

ROBERTA DA ROCHA BRAGA

**Alterações morfológicas em tecidos linfóide e endócrino de anuros
sujeitos à contaminação ambiental em áreas cultivadas no estado
do Ceará**

São Paulo

2022

ROBERTA DA ROCHA BRAGA

**Alterações morfológicas em tecidos linfoide e endócrino de anuros
sujeitos à contaminação ambiental em áreas cultivadas no estado
do Ceará**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Departamento de Patologia

Área de concentração:

Patologia Animal

Orientador:

Profa. Dra. Eliana Reiko Matushima

São Paulo

2022

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 4168 FMVZ	Braga, Roberta da Rocha Alterações morfológicas em tecidos linfóide e endócrino de anuros sujeitos à contaminação ambiental em áreas cultivadas no estado do Ceará / Roberta da Rocha Braga. – 2022. 164 f. ; il.
	Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2022.
	Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.
	Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.
	Orientadora: Profa. Dra. Eliana Reiko Matushima.
	1. Anfíbios. 2. Contaminantes. 3. Histopatologia. 4. Biomonitoramento. 5. Brasil. I. Título.



Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "ALTERAÇÕES MORFOFISIOLÓGICAS EM TECIDOS HEMATOPOIÉTICO, LINFOIDE E ENDÓCRINO EM DUAS ESPÉCIES DE ANUROS ORIUNDOS DE ÁREAS PRESERVADAS E CULTIVADAS NO ESTADO DO CEARÁ", protocolada sob o CEUA nº 4387250118 (ID 004984), sob a responsabilidade de **Eliana Reiko Matushima e equipe; ROBERTA DA ROCHA BRAGA; PATRÍCIA DE MENEZES GONDIM; DEBORAH PRACIANO DE CASTRO** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 23/05/2018.

We certify that the proposal "Morphophysiological alterations in hematopoietic, lymphoid and endocrine tissues in two native species of anuran from preserved and agrosystem areas in Ceará, northeastern Brazil", utilizing 240 Amphibians (males and females), protocol number CEUA 4387250118 (ID 004984), under the responsibility of **Eliana Reiko Matushima and team; ROBERTA DA ROCHA BRAGA; PATRÍCIA DE MENEZES GONDIM; DEBORAH PRACIANO DE CASTRO** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 05/23/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **03/2018** a **07/2021**

Área: **Patologia Experimental E Comparada**

Origem: **Animais provenientes de outros projetos**

Espécie: **Anfíbios**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **6 a 60 meses**

N: **240**

Linhagem: **Anuros**

Peso: **50 a 150 g**

Local do experimento: **Biometria e eutanásia = laboratório de apoio a campo no município de Tabuleiro do Norte, vale do Jaguaribe, Ceará. Dissecção/necropsia e coleta de amostras = Setor de Anatomia Patológica - NUROF - UFC Processamento histológico = LAPCOM - FMVZ - USP Análises químicas espectrométricas - Departamento de Química Analítica e Físico-Química - UFC**

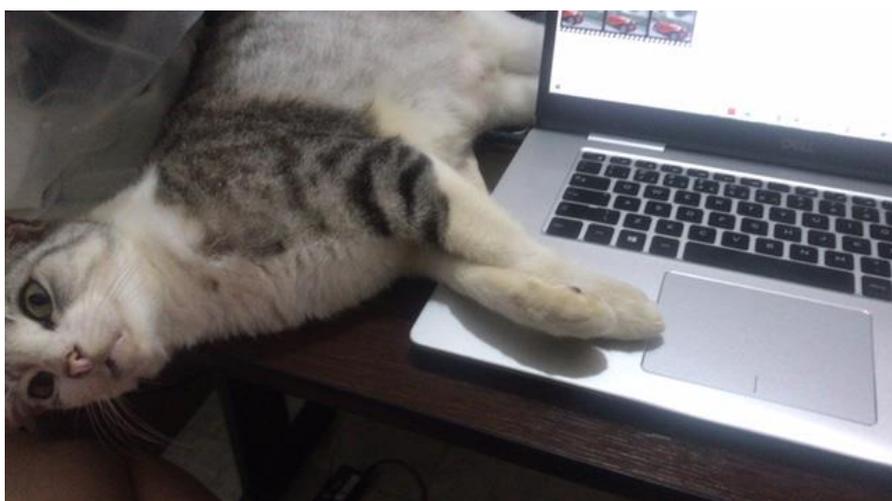
São Paulo, 08 de agosto de 2021

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

DEDICATÓRIA

À Picolina, minha gata companheira de todos os momentos, do descanso ao trabalho incessante no microscópio ou computador, passando pelas pausas para alimentação (seus momentos preferidos, é lógico).



AGRADECIMENTOS

Ao Universo, pela oportunidade de aqui estar.

A Jesus Cristo, exemplo de humildade, sabedoria e resistência, e à memória daqueles que padeceram por carregar um pouco de sua essência: João Cândido, Martin Luther King, Nelson Mandela, Nise da Silveira, Anjezë Bojaxhiu, Chico Xavier, Karol Wojtyła, Chico Mendes, Zé Maria do Tomé, Maria da Penha, Jorge Bergoglio, Marielle Franco, dentre tantos.

Aos meus pais: Flávio Roberto Soldon Braga (*In memoriam*): toda a ciência exata que ele cultivou e me mostrou, desde os meus 6 anos de idade, se fundiu com a biologia, a fisiologia e a patologia dentro deste trabalho. Onde ele estiver, vibrará porque consegui aproveitar para a vida o melhor de dois mundos. Claudedir da Rocha Braga: inspiração de força e determinação feminina e humana... todos os seus livros de medicina foram meus amigos de infância... A ajuda que me deu nas lições de ciências e biologia, nas tardes de domingo, quando se levantava da máquina de costura e ia pesquisar em seus livros as respostas aos meus questionamentos. Tudo isso compôs a estrada que percorri até chegar até aqui.

Às minhas irmãs, Renata e Rosane, pelo amor, risadas, galhofas, piadas internas... enfim, amizade incondicional e apoio em todos os momentos.

Ao Ni, um companheiro cujo inédito apoio e vibração positiva me incentivaram todos os dias e me levantaram nos momentos de desânimo. Obrigada por seu amor, carinho e paciência, sempre.

À Patrícia Menezes Gondim e ao Prof. Paulo Cascon, pelo compartilhamento da amostra e por todo o apoio científico, emocional e financeiro, através da verba do CNPq, sem os quais esse trabalho não teria sido realizado.

Aos meus mestres na Patologia: Profas Marília Taumaturgo e Virgínia Girão (UECE); Prof. Cláudio Cabral Campello (UECE); Prof. Francisco Valdeci de Almeida Ferreira (DPML-UFC, *in memoriam*), o primeiro a enxergar o meu entusiasmo pela patologia;

Profa. Dra. Margarida Maria de Lima Pompeu (DPML – UFC); Dra. Déborah Nunes de Melo Braga (IPCC); Dr. Daniel Viana de Araújo (PATHOVET); Prof. Geraldo de Souza Tomé (UECE/Lab. Carlos Chagas).

Ao Prof. José Luiz Catão Dias, pelo incentivo, pelo Seminário de Patologia de Animais Silvestres, por me apresentar ao VPT em 2014 e pela indicação da Matu para orientação...E principalmente pelo ser humano encantador que ele é.

À Matu, pela orientação, pelo apoio, pela confiança, pela prontidão em todas as demandas, pela simpatia e pelas boas *vibes* durante esses quatro anos de doutoramento.

À Milena Oliveira, pela solicitude e simpatia na resolução dos trâmites administrativos da pós-graduação.

A Mauro de Mattos e Cláudio Arroyo, do Laboratório de Histologia do VPT-FMVZ-USP, pela simpatia, solicitude e excelência na confecção das lâminas histológicas deste trabalho.

Às colegas da pós-graduação: Gislaine Taimara Dalazen, pela simpatia e pelo apoio desde o primeiro encontro, ainda na seleção; Juliana Marigo, pelas conversas e pelo apoio nas compras; Roberta Ramblas Zamana, pela simpatia e pelo apoio nos experimentos com biomol; Vívian Fratti Penna Rispoli pela companhia nas disciplinas e na minha estada em Ribeirão Preto.

A Pedro Henrique Navas Suarez e Catalina Ospina, pelas conversas e dicas de patologia, pela companhia no bandeirão, e por me apresentarem às delícias do CUASO - os cookies da Física e o Big Dog.

A Josué Diaz Delgado, que a cada aula, palestra ou simples conversa descortinava um mundo de ideias que eu poderia aproveitar não só no doutorado como na carreira inteira.

