrócitos para o bentazon; aumento do VCM e HCM para o bentazon e penoxsulam; aumento do CHCM para o penoxsulam e para a mistura dos agrotóxicos. Para a série banca houve aumento dos números de neutrófilos dos girinos tratados com o bentazon. A permetrina e o carbofuran não alteraram o hemograma dos girinos nas concentrações testadas;
- O bentazon demonstrou ser o agrotóxico que apresentou menor toxicidade aguda, mas elevada toxicidade crônica para girinos de *L. catesbeianus*, mostrando ter potencial mutagênico nas concentrações encontradas no ambiente.

REFERÊNCIAS

- ABEL, P.D. **Water pollution biology**. 2nd.ed. London: Taylor e Francis, 1998. 286p.
- ABNT. **Norma NBR 9898:87**. Preservação e técnicas de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores. Rio de Janeiro, ABNT, 1987.
- ADAMS, W.J.; KIMERLE, R.A.; BARNETT JÚNIOR, J.W. Sediment Quality and Aquatic Life Assesment. **Environmental Science and Technology**, v. 26, n.10, p.1865-1873, 1992.
- ADHIKARI, S.; SARKAR, B.; CHATTERJEE, A.; MAHAPATRA, C.T.; AYYAPPAN, S. Effects of cypermethrin and carbofuran on certain hematological parameters and prediction of their recovery in a freshwater teleost, *Labeo rohita* (Hamilton). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 58, p. 220–226, 2004.
- AGUIAR L.H.; CORREA C.F.; MORAES C. Efeitos do pesticida organofosforado methyl parathion (folidol 600) sobre o metabolismo e atividade decolinesterase do teleósteo de água doce, *Brycon cephalus* (matrinxã). In: ESPÍNDOLA, E.L.G.; PASCHOAL, C.M.R.B.; ROCHA, O.; BOHRER, M.B.C.; OLIVEIRA-NETO, A.L. (Editores). **Ecotoxicologia – Perspectivas para o Século XXI**. São Carlos: Editora Rima, 2000, p. 269-280.
- ALLENDER, M.C.; FRY, M.M. Amphibian Hematology. **Veterinary Clinical Exotic Animal**, v. 11, p. 463-480, 2008.
- APHA; AWWA; WPCF. American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation. **Standard Methods for the examination of Water and Wastewater Analysis**. 20 ed. Washington: American Public Health Association, 1999.
- ARAUJO, S.L. **Ratos wistar expostos aos inseticidas lambda-cialotrina, carbaril e metamidofós em testes reprodutivos de curta e longa duração**. 2005. 89 f. Dissertação (Mestrado em farmacologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005
- ASTM (American Society for Testing and Materials). **Standard practice for conducting acute toxicity tests with fishes, macroinvertebrates, and amphibians**. Philadelphia, 1980. 780p
- BAIRD, Colin. **Química ambiental**. 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002, 622 p.
- BASF Corporation. Ficha de segurança Basagran 600®. São Paulo: BASF Corporation, 2012. 9p.

BLAUSTEIN, A.R.; ROMANSIC, J.M.; KIESECKER, J.M.; HATCH, A.C. Ultraviolet radiation, toxic chemicals and amphibian population declines. **Diversity and Distributions**, v.9, p.123-140, 2003.

BOLOGNESI, C.; PERRONE, E.; ROGGERI, P.; PAMPANIN, D.M.; SCIUTTO, A. Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. **Aquatic Toxicology**, v.78, n.1, p.93-98, 2006.

BOONE, M.D.; COWMAN, D.; DAVIDSON, C.; HAYES, T.; HOPKINS, W.; RELYEA, R.; SCHIESARI, L.; SEMLITSCH, R. Evaluating the role of environmental contamination in amphibian population declines. In: GASCON, C.; COLLINS, J.P.; MOORE, R.D.; CHURCH, D.R.; Eckay, J.E.; MENDELSON, J.R. **Amphibian Conservation Action Plan**. Switzerland: IUCN Species Survival Commission, 2007. p. 32-35.

BROOMHALL, S. The effects of endosulfan and variable water temperature on survivorship and subsequent vulnerability to predation in *Litoria citropa* tadpoles. **Aquatic Toxicology**, v. 61, p. 243-250, 2002.

BRUCKER-DAVIS, F. Effects of environmental synthetic chemicals on thyroid function. **Thyroid**, v. 8, p. 827-856, 1998.

BUENO-GUIMARÃES, H.M.; FERREIRA, C.M.; GARCIA, M.L.B.; SALDIVA, O.P.H.N. Tadpole Epithelium Test: Potential Use of *Rana catesbeiana* Histopathologic Epithelial Changes to Evaluate Aquatic Pollution. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.67, p.202-209, 2001.