Aos mestres do VPT: Fred Pinto, pela disciplina de Análise de Imagens, que potencializou minhas ideias de investigação e análise de dados; Cláudia Momo pela disciplina de Citopatologia que tanto me enriqueceu; Lílian Rose Sá pela disciplina de Histopatologia, a mais esperada; Bruno Cogliatti pelos conhecimentos de imunohistoquímica e apoio na tentativa de imunofenotipagem.

Ao Prof. José Guilherme Xavier da UNIP pelas dicas de histologia de linfoides, pela atenção mesmo nos feriados, quando o consultei para tirar dúvidas de microscopia.

Ao Dr. Weberty Figueiredo e à bióloga Ms. Aline Sombra, por todo o conhecimento compartilhado no ano de 2016, quando, juntos, começamos a desbravar o maravilhoso mundo da histopatologia linfoide. Esse encontro, proporcionado pela Dra. Margarida Pompeu, plantou em mim a primeira semente deste trabalho.

Ao Prof. Antônio Sebben da UnB, pelas dicas valiosas de anatomia comparada, na minha busca pelas tireoides perdidas, e pela disposição em compartilhar o belíssimo conhecimento em anatomia adquirido em décadas de vida acadêmica.

Ao pessoal do NUROF-UFC: Profa. Diva pelo incentivo; Castiele Holanda, pela amizade, pelo companheirismo incondicional em todas as empreitadas aleatórias tanto do trabalho quanto da pesquisa e pelas lições de estatística; Prof. Robson Ávila pelo apoio, pela amizade e pela confiança; Alyne Costa Martins pela ajuda na bancada e pelo companheirismo; todos os demais membros, que são muitos para citar, por todo o apoio e amizade em todas as fases.

Ao Vereador, biólogo e amigo Gabriel Aguiar, por ser uma inspiração na brilhante combinação de ciência e visão política, representando um farol de esperança para uma Fortaleza Verde e um futuro melhor para o nosso meio ambiente.

Ao pessoal do LEQA-UFC: Às Profas. Wladiana Matos e Gisele Soares, ao doutorando Luan Fonseca, e às bolsistas Lauren Ramos e Giovanna Rocha, pelas consultorias na metodologia em química analítica e preparação de amostras para o projeto. Lamentei muito não ter podido continuar com nossa parceria... Espero que o futuro reserve uma reviravolta financeira que nos proporcione nova oportunidade.

Ao pessoal do BIOPROSPEC-UFC: Profa. Ana de Fátima Carvalho e técnico Luiz Carlos Almeida, pela disponibilidade de uso do laboratório para preparação de amostras.

À equipe da Central Analítica da UFC, em especial ao técnico Marlos de Medeiros Chaves, por todo o apoio e dedicação nos experimentos com espectroscopia e microscopia eletrônica.

Ao Prof. Bruno Lemos Batista e ao pesquisador Rodrigo Mendes Pereira, da UFABC, pelo apoio e disponibilidade na metodologia e na execução da espectrometria.

Ao Prof. Allan Pessier, por toda a bibliografia que li exaustivamente de 2010 até hoje, pela cordialidade e disponibilidade em tirar dúvidas e compartilhar casos para o meu aprendizado.

À Profa. Marja Kik, da Universidade de Utrecht, pela disponibilidade em me receber no laboratório, mesmo não tendo sido possível concretizar a parceria.

À Alexandra Elbakyan, pela democratização da ciência.

Ao Dr. John Minarcik, pelas aulas de patologia e histopatologia a toda hora e em todo lugar (<https://www.medicalschoolpathology.com/>).

A Josh Starmer, pelas dicas de estatística no divertido StatQuest! (<https://www.youtube.com/c/joshstarmer/>) e a Carlos Alberto de Sousa Rodrigues Filho (Carlinhos) pelo curso de estatística multivariada que me ajudou a abrir o olhar quanto às minhas análises.

Ao Professor José Luis Vicente Villardón, da Universidade de Salamanca, pelo desenvolvimento do pacote MultBiplotR e pela solicitude em tirar dúvidas e tentar sanar problemas técnicos no desenvolvimento dos gráficos da estatística multivariada.

Aos Professores Arne Seitz, Romain Guiet e Olivier Burri da Ecole Polytechnique de Lausanne (<http://www.edx.org>), pelo aprofundamento na teoria e na operação do ImageJ.

A todos os cientistas, ativos ou *in memoriam*, que vêm estudando e publicando ciência básica desde os tempos do Renascimento, que são movidos pela paixão por conhecimento, e deixam seu legado para que possamos continuar a construir a estrada.

A aqueles que se sintam parte, mas que porventura eu tenha esquecido de citar...
Minha memória já não é mais a mesma, perdoe(m)-me!

“Se você sabe que está no caminho certo, se você tem esta certeza íntima, então ninguém poderá lhe deter, não importa o que lhe digam.”

(Barbara McClintock, citogeneticista, Prêmio Nobel em Medicina, 1983)

RESUMO

BRAGA, ROBERTA DA ROCHA. **Alterações morfológicas em tecidos linfóide e endócrino de anuros sujeitos à contaminação ambiental em áreas cultivadas no estado do Ceará. 2022.** 164 f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Os anfíbios são uma fascinante classe de Vertebrados que vivem uma “vida dupla”: por compartilharem fases do desenvolvimento em ambientes aquático e terrestre e pela sensibilidade fisiológica e imunológica a estressores externos, são considerados bioindicadores de equilíbrio ambiental. A ordem dos anuros é a mais numerosa, tendo sido bastante utilizada para biomonitoramento ambiental. No semiárido brasileiro, o Rio Jaguaribe é um manancial de grande importância, que vem sendo ameaçado pela má gestão de seus recursos e pelo risco de contaminação química associada aos polos de agricultura irrigada. O objetivo deste trabalho foi avaliar biomarcadores morfológicos e medir elementos químicos potencialmente tóxicos em amostras de tecidos de *Leptodactylus macrosternum* (Anura: Leptodactylidae), anuro nativo, abundante e amplamente distribuído, a fim de utilizá-lo como possível ferramenta de biomonitoramento de agrossistemas na microrregião do Baixo Rio Jaguaribe. Para isso, cento e vinte indivíduos foram coletados em áreas cultivadas e não cultivadas do município de Tabuleiro do Norte, Ceará, de maio a junho de 2017. Através da técnica de ICP-MS, elementos químicos potencialmente tóxicos foram quantificados em amostras secas das carcaças dos espécimes, enquanto alterações morfológicas foram investigadas por meio de necrópsias e avaliação histopatológica de seus órgãos endócrinos e linfóides. Os elementos potencialmente tóxicos As, Cd, Cr, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn foram detectados nas amostras. Foi observada predominância de lesões degenerativas (41,0%), seguidas de proliferativas (23,2%), inflamatórias (17,2%) e circulatórias (14,4%). Bócio nodular colóide, infiltrado granulocítico, hiperplasia e degeneração vacuolar foram as principais alterações observadas em tireóides, paratireóides, ilhotas pancreáticas e glândulas interrenais, respectivamente. Hiperplasia epitelial e atrofia de bainhas linfocíticas periarteriolares foram as alterações predominantes em timo e baço, respectivamente. As frequências de citólise do parênquima com infiltrado granulocítico em paratireóides, da maioria das lesões de timo e de infiltrados granulocíticos em baço foram significativamente

superiores em áreas cultivadas ($p < 0,05$). Acúmulos de Cu, Mn e Zn se mostraram superiores às de uma espécie congênere também do nordeste do Brasil. A maioria dos indivíduos analisados foi classificada no grupo sob maior influência de Co, Zn, Fe e Pb, provavelmente provenientes de duas fontes distintas. Foi observada tendência ao maior acúmulo de As em áreas cultivadas e de Pb em áreas não cultivadas, embora não tenha sido comprovada diferença significativa das concentrações entre as duas áreas. A estatística multivariada mostrou influência significativa de compostos inorgânicos potencialmente tóxicos nas alterações histológicas observadas, principalmente na vacuolização das ilhotas pancreáticas e na hiperplasia do estroma esplênico. Os elementos quantificados responderam por 60,2% da variância dos dados analisados, o que ressalta a interação de outros fatores (fragmentação de habitat, aumento de temperatura e da radiação ultravioleta, redução da pluviosidade, presença de compostos químicos orgânicos, estressores de presença humana, dentre outras possibilidades) nas alterações observadas. Os resultados sugeriram que a espécie *L. macrosternum* é potencial bioindicadora regional de elementos potencialmente tóxicos. Contudo, biomarcadores morfológicos podem não ser sensíveis o suficiente em todos os tipos de tecidos para medir o efeito de elementos químicos inorgânicos potencialmente tóxicos na região avaliada.