BURTON, G.A. Assessing contaminated aquatic sediments. **Environmental Science and Technology**, v.26, n.10, p.1862-1863, 1992.

CABAGNA, M.C.; LAJMANOVICH, R.C.; STRINGHINI, G.; SANCHEZ-HERNANDEZ, J.C.; PELTZER, P.M. Hematological parameters of health status in the common toad *Bufo arenarum* in agroecosystems of Santa Fe Province, Argentina. **Applied Herpetology**, v. 2, p. 373–380, 2005.

CAJARAVILLE, M.P.; BEBIANNO, M.J.; BLASCO, J.; PORTE, C.; SARASQUETE, C.; VIARENGO, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **The Science of the Total Environment**, v. 247, n. 2-3, p. 295-311, 2000.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL. CETESB. Determinação de Oxigênio dissolvido de Winkler modificado pela azida sódica. **Norma Técnica L5.169**, São Paulo, CETESB, 1978.

_____. Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO). Método da diluição e incubação (20° C, 5 dias). **Norma Técnica L5.120**, São Paulo, CETESB. 1991.

COLLIER, H.B. The standardizations of blood haemoglobin determinations. **Canadian Medical Association Journal**, v. 50, p. 550-552, 1944.

COPPO, J.A.; MUSSART, N.B.; FIORANELLI, S.A.; BARBOZA, N.N.; KOZA, G.A. Variações fisiológicas atribuíveis ao crescimento, alimentação e temperatura ambiental em sangue de *Rana catesbeiana* (Shaw, 1802). **Revista Veterinária**, Corrientes, v. 16, n. 2, p. 74-83, 2005.

COSTA, J.B.; ESPÍNDOLA, E.L.G. Avaliação ecotoxicológica da água e sedimento em tributários do reservatório de Barra Bonita (Médio Tietê Superior, SP). In: ESPÍNDOLA, E.L.G.; PASCHOAL, C.M.R.B.; ROCHA, O.; BOHRER, M.B.C.; OLIVEIRA-NETO, A.L. (Editores). **Ecotoxicologia – Perspectivas para o Século XXI**. São Carlos: Editora Rima, 2000, p.75-93.

DAVIS, A.K.; MANEY, D.L. E MAERZ, J.C. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. **Functional Ecology** v. 22, p. 760-772, 2008.

DAWSON, B. J. M. Shallow Ground-Water Quality Beneath Rice Areas in the Sacramento Valley, California. **U.S. GEOLOGICAL SURVEY. Water-Resources Investigations Report 01-4000**. NATIONAL WATER-QUALITY ASSESSMENT PROGRAM. Sacramento, California, 1997.

DEGARADY, C.J.; HALBROOK, R.S. Using Anurans as Bioindicators of PCB Contaminated Streams. **Journal of Herpetology**, v. 40, n. 1, p. 127–130, 2006.

DELFINO, M.A. **A importância do Rio Paraíba do Sul para o desenvolvimento da região do Vale do Paraíba**. 2001. Monografia apresentada à Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP). 2001. Disponível em: <http://www.univap.br/biblioteca/hp/Mono%202001%20Rev/01.pdf>.

DUELLMAN, W.E.; TRUEB, L. **Biology of amphibians**. Baltimore – Maryland: The Johns Hopkins University Press, 1986, 613 p.

EMBRAPA CLIMA TEMPERADO. **Cultivo do Arroz Irrigado no Brasil**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2005. Sistemas de Produção, 3 ISSN 1806-9207 Versão Eletrônica Nov./2005.

EPAGRI. **Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil**. Pelotas: SOSBAI, EPAGRI/EMBRAPA-CPACT/IRGA, 2007, 161p.

FERRARO, M. V. M. **Avaliação de três espécies de peixes – *Rhamdia quelen*, *Cyprinus carpio* e *Astyanax bimaculatus*, como potenciais bioindicadores em sistemas hídricos através dos ensaios: cometa e dos micronúcleos**. 2009. 176 f. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

FERREIRA, C.M. **Avaliação da toxicidade do cobre e do uso de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*) como animais sentinelas**. 2002. 109 f. Tese

(Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

FERREIRA, C. M.; GUIMARÃES, H. M. B.; RANZANI-PAIVA, M. J. ; SOARES, S. R.; RIVERO, D. H. R. F.; SALDIVA, P. H. N.. Hematological markers of copper toxicity in *Rana catesbeiana* tadpoles (Bullfrog). **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 16, n. 2, p. 83-88, 2003.

FERREIRA, C.M.; PIMENTA, A.G.C; PAIVA-NETO, J.S. Introdução à Ranicultura. **Boletim Técnico do Instituto de Pesca**, n. 33, 14 p. 2001.

FIORANELLI, S.A.; MUSSART, N.B.; COPPO, J.A. Efeito do sistema de criação, alimentação e mudanças estacionais sobre o peso vivo e valores do hemograma da rã touro gigante (*Rana catesbeiana*). **Revista Veterinária**, Corrientes, v. 15, n. 1, p. 9-16, 2004.

FMC Corporation. **Carbofuran data summary**. Philadelphia: FMC Corporation, 1977. 97 p.

FRANÇA, F.M. **Efeito da utilização de Probióticos no desempenho, resposta imune e hematológica de girinos e imagos rãs-touro (*Rana catesbeiana*) na fase de girinagem e metamorfose**. 2007. 93 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura e Pesca) - Instituto de Pesca, São Paulo, 2007

FRANÇA, F.M.; DIAS, D.C.; TEIXEIRA, P.C.; MARCANTONIO, A.S.; DE STÉFANI, M.V.; ANTONUCCI, A.; ROCHA, G. RANZANI-PAIVA, M.J.T.; FERREIRA, C.M. Efeito fazer probiótico *Bacillus subtilis* não Crescimento, Sobrevivência e fisiologia de ras-touro (*Rana catesbeiana*). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 34, n. 3, p. 403-412, 2008.

FREIRE, M.M.; SANTOS, V.G.; GINUINO, I.S.F.; ARIAS, A.R.L. Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v.12, n.3, p.347-354, 2008.

FUENTES-RIOS, D.; ORREGO, R.; RUDOLPH, A.; MENDOZA, G.; GAVILÁN, J.F.; BARRA, R. EROD activity and biliary fluorecence in *Schroederichthys chilensis* (Guichenot 1848): biomarkers of PAH exposure in coastal environments of the South Pacific Ocean. **Chemosphere**, v. 61, n. 2, p. 192-199, 2005.

GARCIA, P.C.A., SAWAYA, R.J., MARTINS, I.A., BRASILEIRO, C.A., VERDADE, V.K., JIM, J., SEGALLA, M.V., MARTINS, M., ROSSAFERES, D.C., HADDAD, C.F.B., TOLEDO, L.F., PRADO, C.P.A., BERNECK, B.M. & ARAÚJO, O.G.S. Anfíbios. In FAUNA ameaçada de extinção no Estado de São Paulo, Vertebrados (P.M. Bressan, M.C.M. Kierulff & A.M. Sugieda, eds.). Governo do Estado de São Paulo, Secretaria do Meio Ambiente, Fundação Parque Zoológico de São Paulo, São Paulo, 2009. p. 329-347.

GILMOUR, K.M. Gas exchange. In: EVANS, D.H. (Editores). **The Physiology of Fishes**. New York: CRC Press, 1997, p.101-127.

GOLDENFARB, P.B.; BOWYER, F.P.; HALL, E.; BROSIUS, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determinations. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 56, n. 1, p. 35-39, 1971.

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

GRISOLIA, C. K. **Agrotóxicos: mutações, câncer e reprodução**. Brasília: Editora da Universidade de Brasília, 2005. 388 p.

GRISOLIA, C. K.; CORDEIRO, C. M. T. Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 1, p. 235-239, 2000.

HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C. & THURSTON, R.V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science & Technology**, v. 11, n. 7, p. 714-719, 1977.

HAMMOND, J.I.; JONES, D.K.; STEPHENS, P.R.; RELYEA, R.A. Phylogeny meets ecotoxicology: evolutionary patterns of sensitivity to a common insecticide **Evolutionary Applications**, v. 5, n. 6, 2012. DOI: 10.1111/j.1752-4571.2011.00237.x

HOOK, T.V. The conservation challenge in agriculture and the role of entomologists. **Florida Entomologist**, v. 77, n. 1, p. 42-73, 1994.

HRUBE, T.C.; SMITH, S.A. Hematology of fish. In: SCHALM'S Veterinary Hematology, 5th ed. Philadelphia: Lippincott. p.1120-1125, 1998.

IRGA. Instituto Rio Grandense do Arroz. **Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o sul do Brasil**. Porto Alegre, RS, 2001. 128 p.

KEENAN, J. J. **Immunotoxic Effects of Mixtures of Endossulfam and Permethrin Via Caspase Dependent Thymocyte Apoptosis**. 2003. 51 f. Dissertação (Mestre em Ciências - Medicina Veterinária) - Faculty of Virginia Polytechnic Institute and State University in Partial Fulfillment, Blacksburg, Virginia, 2003.