Palavras-chave: Anfíbios, contaminantes, histopatologia, biomonitoramento, Brasil

ABSTRACT

BRAGA, ROBERTA DA ROCHA. **Morphological alterations in endocrine and lymphoid tissues of anurans susceptible to agricultural environmental contamination in Ceará state, Brazil. 2022.** 164 f. Thesis (PhD In Comparative and Experimental Pathology) – School of Veterinary Medicine and Zootechnics, University of São Paulo, São Paulo, 2022.

The amphibians are fascinating Vertebrata that live a “double life”: because they share development stages in terrestrial and aquatic environments, and for their physiological and immunological sensibility to external stressors, they are considered bioindicators of environmental balance. The order Anura comprises the most significant number of species and has been widely employed in biomonitoring. In the Brazilian semiarid region, the Jaguaribe River is a prominent source threatened by poor management of its uses and the chemical contamination risk associated with irrigated agriculture. The objective of this work was to evaluate morphological biomarkers and to measure potentially toxic chemical elements in tissue samples of *Leptodactylus macrosternum* (Anura: Leptodactylidae), a native, abundant and widely distributed anuran, in order to apply them as a biomonitoring tool in Lower Jaguaribe Valley River agrosystems, northeastern Brazil. For this purpose, one hundred and twenty specimens were collected in cultivated and non-cultivated areas from Tabuleiro do Norte municipality from May to June/2017. The ICP-MS technique quantified potentially toxic elements in carcasses' dry samples, while lymphoid and endocrine morphological alterations were investigated through *post mortem* examination and histopathology. As, Cd, Cr, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb and Zn were detected in the samples. Predominant lesions were classified in degenerative (41,0%), followed by proliferative (23,3%), inflammatory (17,2%) and circulatory (14,4%). Nodular colloid goiter, granulocytic infiltration, hyperplasia and vacuolar degeneration were the most significant observed alterations in thyroids, parathyroids, pancreatic islets and interrenal glands, respectively. Epithelial hyperplasia and periarteriolar lymphocytic sheaths atrophy were the predominant changes seen in the thymus and spleen, respectively. The frequencies of parenchymal cytolysis with heterophilic infiltration in parathyroids, most thymus lesions, and splenic heterophilic infiltration were significantly higher in cultivated areas ($p < 0,05$). Cu, Mn and Zn concentrations showed superior to those measured in another northeastern congener species. Most likely come from two different origins, Co, Zn, Fe, and Pb

influenced most examined individuals. Although significantly different concentrations were not observed between the areas, the element As tended to get higher concentrations in cultivated, while Pb showed it in non-cultivated areas. Multivariate statistic tests revealed that potentially toxic inorganic compounds significantly influenced the histology alterations, mainly the pancreatic islets vacuolization and splenic stromal hyperplasia. The quantified chemical elements explained 60,2% of the data variance, bringing out other factors (habitat fragmentation, higher temperatures and ultraviolet radiation, lower rainfalls, organic contaminants, human presence stressors and others). The current findings suggested *L. macrosternum* as a virtually environmental bioindicator of chemical contamination. However, morphological biomarkers may not be sensitive enough to measure these chemical effects in every tissue.

Keywords: Amphibians, contaminants, histopathology, biomonitoring, Brazil

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Localização geográfica do estado do Ceará, região nordeste do Brasil.....	22
Figura 2. <i>L. macrosternum</i> , adulto.....	38
Figura 3. Localização do município de Tabuleiro do Norte.	49
Figura 4a. Tabuleiro do Norte, BRJ. Áreas não cultivadas,.....	50
Figura 5a. Tabuleiro do Norte, BRJ. Áreas cultivadas,.....	51
Figura 6. Alterações histológicas observadas em órgãos endócrinos.....	58
Figura 7. Timo de <i>L. macrosternum</i> , visualização macroscópica.....	67
Figura 8. Alterações histológicas observadas em timos.....	68
Figura 9. Trato digestório de <i>L. macrosternum</i>	69
Figura 10. Alterações histológicas observadas em baços.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação e distribuição das publicações selecionadas.....	25
Tabela 2. CRC médio de <i>L. macrosternum</i> nos diferentes status de área	56
Tabela 3. Frequência relativa de alterações endócrinas	57
Tabela 4. Resultado do GLM mostrando significância menor que 5% na ocorrência de inflamação granulocítica em paratireoides	60
Tabela 5. Resultado do GLM mostrando significância menor que 5% na ocorrência de degeneração vacuolar de células adrenocorticais.....	62
Tabela 6. Resultado do GLM mostrando significância menor que 5% na ocorrência de hiperplasia de células adrenocorticais.....	62
Tabela 7. Frequência relativa de alterações linfoides	66
Tabela 8. Distribuição da amostra analisada por ICP-MS.....	75
Tabela 9. Comparação das variâncias de concentração de metais em carcaças de <i>L. macrosternum</i> entre A0/A1 no BRJ, Ceará, Brasil.	77
Tabela 10. Matriz de correlação entre os elementos metais e não-metais	77
Tabela 11. Resultado do GLM mostrando alfa menor que 5% nas relações entre Mn, Pb, Fe e As e fatores de influência.....	80
Tabela 12. Elementos potencialmente tóxicos em tecidos de anfíbios publicados entre 1998 e 2020	81
Tabela 13. Resultados da RDA para alterações em glândulas paratireoides.	93
Tabela 14. Resultados da RDA para alterações em ilhotas pancreáticas.....	93
Tabela 15. Resultados da RDA para alterações em interrenais.....	93
Tabela 16. Resultados da RDA para alterações histológicas em timo.	97
Tabela 17. Resultados da RDA para alterações histológicas em baço.	97

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Frequência de distribuição de publicações selecionadas	25
Gráfico 2. Elementos de importância toxicológica em <i>L. macrosternum</i>	75
Gráfico 3. Análises multivariadas: a) PCA e b) Análise de grupamento individual....	78
Gráfico 4. Análises multivariadas: Análise de grupamento com a) PC1 e b) PC2.....	79
Gráfico 5. Resultados da RDA para alterações de glândulas paratireoides	88
Gráfico 6. Resultados da RDA para alterações de ilhotas pancreáticas.	90
Gráfico 7. Resultados da RDA para alterações de interrenais.	91
Gráfico 8. Resultados da RDA para alterações no timo.	94
Gráfico 9. Resultados da RDA para alterações no baço.	96

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	19
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1.VALE DO JAGUARIBE: UM OÁSIS EM PERIGO NO SEMIÁRIDO BRASILEIRO – REVISÃO SISTEMÁTICA SOBRE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL E POTENCIAIS DANOS À BACIA E A SEUS USUÁRIOS	21
2.1.1. Relatórios e publicações descritivas	25
2.1.2. Análise de contaminação ambiental por pesticidas.....	27
2.1.3. Efeitos dos pesticidas sobre a saúde humana	29
2.1.4. Detecção de elementos potencialmente tóxicos (EQPT, anteriormente denominados “metais pesados”) na Bacia do Rio Jaguaribe	31
2.1.5. Avaliação de toxicidade em biomarcadores.....	32
2.1.6. Detecção de hidrocarbonetos aromáticos.....	34
2.1.7. Considerações finais desta revisão.....	34
2.2.RÃ-MANTEIGA (<i>Leptodactylus macrosternum</i>): Características gerais e potencial como bioindicador ambiental	36
2.3.BIOMARCADORES DE TOXICIDADE AMBIENTAL	39
2.3.1. Anfíbios e ecotoxicologia	39
2.3.2. Disrupção endócrina	40
2.3.3. Alterações imunológicas	42
2.4.POSSÍVEIS DANOS DOS COMPOSTOS QUÍMICOS DETECTADOS NO VALE DO JAGUARIBE À SAÚDE ANIMAL, HUMANA E AMBIENTAL	43
2.5. HIPÓTESES CIENTÍFICAS.....	46
3. OBJETIVOS GERAIS	47
3.1. Objetivos específicos.....	47
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	48
4.1. Amostragem e área de estudo	48
4.2. Aspectos éticos e eutanásia.....	52

4.3. Necrópsia e processamento histológico	52
4.4. Histopatologia.....	53
4.5. Quantificação de elementos químicos potencialmente tóxicos nas carcaças de <i>L. macrosternum</i>	53
4.5.1. Secagem e trituração das carcaças	53
4.5.2. Preparação das amostras	53
4.5.3. Cálculo dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ).....	54
4.5.4. Controles positivos e cálculo da exatidão	54
4.5.5. Determinação elementar por ICP-MS	54
4.5.6. Critérios de inclusão no estudo.....	55
4.5.7. Análise de dados	55
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1. Histopatologia endócrina	57
5.1.1. Tireoide.....	57
5.1.2. Paratireoides.....	60
5.1.3. Ilhotas de Langerhans	60
5.1.4. Interrenais.....	61
5.1.5. Tamanho corporal e alterações endócrinas – Discussão	62
5.2. Histopatologia linfóide	66
5.2.1. Timo.....	66
5.2.2. Baço	68
5.2.3. Alterações linfóides – Discussão dos achados	72
5.3. Química analítica.....	75
5.3.1 Química analítica – Discussão dos achados	80
5.4. Influência dos contaminantes químicos sobre as lesões avaliadas.....	87
5.4.1. Órgãos endócrinos: paratireoides, ilhotas pancreáticas e interrenais.....	87
5.4.2. Órgãos linfóides: timo e baço	94
6. CONCLUSÕES.....	98
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	100
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101
9. ANEXOS	130

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os anfíbios são uma fascinante classe de Vertebrados que vivem uma “vida dupla”: infância na água e idade adulta sobre a terra. Atualmente, mais de oito mil espécies são descritas, dentre as quais 90% fazem parte da ordem Anura (AMPHIBIAWEB, 2020).