LA MARCA, E.; LIPS, K.R.; LÖTTERS, S.; PUSCHENDORF, R.; IBÁÑEZ, R.; RUEDA-ALMONCID, J.V.; SCHULTE, R.; MARTY, C.; CASTRO, F.; MANZANILLA-PUPPO, J.; GARCIA-PEREZ, J.E.; TORAL, E.; BOLAÑOS, F.; CHAVES, G.; POUNDS, J.A.; YOUNG, B. Catastrophic population declines and extinctions in Neotropical harlequin frogs (Bufonidae:Atelopus). **Biotropica**, v. 37, n. 2, p. 190-201, 2005.

LAM, P.K.S.; GRAY, J.S. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, n. 2, p. 182-186. 2003.

LEBBORONI, M.; RICCHIARDINO, G.; BELLAVITA, M.; CHELAZZI, G. Potential use of anurans as indicators of biological quality in upstreams of central Italy. **Amphibia-Reptilia**, v. 27, p. 73-79, 2006.

LOMBARDI, J.V. Fundamentos de Toxicologia Aquática. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M. e LIZAMA, M.A.P. **Sanidade de Organismos Aquáticos**. São Paulo: Editora Varela, p. 263-272, 2004.

MACEDO, R. S. **Efeito do herbicida Bentazon sobre o crescimento e a performance fotossintética da diatomácea *Skeletonema costatum***. 2007. 65 f. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

MADUENHO, L.P. e MARTINEZ, C.B.R. Acute effects of diflubenzuron on the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v. 148, p. 265–272, 2008

MCNULTY, E.W.; DWYER, F.J.; ELLERSIECK, M.R.; GREER, E.I.; INGERSOLL, C.G.; RABENI, C.F. Evaluation of ability of reference toxicity tests to identify stress in laboratory populations of the amphipod *Hyaella Azteca*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 18, n. 3, p. 544-548, 1999.

MEYER, J. R.; WERNISING, P.; TORSELLA, J. Feasibility of micronucleus methods for monitoring genetic damage in two feral species of small mammals. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 33, p. 219-225, 1999.

MONSERRAT, J.M.; GERACITANO, L.A.; BIANCHINI, A. Current and future perspectives using biomarkers to assess pollution in aquatic ecosystems. **Comments on Toxicology**, v. 9, p. 255-269, 2003.

MONSERRAT, J.M.; MARTÍNEZ, P.E.; GERACITANO, L.A.; AMADO, L.L.; MARTINS, C.M.; PINHO, G.L.; CHAVES, I.S.; FERREIRA-CRAVO, M.; VENTURA-LIMA, J.; BIANCHINI, A. Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. **Comparative Biochemistry and Physiology part C: Toxicology and Pharmacology**, v. 146, n. 1-2, p. 221-34, 2007.

MOREIRA, J.C.; PERES, F.; SIMÕES, A.C.; PIGNATI, W.A.; DORES, E.C.; VIEIRA, S.N.; STRÜSSMANN, C.; MOTT, T. Groundwater and rainwater contamination by pesticides in an agricultural region of Mato Grosso state in central Brazil **Ciência e saúde coletiva**, v. 17, n.6, p. 1557-1568, Rio de Janeiro June 2012 <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-81232012000600019>

MOREIRA, M.R.S.; MUCCI, J.L.N.; ABAKERLI, R.B. Monitoramento dos resíduos de carbofurano em área de produção de arroz irrigado - Taubaté, São Paulo; **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.71, n.2, p.221-226, abr./jun., 2004

MOURA, M.A.M.; FRANCO, D.A.S.; MATALLO, M.B. Impacto de herbicidas sobre os recursos hídricos. **Revista Tecnologia e Inovação Agropecuária**, 2008, p. 142-151.

NAKAGOME, F.K.; NOLDIN, J.A.; RESGALLA JR, C. Toxicidade aguda de alguns herbicidas e inseticidas utilizados em lavouras de arroz irrigado sobre o peixe *Danio rerio*. **Pesticidas: Revista de ecotoxicologia e meio ambiente**. Curitiba, v.17, p. 117-122, 2007.

NIGRO, M.; FALLEN, A.; BARGA, I.D.; SCARCELLI, V.; LUCCHESI, P.; REGOLI, F.; FRENZILLI, G. Cellular biomarkers for monitoring estuarine environments: transplanted versus native mussels. **Aquatic Toxicology**, v. 77, n. 4, p. 339-347, 2006.