Na rotina da maioria das pessoas, isto inclui médicos veterinários, os anfíbios representam um táxon distante, de importância desconhecida ou negligenciada. No entanto, eles são essenciais tanto para o ambiente, nas redes ecológicas como reguladores da cadeia alimentar, quanto para os humanos, como produtores de biomoléculas, patrimônio cultural, bioindicadores e, mais recentemente, como animais de estimação (OSHIRO, 2021).

Bioindicador é definido como qualquer organismo vivo que pode ser utilizado para avaliar a saúde de um ecossistema natural. Devido a descarte de resíduos industriais, poluição do ar, contaminação de águas e solos, práticas agrícolas precárias e degradação florestal, muitas alterações ambientais têm afetado a diversidade, a riqueza e a saúde física de muitas espécies animais (HOLT e MILLER, 2010). Como o conceito de “Saúde Única” (*One Health*) tem mostrado (WHO, 2017), esses parâmetros fornecem informações globais sobre a saúde ambiental. Desta forma, diferentes *taxa* demonstram as adequações de seus ambientes específicos. Neste contexto, os anfíbios desempenham um papel ainda mais importante, como bioindicadores tanto de ambientes aquáticos quanto terrestres (VENTURINO *et al.*, 2003).

O declínio mundial das populações de anfíbios preocupa cientistas há trinta anos. A primeira hipótese causal foi a perda de habitats por degradação florestal; entretanto, isto não explicaria esse declínio mesmo em áreas remotas do planeta Terra. Posteriormente, pesquisadores concluíram que o *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd), um fungo considerado benigno para solos e plantas, estaria causando uma infecção de pele fatal para diversas espécies de anfíbios. Estima-se que pelo menos 501 espécies de anfíbios desapareceram devido à infecção fatal pelo Bd. Por esta razão, hoje o Bd é apontado como uma das maiores ameaças à biodiversidade que já foi documentada, responsável sozinho pelo declínio e extinção de centenas de espécies (SCHEELE *et al.*, 2019).

Além do contexto de saúde animal dos anfíbios, é plausível comparar, guardando as devidas proporções, a panzootia de Bd com a pandemia de Sars-Cov2 nos seguintes aspectos: 1) organismos mundialmente distribuídos, mas cujas cepas patogênicas se disseminaram a partir da Ásia através do transporte e comércio global; 2) altamente transmissíveis entre múltiplas espécies e relativamente estáveis; 3) bem adaptados a seus hospedeiros e aptos a se difundir a partir de seus reservatórios assintomáticos. Além disso, como muitas doenças emergentes, pode ter sido disparada e estar sendo mantida pelas mudanças ambientais e climáticas (SCHEELE *et al.*, 2019; GANESH *et al.*, 2021). Essa situação configura apenas uma perspectiva dentre muitas possibilidades de desastres sanitários envolvendo fauna silvestre, meio ambiente e doenças emergentes.

Pelo que foi explanado, deve-se observar, cuidar e conservar os anfíbios. Eles são um eficiente espelho do status sanitário do ambiente em que estão inseridos, enquanto ajudam nas tomadas de decisões sobre saúde pública, ambiental e animal.

Esse texto foi publicado em: BRAGA, R.R. What can Amphibians Tell us about Environmental Health? **Acta Scientific Veterinary Sciences**, v. 3, n. 8, p. 18–19, 2021. Disponível em <https://actascientific.com/ASVS/ASVS-03-0179.php>)

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. VALE DO JAGUARIBE: UM OÁSIS EM PERIGO NO SEMIÁRIDO BRASILEIRO – REVISÃO SISTEMÁTICA SOBRE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL E POTENCIAIS DANOS À BACIA E A SEUS USUÁRIOS

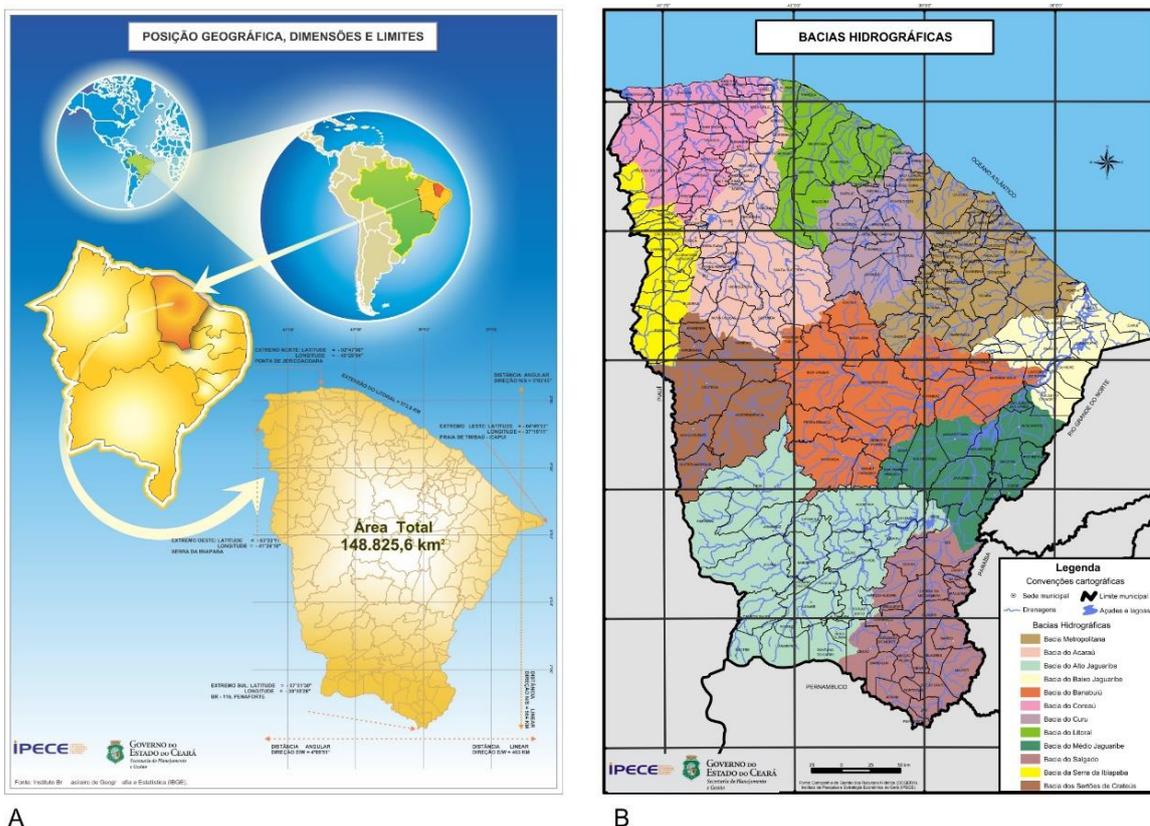
A demanda mundial por água tem crescido 1% ao ano desde 1980, especialmente atribuída ao aumento da população e à mudança nos perfis de produção e consumo. A expectativa atual é de que haja um incremento de 20 a 30% nessa demanda até o ano de 2050, pressionando mais ainda bilhões de pessoas que vivem em áreas com restrição hídrica (UNESCO,2019). Segundo a organização não governamental WaterAid (2019) e a FAO (2019), o Brasil e parte dos países da América do Sul são considerados sob baixo risco de crise de escassez de água potável, porque concentram o maior manancial do mundo, com mais de 28% das fontes renováveis.

No Brasil, entretanto, a dívida de conter a maior fonte de água potável do mundo entra em conflito com a gestão do uso das bacias hidrográficas. Embora abundante, a água não é distribuída uniformemente entre as diferentes regiões do país, devido a diferenças geográficas, climáticas e ao uso indiscriminado. No início dos anos 90, as novas legislações estaduais para regulação do uso racional da água entraram em vigor progressivamente nos diferentes estados brasileiros, culminando com a Lei das Águas (Lei Federal nº9.433/1997), que, baseada no protocolo de Dublin (1992), descentralizou a gestão da água e estabeleceu a Política Nacional de Recursos Hídricos (JOHNSSON E KEMPER,2005; LEGADO BRASIL, 2010).

O atualmente denominado “semiárido brasileiro” ocupa todo o centro da região Nordeste e norte da região Sudeste, apresentando forte insolação, temperaturas relativamente altas, irregularidade e escassez de chuvas, concentradas em períodos de três a quatro meses por ano, considerados insuficientes para suprir os mananciais locais. Os indicadores socioeconômicos são os piores do país, ainda atrelados a uma estrutura agrária arcaica, concentração de renda e má distribuição de terras (SILVA *et al.*, 2010). Nesse contexto, o Ceará (Figura 1) é um dos estados do semiárido no qual os efeitos da seca são mais expressivos. Como solução, o Governo tem atuado tentando perenizar suas bacias hidrográficas, dentre elas, a bacia do Rio Jaguaribe (BRASIL, 2010). O Rio Jaguaribe se localiza cartograficamente

entre 4°30' e 7°45' de latitude sul e 37°30' e 41°00' de longitude oeste. Nasce no município de Tauá, sudoeste do estado, e deságua no Oceano Atlântico, no litoral leste do Ceará, entre os municípios de Aracati e Fortim. Percorre 610 km de extensão e sua bacia ocupa quase 76 mil km², o que representa mais de 50% da área total cearense. É dividida em cinco sub-bacias (do Alto / Médio / Baixo Jaguaribe, do Rio Salgado e do Rio Banabuiú), e atende a 80 municípios. Está inserido no bioma Caatinga, de relevo composto por planícies fluviais, Depressão Sertaneja e maciços residuais, com formações vegetais tipo savana-estepe e florestas estacionais. O clima, em maioria, se apresenta semiárido, com temperatura média anual de 27°C e índice pluviométrico por volta de 740mm por ano. Devido à ampla extensão, compreende várias áreas de transição climática e florística, ambientes mais úmidos e estratos herbáceos estacionais (GATTO, 1999; CEARÁ, 2009). A região do estuário é caracterizada como uma planície flúvio-marinha, onde predominam as florestas de manguezal, falésias e dunas, com clima tropical subúmido, classificado como parte do “litoral setentrional do Brasil” (AB’SABER, 2001).

Figura 1. Localização geográfica do estado do Ceará, região nordeste do Brasil. A) Posição, dimensões e limites; B) Bacias hidrográficas, apresentando as sub-bacias que compõem o Vale do Rio Jaguaribe.



Fonte: IPECE (2020).

Ao longo de muitas décadas, o gerenciamento das águas na região semiárida vem sendo desafiador para os governos e órgãos de gestão hídrica, pois as condições climáticas originais e o crescimento da densidade populacional aumentam a vulnerabilidade da região aos eventos de secas. Dentre as intervenções de caráter permanente que têm sido realizadas para atenuar os impactos econômicos, sociais e ambientais das secas, estão a construção de “açudes”, reservatórios artificiais que modificaram a paisagem e permanecem sustentando a vida e as atividades produtivas do semiárido (BRASIL, 2017). A perenização do Rio Jaguaribe se deu pela construção de mais de quatro mil açudes, dentre os quais Orós, Banabuiú e Castanhão que comportam juntos cerca de 10 bilhões de m³ de água, quase 80% de todo o volume da bacia (JOHNSON E KEMPER, 2004).

A partir dos anos 1960, a construção de reservatórios e as políticas de incentivo ao desenvolvimento possibilitaram o início da agricultura irrigada no estado. A implantação dos perímetros irrigados, nas décadas seguintes, trouxe grandes empresas multinacionais e necessidade de intensa modernização para o incremento da produtividade agrícola (PEREIRA E CUELLAR, 2015). O conceito capitalista da “Revolução Verde” influenciou os governos a criarem legislações específicas para liberação de crédito agrícola destinado à aquisição de equipamentos e insumos, dentre os quais os pesticidas (denominados popularmente de “agrotóxicos”) (FREITAS E BOMBARDI, 2018).

Os pesticidas são compostos químicos utilizados para o controle de pragas na agricultura, aumentando sua produtividade. Compreendem inseticidas, fungicidas, herbicidas, rodenticidas, moluscicidas, nematocidas dentre outros. Teoricamente, os agrotóxicos devem ser letais apenas para espécies-alvo; porém, na realidade do uso indiscriminado, acabam sendo tóxicos também para humanos, animais e meio ambiente em geral, fato que justifica a necessidade de controle rigoroso de seu uso (AKTAR *et al.*, 2009). Metais pesados podem estar contidos em agrotóxicos, fertilizantes ou em outros insumos, e também podem causar danos ambientais. Dentre os efeitos à saúde humana e animal estão disrupção endócrina e suas consequências metabólicas, alterações neurológicas, desajustes reprodutivos e carcinogênese (GUPTA, 2007).

Há pelo menos quinze anos, pesquisas vêm apontando para contaminação das áreas de agronegócio associadas aos perímetros irrigados do Jaguaribe e impacto antrópico sobre o seu leito fluvial e marinho. Herbicidas, inseticidas e metais

pesados já foram detectados em águas superficiais, profundas e em sedimentos, no organismo de peixes e de algumas espécies de invertebrados. Também foram realizados estudos epidemiológicos sobre intoxicação em seres humanos (LACERDA et al., 2004; ALEXANDRE, 2009; DA-SILVA-DIAS et al., 2013; GAMA et al., 2013; COSTA E LACERDA, 2014).

O objetivo desta revisão foi quantificar e qualificar os estudos toxicológicos realizados na bacia do Rio Jaguaribe, expondo as espécies afetadas e discutindo sua importância num contexto de saúde animal, ambiental e humana.

Foi realizado um levantamento bibliográfico no Google Scholar, utilizando os descritores "Jaguaribe", "contaminação", "pesticidas", "metais", no período de setembro de 2019, com atualização em janeiro de 2020. Os resultados foram organizados em planilha e classificados de acordo com o tipo, ano de publicação, tema principal e secundário. Foi feita uma triagem das publicações relacionadas ao assunto, sendo incluídas todas aquelas que continham informações toxicológicas de interesse sobre a região da Bacia do Rio Jaguaribe. Foram excluídas as citações, as publicações sem relação direta com o tema e as dissertações ou teses que geraram artigos publicados em revistas indexadas, cujos conteúdos eram repetidos. Foi realizada estatística descritiva dos resultados e eventuais metanálises de dados publicados, incluindo teste do Qui-quadrado, correlação e regressão linear, executados no software R v.3.6.1.

Foram retornados 183 títulos, entre artigos científicos, dissertações ou teses, e citações. Após a avaliação de conteúdo, foram incluídos 34 títulos, publicados entre 2004 e 2019, sendo 21 artigos de pesquisa, 6 dissertações de mestrado, 2 artigos de revisão, 1 resumo de evento científico, 1 projeto de pesquisa, 1 livro na íntegra, 1 capítulo de livro, e 1 relatório técnico. Os temas principais foram classificados como "pesticidas", "metais", "PAHs" (*Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*; hidrocarbonetos policíclicos aromáticos) e "descritivos" (referindo-se a trabalhos de descrição geográfica, política, social ou econômica). Os temas secundários se referiram ao tipo de amostra estudada ou método, incluindo as águas, sedimentos, saúde humana, biomarcadores e análise de risco epidemiológico. Outros temas secundários incluíram relatórios e dossiês de gestão política e econômica (Tabela 1).