OECD (Organization for Economic Co-operation and Development). **Final Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay for the Detection of Thyroid Active Substances: Phase 1 – Optimisation of the Test Protocol**: Paris: Organization for Economic Co-operation and Development, 90p. (ENV/JM/MONO(2007)23) 2007.

OHE, T.; WATANABE, T.; WAKABAYASHI, K. Mutagens in surface waters: a review. **Mutation Research**, v.567, n.2-3, p.109-149, 2004.

PALENSKE, N.M.; SAUNDERS, D.K. Blood viscosity and hematology of American bullfrogs (*Rana catesbeiana*) at low temperature. **Journal of Thermal Biology**, v. 28, p. 271-277, 2003.

PANTALEÃO SDE, M.; ALCÂNTARA, A.V.; ALVES JDO, P.; SPANÓ, M.A. The piscine micronucleus test to assess the impact of pollution on the Japaratuba river in Brazil. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.47, n.3, p.219-224, 2006.

PEREIRA, T. **Impacte da utilização de pesticidas em ecossistemas orizícolas sobre a qualidade de águas superficiais**. 2003. Teses de Doutorado em Engenharia Agronómica, ISA/UTL, Lisboa, 2003.

POLEZA, F.; SOUZA, R.C.; STRAMOSK, C.A.; RORIG, L.R.; RESGALLA JR., C. Avaliação da toxicidade aguda para o organismo-teste *Vibrio fischeri* dos principais herbicidas e inseticidas aplicados na lavoura de arroz irrigado dos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. **Pesticidas: Revista de ecotoxicologia e meio ambiente**, Curitiba, v. 18, jan./dez. 2008

PRIMEL, E.G., ZANELLA, R., KURZ, M.H.S., GONÇALVES, F.F., MACHADO, S.O. & MARCHEZAN, E. Poluição das águas por herbicidas utilizados no cultivo do arroz irrigado na região central do estado do Rio Grande do Sul, Brasil: predição teórica e monitoramento. **Química Nova**. v. 28, n. 4, p. 605-609, 2005.

RAMALHO, J.F.G.P.; SOBRINHO, N.M.B.A.; VELLOSO, A.C.X. Contaminação da microbacia de Caetés com metais pesados pelo uso de agroquímicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.7, p.1289-1303, 2000.

RANZANI-PAIVA, M.J.T.; SILVA-SOUZA, A.T. (2004). Hematologia de Peixes Brasileiros. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.A.P. (eds.). **Sanidade de Organismos Aquáticos**. São Paulo: Editora Varela, 2004. p. 89-120.

RESGALLA JUNIOR, C.; NOLDIN, J.A.; SANTOS, A.L.; SATO, G.; EBERHARDT, D.S. Toxicidade aguda de herbicidas e inseticidas utilizados na cultura do arroz irrigado sobre juvenis de carpa (*Cyprinus carpio*). **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 12, p. 59-68, 2002.

ROCHA, G. C.; FERREIRA, C. M.; TEIXEIRA, P. C.; DIAS, D. C.; FRANCA, F. M.; ANTONUCCI, A. M.; MARCANTÔNIO, A. S.; LAURETO, M. Physiological response of American bullfrog tadpoles to stressor conditions of capture and hypoxia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 10, p. 891-896, 2010.

ROMAN, E.E.; BECKIE, H.; VARGAS, L.; HALL, L.; RIZZARDI, M.A.; WOLF, T.M. **Como funcionam os herbicidas da biologia à aplicação**. Passo Fundo: Gráfica Editora Berthier, 2007. 160 p.

ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May-Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. **Memórias do Instituto Butantan**, v.20, p.329-334, 1947.

ROSS, K.; COOPER, N.; BIDWELL, J.R.; ELDER, J. Genetic diversity and metal tolerance of two marine species: a comparison between populations from contaminated and reference sites. **Marine Pollution Bulletin**, v. 44, p. 671-679, 2002.

SALDIVA, P.H.N.; BÖHM, G.M. Animal indicators of adverse effects promoted by air pollution. **Ecosystem health**, v.4, n.4, p.230-235, 1998.

SÁNCHEZ-BAYO, F. Insecticides mode of action in relation to their toxicity to non-target organisms. **Journal of Environmental & Analytical Toxicology**. v.4, n.2, 2012. doi:10.4172/2161-0525.S4-002

SANTIAGO, R. **Impactos ao ambiente e riscos potenciais a saúde, decorrentes do uso de carbofuran em área de produção de arroz, Taubaté, São Paulo**. 2001. 271 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Saúde Ambiental para obtenção do grau de Mestre, São Paulo, 2001.