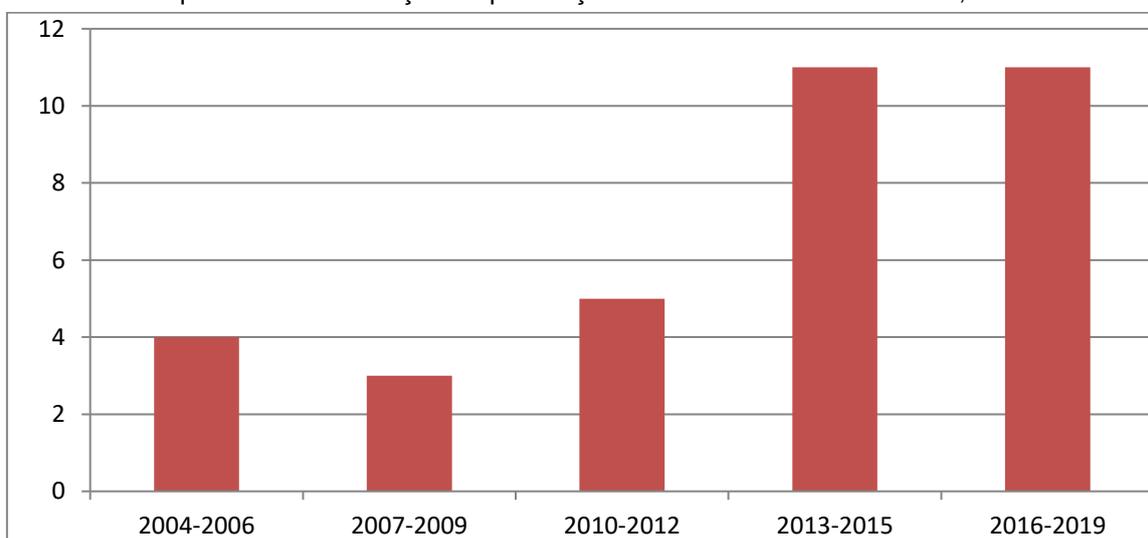
Tabela 1. Classificação e distribuição das publicações selecionadas, por temas.

Temas Secundário	Primário				TOTAL	%
	PESTICIDAS	METAIS	PAHs	DESCRITIVOS		
Água	3	8	-	-	11	32,3
Sedimentos	2	1	1	-	4	11,7
Saúde Humana	7	-	-	-	7	20,5
Bioindicadores	-	4	-	-	4	11,7
Análise de risco	3	-	-	-	3	8,8
Outros	-	-	-	5	5	14,7
TOTAL	15	13	1	5	34	100,0
%	44,1	38,2	2,9	14,7	100,0	

Fonte: Braga (2021)

O Gráfico 1 apresenta a frequência de publicações sobre o tema no período. O ano com maior número de publicações foi 2013 (n=7), especialmente estudos sobre acúmulo e distribuição de pesticidas e metais nas águas.

Gráfico 1. Frequência de distribuição de publicações selecionadas sobre o tema, de 2004 a 2019.



Fonte: Braga (2021)

2.1.1. Relatórios e publicações descritivas

Johnsson e Kemper (2004) coordenaram um projeto de pesquisa do Banco Mundial, do qual rendeu um dossiê sobre a situação (à época) da Bacia do Rio Jaguaribe, seus usuários, gestores, políticas públicas e estratégias de uso

sustentável. Houve revisão de documentos primários e entrevistas com usuários. As principais questões da gestão eram a escassez de água da região semiárida e as secas recorrentes; o crescimento urbano e a construção de desvios do leito do rio para alimentar outras regiões; a qualidade da água e a contaminação ambiental; as enchentes periódicas, devido à irregularidade das precipitações, e a operação/manutenção inadequada da infraestrutura. Após análise da rede complexa de informações, concluíram que ainda existiam problemas na participação equilibrada dos usuários e na transparência das tomadas de decisões. Julgaram que os anos 80 e início dos anos 90 foram mais favoráveis a mudanças no modelo de gestão altamente ultrapassado, porque a época pós-ditadura tinha maior predisposição para a redemocratização e a descentralização. Apesar de haver ainda muito por fazer, a partir daquele ponto e mesmo que lentamente os autores concluíram que o processo estava em andamento e precisaria de mais integração para atingir melhores resultados.

Entre 2007 e 2010, a Assembleia Legislativa do Estado do Ceará coordenou a articulação de mais de 80 instituições de abrangência estadual ou regional a fim de discutirem a garantia de fornecimento de água de qualidade para as futuras gerações cearenses. Esse movimento, conhecido como “Pacto das Águas”, gerou 6 livros-relatórios, contemplando a situação dos recursos hídricos e a criação de um plano estratégico de implementação de políticas públicas (CEARÁ, 2010). Dentre as publicações, destacou-se o Caderno Regional da Sub-Bacia do Médio Jaguaribe (CEARÁ, 2009), que foi apresentada como “o resultado de um grande esforço (...) que reuniu, de forma resumida, as informações essenciais para orientar o planejamento das ações necessárias nesta bacia”. Contemplou as informações gerais de cunho geográfico e geopolítico; oferta, qualidade, demanda e balanço hídrico; aspectos socioeconômicos, além das ações de desenvolvimento e gestão das águas. Trata-se de uma publicação ricamente ilustrada com mapas, gráficos e tabelas, e que traz, em suas páginas finais, quadros-resumos da pactuação regional, com a aplicação de toda a teoria que foi levantada e discutida em referência à bacia do Médio Jaguaribe no Pacto das Águas. A aplicação prática mostra: uma questão a ser resolvida; o que fazer/como/quem/quando; as parcerias; os instrumentos de execução/formalização, e o comitê fiscalizador.

Sobre o Comitê Gestor da Sub-Bacia do Alto Jaguaribe, Oliveira e Uchôa (2013) compilaram e publicaram as ações realizadas. O Comitê realizou 16 reuniões

ordinárias (trimestrais) e 7 extraordinárias, entre 2006 e 2010. O conteúdo das reuniões foi a descentralização do uso dos recursos hídricos oriundos da sub-bacia, conflitos entre usuários, cobrança de uso, fiscalização e campanhas educativas quanto a conservação da água e demais recursos naturais. Dentro das campanhas educativas, o tema “efeitos do uso de produtos químicos” também esteve presente. Os autores ressaltaram também a importância da gestão participativa neste comitê, no qual a maioria dos membros (60%) era da sociedade civil, incluindo usuários moradores dos entornos da sub-bacia, e 40% eram representantes técnicos de instituições públicas municipais e estaduais.

Pantalena e Maia (2014) fizeram um levantamento histórico da ocupação da região da Bacia do Jaguaribe e relacionaram os potenciais impactos ambientais aos diferentes ciclos econômicos que vêm ocorrendo desde o século XVII. O ciclo agropastoril é o mais longo e vem contribuindo com desmatamento da Caatinga; erosão do solo e das margens do rio; diminuição da vazão; desgaste dos recursos superficiais e profundos; redução da qualidade da água por poluentes, e aumento de salinidade. A exploração mineral, o turismo, a produção de energia eólica e a aquicultura são processos mais recentes, mas também contribuem com desmatamento, erosão e poluição do manancial.

2.1.2. Análise de contaminação ambiental por pesticidas

Considerado o primeiro pesticida da história, o DDT (dicloro-difenil-tricloetano) foi sintetizado ainda na década de 1870 na Alemanha, porém suas propriedades inseticidas somente foram descobertas na Inglaterra em 1939 e usadas amplamente como ectoparasiticidas durante a Segunda Guerra Mundial (CARSON, 1962). Os agrotóxicos (utilizados aqui como sinônimo de “pesticidas”) começaram a ser produzidos em larga escala nos anos 1950 na Índia, contribuindo amplamente para a expansão da agricultura, e tendo se expandido para todos os continentes nas décadas seguintes. Dentre os benefícios de seu uso estão o aumento da produtividade, a redução das perdas, o controle de vetores de doenças e aumento da qualidade alimentar. Entretanto, mesmo os mais modernos agrotóxicos, com espectro mais específico, podem ainda ser perigosamente tóxicos para humanos e animais, contaminando alimentos e produtos alimentares, ar, águas superficiais e profundas, solos e vegetação (AKTAR *et al.*, 2009).

Antes do que foi registrado mediante análises químicas de amostras de água e sedimento, autores realizaram análise de risco para contaminação por pesticidas no Vale do Jaguaribe através de modelos matemáticos. Milhome *et al.* (2009) levantaram informações sobre o perímetro irrigado Jaguaribe-Apodí, no Baixo Jaguaribe, onde há mais de 200 pequenos produtores e 20 empresas dedicadas à fruticultura irrigada de algodão, ata, banana, feijão, goiaba, graviola, mamão, manga, milho, soja e uva, e são utilizados mais de 30 tipos de pesticidas, com destaque para inseticidas (organofosforados, seguidos por piretroides e carbamatos). Segundo levantamentos de análise de risco pelos critérios de triagem da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA), 36 a 60% dos princípios avaliados foram considerados contaminantes em potencial de águas superficiais e/ou subterrâneas, baseando-se em características físico-químicas dos compostos (solubilidade em água, coeficiente de adsorção à matéria orgânica, solubilidade de gás-líquido, meia-vida na água e no solo), nas regiões do Alto e Médio Jaguaribe, sendo determinada uma lista de compostos prioritários para monitoramento ambiental na região (MILHOME *et al.*, 2009; GAMA *et al.*, 2013; PINHEIRO *et al.*, 2016).