SARKAR, A.; RAY, D.; SHRIVASTAVA, A. N. E SARKER, S. Molecular Biomarkers: Their significance and application in marine pollution monitoring. **Ecotoxicology**. v. 15, n. 4, p. 333-340. 2006.

SCHVARTSMAN, S. **Intoxicações agudas**. 4.ed. São Paulo: Sarvier, 1991. 355p.

SILVA, J.; HEUSER, V.; ANDRADE, V. Biomonitoramento Ambiental. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. (org.). **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003. p. 166-180.

SOLOMON, K.R. Overview of recent developments in ecotoxicological risk assessment. **Risk Analysis**. v.16, n.5, p.627–633, 1996 DOI: 10.1111/j.1539-6924.1996.tb00812.x

SPARLING, D.W.; BISHOP, C.A.; LINDER, G. The current status of amphibian and reptile ecotoxicological research. In: SPARLING, D.W.; LINDER, G.; BISHOP, C.A. (Ed.). **Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles**. Pensacola, FL: Society of Environmental Toxicology (SETAC), 2000. p. 1-13.

STORER, T.I.; USINGER, R.L.; STEBBINS, R.C. & NYBAKKEN, J.W. **Zoologia geral**. 6ª ed. São Paulo: Cia Editora Nacional, 816 p. 2002.

TEIXEIRA, P.C. **Perfil sanguíneo, cortisol e glicemia em girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*) em diferentes densidades após exposição aérea**. 2007. 86 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Centro de Aquicultura da UNESP, Jaboticabal, 2007

THRALL, M. A.. Hematology of amphibians, **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry: Text and Clinical Case Presentations**. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 2004.

U.S. Environmental Protection Agency. **Toxicological review of bentazon** (CAS No. 25057-89-0). **In Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS)** 202-566-1676. February, 1998

U.S. Environmental Protection Agency. **Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms**. 5th ed., 2002, 275p.

VIARENGO, A.; LOWE, D.; BOLOGNESI, C.; FABBRI, E.; KOEHLER, A. The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. **Comparative Biochemistry and Physiology part C: Toxicology and Pharmacology**, v.146, n.3, p.281-300, 2007.

VIEIRA, J.; MARSCHALEK, R.; SCHIOCCHET, M.A. **Cultivares de arroz da Epagri** – Descrição e caracterização. Florianópolis: Epagri, 76p. (Epagri. Boletim Técnico, 138). 2007

WAISSMANN W. Vigilância sanitária e desreguladores endócrinos. **Caderno de Saúde Pública** v. 18, p. 511-7, 2002.

WELLS, P.G.; DEPLEDGE, M.H.; BUTLER, J.N.; MANOCK, J.J.; KNAP, A.H. Rapid toxicity assessment and biomonitoring of marine contaminants - exploiting the potential of rapid biomarker assays and microscale toxicity tests. **Marine Pollution Bulletin**, v. 42, n. 10, p. 799-804, 2001.

WINTROBE, M.M. Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. **Folia Hematológica**, v. 51, p. 32-49, 1934.

ZAGATTO, P.A.; GOLDSTEIN, E.G. Toxicidade em águas do Estado de São Paulo. **Ambiente**, v.5, n.1, p.13-20, 1991

ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**. New Jersey: Prentice Hall, 1999, 718 p.

ANEXO A - Testes de sensibilidade

Os testes de sensibilidade para *Lithobates catesbeianus* foram realizados utilizando-se solução de NaCl, durante o período de realização dos testes agudos. A carta-controlé elaborada a partir dos resultados dos 5 testes de sensibilidade com a substância de referência está apresentada a seguir.

Anexo A – Carta-controlé da sensibilidade de *Lithobates catesbeianus* ao NaCl, no período de janeiro de 2010 a maio de 2012, contendo média acumulada de valores e limites superior e inferior do intervalo de confiança.

A faixa de sensibilidade estabelecida foi o valor médio calculado ± 2 vezes o desvio padrão, segundo Hamilton et al. (1977), desta forma, os valores variaram dentro da faixa entre o limite superior e inferior calculados, indicando que os lotes estavam adequados para os testes.

ANEXO B – Análises hematológicas

Contagem de Eritrócitos (Er)

O método utilizado para a contagem dos eritrócitos foi o visual, em câmara hematómica de Neubauer. Esta câmara consiste em uma lâmina retangular de vidro espesso contendo dois retículos na porção central, separados longitudinalmente por um sulco profundo sobre a lâmina. Transversalmente, quatro sulcos limitam três plataformas. A central, onde estão os retículos, encontram-se deprimida 0,1mm em relação às laterais, dando a profundidade da câmara, limitada superiormente por uma lamínula especial adaptada firmemente sobre as plataformas laterais. O retículo, na câmara melhorada de Neubauer, é um quadrado de 3mm de lado e 9mm² de superfície, dividido em 9 áreas de 1mm², exceto quatro laterais e o da área central, está dividida em 25 quadrados de 1/25mm², sendo cada um destes subdividido em dezesseis quadradinhos de 1/400mm² totalizando 400 quadradinhos e 0,1mm³ na área central.

Inicialmente foram colocados 400 µL do diluente Hayen em tubo eppendorf. A este conteúdo foram adicionados 2 µL de sangue, resultando em uma diluição final de 1:200. Em seguida agitou-se por dois minutos e então, com auxílio de micropipeta, preencheu-se cada retículo da câmara de Neubauer. A contagem foi feita no aumento de 40x. Após a contagem em cada retículo, foi calculada a média do número de células e o resultado foi expresso em nº células x 10⁴/mm³ de sangue.

Obs. Solução de Hayen

0,6 g de bicloreto de mercúrio

5,0 g de sulfato de sódio

1,0 g de cloreto de sódio

200,0 mL de água destilada

Cº4 a ariedaleg me ravresnoC*

Determinação do Hematócrito (Ht)

A determinação do hematócrito (Ht) foi feita através da técnica de microhematócrito, segundo GOLDENFARB *et al.* (1971). Foi preenchido um tubo capilar com sangue, em seguida vedado em uma das extremidades com massa

de modelar e levado à centrífuga a 12.500 rpm, durante cinco minutos. Na centrifugação, os eritrócitos foram compactados na parte inferior do tubo e mostrado o volume por eles ocupado em relação ao sangue total. A seguir, foi feita a leitura com auxílio do cartão padrão. O resultado foi dado em porcentagem ou volume.

Determinação da Taxa de Hemoglobina (Hb)

A determinação da taxa da hemoglobina (Hb) é uma dos meios mais simples e usual como indicador de anemias e foi realizada pelo método da cianometahemoglobina, segundo COLLIER (1944). Com pipeta automática foram colocados 5 mL de cianometahemoglobina em tubo de ensaio e em seguida adicionou-se 20 µL de sangue. Depois de homogeneizado, aguardou-se por um período de 15 minutos. A amostra foi então levada à centrífuga a 3.500 rpm, durante 5 minutos. Em seguida, a amostra foi colocada em cubetas de cristal e levada ao espectrofotômetro (a 540 nm), para ser realizada a leitura. O aparelho foi previamente calibrado com solução padrão (branco). O valor encontrado em transmitância foi transformado em absorbância pela seguinte fórmula:

$2 - \log X$ x fator de correção, onde:

X= valor encontrado por espectrofotometria

Fator de correção= 40,86 previamente calculado pela curva de calibração

O resultado final foi dado em g/dL

Índices Hematimétricos Absolutos

Em hematologia existem os índices hematimétricos absolutos que servem para avaliar e classificar morfológicamente o sangue dos animais em geral. Com os valores do número de eritrócitos, hematócrito e taxa de hemoglobina foram calculados os seguintes índices hematimétricos, segundo WINTROBE (1934):

- **Volume Corpuscular Médio (VCM)** permite avaliar o volume dos eritrócitos;

$$VCM = \frac{\text{Hematócrito}}{n^{\circ} \text{ Eritrócitos}} \times 10 = \text{fL}$$

- **Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM)** permite medir o peso da hemoglobina em 100 mL de sangue;

$$\text{CHCM} = \frac{\text{Taxa de hemoglobina}}{\text{Hematócrito}} \times 100 = \%$$

Obs. Solução de Cianometahemoglobina

0,2 g de ferricianeto de potássio

1,0 mg de bicarbonato de sódio

0,05 g de cianeto de potássio

1000,0 mL de água destilada

C^o4 a ariedaleg me ravresnoC*

Confecção das extensões sangüíneas

Para cada animal foram feitas duas lâminas de extensões sangüíneas. Previamente, as lâminas foram lavadas com água e sabão, enxaguadas com água e colocadas em álcool/éter (1:1). Procedeu-se em seguida a secagem dessas lâminas com papel absorvente.

As primeiras alíquotas de sangue destinadas à avaliação dos parâmetros hematológicos foram colocadas em uma das extremidades da lâmina, em seguida com outra lâmina, com os cantos recortados, colocada em frente à gotícula e em ângulo de 45° sobre a lâmina inferior, fez-se um movimento para frente de modo a deslizar e espalhar a gotícula de sangue. Depois de prontas, as extensões foram coradas com o corante de ROSENFELD (1947), sendo cobertas por 10 gotas deste corante, ficando de três a cinco minutos em repouso. Em seguida, foi colocada a mesma quantidade de água destilada e homogeneizado com um bastão. Após 10 minutos as lâminas foram lavadas com água corrente, e secas a temperatura ambiente.