Foi avaliada a ocorrência de pesticidas em amostras de águas superficiais e profundas no perímetro irrigado Jaguaribe-Apodí, municípios de Quixeré e Limoeiro do Norte, na região do Baixo Jaguaribe. Avelino *et al.* (2013) detectaram 14,2% de amostras contaminadas, sendo as maiores frequências dos inseticidas Imidacloprida e Clotianidina, e do herbicida Atrazina. Milhome *et al.* (2015) detectaram 100% de contaminação em amostras de águas superficiais e 62% em águas profundas, em concentrações globais de 1,1-17,3 µg/L e n.d.-8,9 µg/L, respectivamente. Os fungicidas Propiconazol e Difenconazol foram os mais frequentes e com maiores concentrações em águas superficiais, seguidos pelo inseticida organofosforado Clorpirifós e pela Atrazina. Sousa *et al.* (2016), avaliaram amostras de água de 10 reservatórios ao longo do estado do Ceará, e detectaram em 60% deles níveis de Atrazina 5-6 vezes superior ao limite convencionado pelo Ministério da Saúde, incluindo 7-8 µg/L de Atrazina em amostras dos reservatórios do Vale do Jaguaribe. Oliveira *et al.* (2016) investigaram o destino de inseticidas organoclorados utilizados nos perímetros irrigados da Bacia do Jaguaribe. Foram detectadas concentrações preocupantes de Heptacloro e Lindano em amostras de sedimentos de zona fluvial e estuarina, que foram considerados particularmente alarmantes no domínio estuarino, pelo risco ecológico à microbiota local.

Não foi recuperado nenhum artigo sobre concentrações de pesticidas nos tecidos de biomarcadores (vertebrados ou invertebrados) no Vale do Jaguaribe.

2.1.3. Efeitos dos pesticidas sobre a saúde humana

No ano de 2009, um grupo de pesquisadores do Departamento de Saúde Comunitária da Universidade Federal do Ceará (DSC-UFC), coordenado pela médica Raquel Rigotto, iniciou um projeto de levantamento epidemiológico na população do Baixo Jaguaribe exposta a pesticidas. O município de Limoeiro do Norte, no Baixo Jaguaribe, ganhou notoriedade nos anos 2000 devido ao aumento do número de intoxicações agudas humanas registradas pela Secretaria Estadual de Saúde. Em Limoeiro, está instalada uma grande empresa de fruticultura, que explora a cultura do abacaxi em larga escala para consumo interno e exportação, com uso de maquinário agrícola, mão de obra barata e amplo emprego de “agrotóxicos” (RIGOTTO E MATOS, 2009). Alexandre (2009) entrevistou 75 trabalhadores agrícolas da região, levantando características socioeconômicas e profissionais, hábitos de vida, histórico familiar, conhecimentos sobre exposição aos compostos químicos em agricultura, e submetendo-os a exames clínico-laboratoriais. Todos os entrevistados reconheceram o uso de pesticidas na rotina profissional e 94% deles admitiram ter tido contato direto, numa frequência de exposição de mais de 8 horas diárias; 60% referiram já ter passado mal no trabalho, e 53% correlacionaram tais episódios à exposição aos pesticidas (ALEXANDRE, 2009). Os achados clínicos apontaram para 63% de sintomas neurológicos (cefaleia, confusão mental, tremores, lapso de memória) e 45% irritação ocular, que, segundo nossa metanálise foram significativamente maiores que o esperado ($X^2 = 13,782$; $p=0,001017$). Os exames laboratoriais mostraram que 48% tiveram alterações nas enzimas hepáticas. Embora tenha realizado o perfil dos trabalhadores, o autor não correlacionou estatisticamente os achados com a exposição aos pesticidas. Executamos um teste de correlação e uma regressão linear para tentar investigar o aumento da relação TGO/TGP (transaminase oxalacética / transaminase glutâmico-pirúvica) ao longo dos meses de exposição. Segundo nossa metanálise, apesar de haver uma tendência de aumento linear temporal, o modelo não foi suficiente para tentar explicar a relação, visto que existem vários outros fatores que podem concorrer para a alteração das enzimas hepáticas ($R^2=14,62\%$; $p=0,0872$). Em estudo de caso-controle, Rigotto *et al.* (2013) detectaram tendência

crescente e significativa de mortalidade por neoplasias e mortalidade fetal no grupo-caso (Russas, Limoeiro do Norte e Quixeré), com uma taxa 1,76 maior de hospitalizações e 1,38 maior de mortalidade por neoplasias do que no grupo-controle. Diógenes (2017) observou que a clientela rural da Previdência Social cearense tem 5 vezes mais risco de receber benefícios por neoplasias que a clientela urbana, sendo 57% de trabalhadores do sexo masculino, destacando-se os municípios de Icó, Limoeiro do Norte e Russas com as maiores taxas de benefícios. As neoplasias mais prevalentes são as de pele, seguidas pelas hematológicas. Barbosa *et al.* (2019) avaliaram possível associação de câncer infantojuvenil residentes em microrregiões de perímetros irrigados, através de dados do Registro Hospitalar de Câncer (RHC) do estado do Ceará. Foi observado um aumento de 16% na tendência temporal das taxas de mortalidade por neoplasias na região do Baixo Jaguaribe, considerada a mais alta entre as regiões não metropolitanas avaliadas.

Freitas e Bombardi (2018) revisaram a literatura relacionada a contaminações e intoxicações nos perímetros irrigados do Ceará, especificamente no Baixo Jaguaribe, elaborando mapas epidemiológicos, através de dados do Sistema de Notificação de Agravos (SINAN) e do Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS). Os resultados mostraram que, nos perímetros de Morada Nova, Jaguaruana, Tabuleiro de Russas e Jaguaribe-Apodi, as intoxicações agudas por pesticidas podem chegar a 26 casos/100 mil habitantes. Essa casuística é 10 a 30 vezes maior se comparada às zonas urbanas, e se repete em outros perímetros irrigados do estado, podendo chegar até 75 casos /100 mil habitantes. O Projeto de Lei Estadual nº 18/2015 (aprovado em dezembro/2018) propôs uma série de novas normas de aquisição, uso, armazenamento e transporte de pesticidas no estado, além de proibir a pulverização aérea nas áreas cultivadas. Este projeto veio para substituir a antiga Lei nº1478/2009, conhecida como Lei Zé Maria Tomé, referência ao ativista que denunciava o abuso de pesticidas pelas empresas do agronegócio e grilagem de terras no perímetro Jaguaribe-Apodi; lei esta que foi revogada pela Câmara Municipal de Limoeiro do Norte em 2010, logo após o assassinato do ativista (FREITAS E BOMBARDI, 2018).

Não apenas as grandes empresas fazem uso de pesticidas em sua produção. Em assentamentos de reforma agrária no município de Russas, 37% dos agricultores de subsistência confirmaram utilizar um ou mais princípios químicos em suas pequenas lavouras policultoras temporárias. Desses, mais de 20% informaram já ter

sofrido intoxicação aguda por compostos organofosforados, referindo tonturas, dores de cabeça, mal-estar generalizado, fraqueza, prurido na pele e falta de apetite. Nenhum deles buscou serviço de saúde, aguardando melhora espontânea da intoxicação (CASTRO, 2008).

2.1.4. Detecção de elementos potencialmente tóxicos (EQPT, anteriormente denominados “metais pesados”) na Bacia do Rio Jaguaribe

Lacerda *et al.* (2004) estimaram as emissões anuais dos metais pesados de maior impacto ambiental: Zinco (Zn), Cobre (Cu), Chumbo (Pb) e Cádmiio (Cd). Concluíram que as emissões antrópicas de Cu são as mais preocupantes, compreendendo mais de 9 toneladas despejadas por ano na Bacia do Jaguaribe, presumindo que 95% sejam provenientes de atividades agropecuárias.

Nobre *et al.* (2018) investigaram metais em água e sedimentos de um aquífero aluvionar no município de Itaiçaba, no Baixo Jaguaribe. O município possui fazendas de carcinicultura e ausência de esgotamento sanitário para a população, que ainda utilizava (por ocasião do estudo) fossas sépticas. Encontraram altos teores de Alumínio (Al, 0,7 e 1,8 mg/L) e Pb (11-68 µg/L) em um dos poços amostrados, acima dos permitidos pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente.