Contagem Total de Leucócitos (CTL)

A Contagem Total de Leucócitos (CTL) é realizada nas extensões sangüíneas, em microscópio de luz comum, com objetiva de imersão (100x) onde são contadas 2.000 células (englobando eritrócitos, leucócitos e trombócitos) das quais marca-se a quantidade de leucócitos. A contagem é feita em todo o corpo

da extensão, movimentando-se a lâmina em “zig-zag”, contando um campo e em seguida o campo aleatório seguinte. Através de uma regra de três, considera-se o número total de células contado na câmara de Neubauer, calcula-se o número total de leucócitos. A partir deste cálculo, calcula-se os valores absolutos de cada leucócito, baseado em sua porcentagem (HRUBE e SMITH, 1998).

Contagem Diferencial de Leucócitos (CDL)

A Contagem Diferencial de Leucócitos (CDL) é realizada nas extensões sanguíneas em microscópio de luz comum, com objetiva de imersão (100X) onde são contados 200 leucócitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos) dos quais marca-se a proporção existente entre as distintas variedades de leucócitos. A contagem é feita em todo o corpo da extensão, movimentando-se a lâmina em “zig-zag”, contando um campo e em seguida o campo logo seguinte. O número de cada elemento é expresso em porcentagem, obtendo-se, desta forma, o valor relativo. O valor absoluto é calculado por uma regra de três, partindo-se da contagem total de leucócitos e do valor relativo de cada elemento.

Obs. Corante Rosenfeld

A técnica de coloração ROSENFELD (1947) é uma mistura de corantes:

0,97 g Giemsa em pó

0,53 g May-Grünwald em pó

1.000 mL Metanol

Obs. Solução de heparina:

1,0 mL de solução de heparina (5.000 UI) (Liquemini[®])

50,0 mL de solução salina 0,7%

Cº4 a ariedaleg me ravresnoC *

ANEXO C – Adaptação do corante de Schiff (reação de Fielgen) e Fast Green para girinos de *L. catesbeianus*

Essa adaptação consiste basicamente de duas etapas:

1. Coloração com Reativo de Schiff → cora somente o DNA nuclear das células com tonalidade rosa intenso.
2. Coloração com Fast Green → cora somente o citoplasma das células com tonalidade verde.

Para o sucesso da coloração as lâminas devem ser fixadas em Metanol PA por dez minutos, secas ao ar e imersas em uma solução de ácido clorídrico 5N por mais dez minutos. Quando secas as lâminas devem ser colocadas no Reativo de Schiff por 120 minutos e guardadas na geladeira. Após esse período as lâminas devem ser lavadas em água corrente por 5 minutos e secas a temperatura ambiente.

Em seguida todo o material deve ser transferido para solução de Fast Green por um período de 30 segundos a 5 minutos (conforme a idade e uso do corante). Seqüencialmente as lâminas recém coradas devem ser passadas em duas baterias de álcool absoluto para retirar o excesso de corante, e então secas ao ar. Posteriormente sugere-se que as lâminas sejam montadas em Permount.

Preparação do corante de Schiff

A preparação do corante de Schiff adaptado para girinos de *R. catesbeiana* segue os seguintes passos:

- 1º) Ferve-se 200 mL de água destilada;
- 2º) deixa-se esfriar até $\pm 60^{\circ}\text{C}$;
- 3º) adiciona-se 1 g de Fucsina Diamante;
- 4º) agita-se até a temperatura cair a 50°C ;
- 5º) adiciona-se 9 g de Metabissulfito de Sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), agita-se;
- 6º) adiciona-se 30 mL de ácido clorídrico (HCl) 1N, agita-se;
- 7º) guarda-se em frasco revestido de papel alumínio em lugar seco e escuro por 24 horas;
- 8º) após esse período adiciona-se de 1,5 g a 2,5 g de carvão ativado e agita-se bem;
- 9º) filtra-se em papel filtro no mínimo por 3 vezes.

10º) Caso necessário deve-se adicionar mais carvão ativado até que a solução resultante torne-se completamente transparente.

Preparação do corante Fast Green

Dissolve-se vagorosamente 0,5 g do pó Fast Green em 100 mL de etanol a 95%, triturando os grumos com um bastão de vidro e em seguida filtra-se em papel filtro.