As demais publicações sobre EQPT no Baixo Jaguaribe compreenderam estudos sobre o leito fluvial final e zonas de estuário do grupo de pesquisa do Instituto de Ciências do Mar (Labomar-UFC). Esses estudos incluíram os impactos antropogênicos da erosão, despejo de efluentes e carcinicultura praticada na região. Lopes (2006) comparou as concentrações de Cu e Zn em água e sedimentos de viveiros de camarão com diferentes idades e observou concentrações de até 8mg/g de Cu e até 68,5mg/g de Zn, sem diferença significativa em relação ao tempo de uso dos viveiros. O excesso de metais nos viveiros poderia afetar o metabolismo dos camarões, além de torná-los potenciais fontes de contaminação alimentar. Concluiu que o enriquecimento de Zn nos viveiros era majoritariamente proveniente de fontes antrópicas. Soares (2011) estudou os teores de Mercúrio (Hg) dissolvido (~5,4ng/L), particulado (~0,6ng/L) e total (~11,9ng/L) no gradiente fluviomarinho do estuário do Rio Jaguaribe. Os achados sugeriram que o Hg provinha principalmente do continente, e, nos intervalos entre as marés, grande quantidade estava ficava retida

na zona de estuário. Apesar dos valores encontrados não classificarem o Jaguaribe como rio impactado pelo Hg, estimou-se que sua fração biodisponível fosse representativa o suficiente para causar impacto na cadeia trófica, e que a concentração de Hg total poderia causar efeitos crônicos para a biota aquática local. Lacerda *et al.* (2011; 2013) concluíram que era esperada uma maior exportação de Hg particulado (1,8-12,6 mg/s) do rio para o estuário durante as chuvas. Além disso, rações para aquicultura, fertilizantes e cal conteriam impurezas que contribuiriam para a carga total de Hg nos viveiros, podendo chegar a 230mg Hg Total/hectare/ciclo. Apesar das preocupações citadas, Lacerda *et al.* (2017) calcularam que apenas 0,15% do Hg que é despejado no estuário anualmente corresponde a resíduos da carcinicultura. Da-Silva-Dias *et al.* (2013) compararam a influência das estações seca e chuvosa nos teores de Cu, Zn, Fe (Ferro) e Al em matéria particulada suspensa na zona estuarina. Concluíram que Cu, Fe e Al eram de origem litogênica, devido à maior erosão que ocorre nessa época; e que seus teores médios tiveram correlação positiva com as chuvas. Já o Zn mostrou teores mais altos na estação seca, e mostrou-se correlacionado com fontes antropogênicas.

2.1.5. Avaliação de toxicidade em biomarcadores

Valentim Neto (2004) demonstrou preocupação com a saúde do Caranguejo-Uçá (*Ucides cordatus*) natural do estuário do Jaguaribe, uma vez que, no período seco do ano 2000, pescadores relataram relevante aumento de sua mortalidade dentre várias outras espécies de organismos estuarinos. Ciente da potencial influência dos resíduos tóxicos sobre a saúde da fauna aquática do Baixo Jaguaribe, o autor investigou a histologia dos órgãos principais e os parâmetros da água, e fez um bioensaio observando a influência dos efluentes de carcinicultura sobre amostra de indivíduos vivos durante 30 dias. Os achados não apontaram para alterações morfológicas orgânicas nos caranguejos, portanto não foi possível evidenciar impacto sobre a espécie nesse experimento. Também não foi possível sugerir uma causa para o aumento da mortalidade de anos anteriores, pois possíveis aumentos de toxicidade podem ter sido pontuais e dissipados pelos fluxos flúvio-marinhos e pluviosidade posterior.

Peres (2012) investigou biomarcadores invertebrados e suas diferentes influências no acúmulo de metais nos sedimentos de três estuários cearenses. No

estuário do Jaguaribe, observou que a colonização por moluscos bivalves *Mytella* spp. favoreceu o acúmulo de Fe, Al e Mn (Manganês) nos perfis sedimentares até 15cm de profundidade. Já em áreas colonizadas pelos caranguejos *Uca* spp., os teores de Fe e Al se mostraram menores nos sedimentos, principalmente até 10cm de profundidade, o que possivelmente se dá pelo fenômeno da “bioturbação”, capacidade que tem os caranguejos de oxidar sedimentos devido a seus hábitos alimentares. Foram observadas influências semelhantes para os teores de Cu, Zn e Pb, por bivalves e caranguejos. A origem dos metais foi estimada com quantificação das áreas não colonizadas e uso de matrizes de correlação. A conclusão foi que Fe, Cu, Zn e Pb mostraram-se altamente correlacionados entre si, portanto sua origem e/ou mecanismo de deposição deveriam ser as mesmas, diferentes de Al e Mn.

Costa e Lacerda (2014) investigaram os teores de Hg em peixes consumidos em várias vilas ao longo do Baixo Jaguaribe. Foram detectados teores de Hg em amostras de músculo de 13 espécies, variando entre 0,1 e 107,5 ng/g, considerados abaixo do limite estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). As maiores concentrações foram detectadas na musculatura de peixes carnívoros, demonstrando assim a biomagnificação através da cadeia trófica. Através de entrevistas, estimaram a exposição humana ao Hg através do consumo de peixe. Concluíram que, para as quantidades estimadas de consumo de peixe (mesmo estando acima do consumo em outras regiões), os teores de Hg encontrados naquele momento não ofereciam risco de toxicose à população ribeirinha do Baixo Jaguaribe. O mesmo grupo de pesquisa comparou os teores de Hg em músculos de espécies nativas livres e de espécies introduzidas, mantidas em fazendas de piscicultura no açude Castanhão, na região do Médio Jaguaribe. Os teores em peixes nativos foram estatisticamente maiores que em peixes cultivados, mas ainda considerados abaixo do limite preconizado pela ANVISA. Em um estudo prospectivo, Moura *et al.* (2018) também avaliou acumulação de Hg na fauna estuarina, de 2007 a 2015. Foi observada uma diferença significativa nas concentrações de Hg em invertebrados com diferentes hábitos alimentares, sendo mais altas em crustáceos carnívoros; porém, em peixes, não foi observada diferenças estatística entre diferentes hábitos alimentares. Novamente, os valores encontrados estavam abaixo do limite oficial, mas os pesquisadores acreditaram que as características hidroquímicas e hidrodinâmicas do ecossistema em questão, estariam contribuindo para crescente biodisponibilidade de

Hg, que, a longo prazo, e com o maior consumo regional, poderiam causar distúrbios crônicos na fauna e na população humana consumidora.

2.1.6. Detecção de hidrocarbonetos aromáticos

Andrade *et al.* (2019) avaliaram 18 tipos de PAHs ao longo do curso do Baixo Jaguaribe. A concentração total variou de 0,6 – 3752,0 ng/g, mostrando padrão de distribuição espacial distinto entre as áreas, com as maiores concentrações em pontos de coleta no estuário. Esses achados classificaram o estuário do Jaguaribe como moderado a altamente contaminado (1000 – 5000 ng/g), segundo a EPA. Houve predomínio de compostos de alto peso molecular (com quatro ou mais anéis), incluindo pireno e fluoranteno. O Benzopireno, hidrocarboneto de alto peso molecular conhecido por seu efeito carcinogênico em animais de laboratório, foi detectado em baixas concentrações na zona estuarina. As combustões de biomassa doméstica e de carvão em olarias contribuíram mais na zona fluvial, enquanto possíveis vazamentos de combustível náutico contribuíram mais na zona estuarina.

Apesar de um empenho relativamente grande em medir o impacto ambiental e a qualidade da água da Bacia do Jaguaribe durante o período dessas publicações, apenas um trabalho contemplou possíveis efeitos de contaminação ambiental sobre vertebrados terrestres da grande área do Jaguaribe, medindo a assimetria flutuante de *L. macrosternum* em áreas cultivadas (GONDIM *et al.*, 2020).

2.1.7. Considerações finais desta revisão

Através de toda a literatura revista foi possível perceber a importância do Rio Jaguaribe para o Ceará e para o Brasil, em termos de abastecimento de água, para consumo doméstico e industrial, para irrigação e para transporte, e para a manutenção ecossistêmica. Em síntese, para o progresso regional. Os contaminantes detectados foram discutidos à luz da saúde humana e animal. Apesar de a maioria dos estudos concluir que os níveis de contaminação ainda são baixos (comparados a outros rios), agrotóxicos, metais e hidrocarbonetos podem causar danos irreparáveis à saúde humana, animal e ambiental a longo prazo, mesmo em baixas concentrações ou doses.

O monitoramento é imprescindível, o controle e as fiscalizações são inadiáveis e punições aos infratores devem ser postas em verdadeira prática. A conscientização e a educação ambiental de usuários e população beneficiada devem ser contínuas. A concentração de uso deve ser combatida pelas autoridades e fiscalizada por todos.

- - -

Este capítulo foi publicado na Revista de Geociências do Nordeste (Anexo 6):

BRAGA, R.R.; MATUSHIMA, E. R. Vale do Jaguaribe: um oásis em perigo no semiárido brasileiro – Revisão sistemática sobre contaminação ambiental e potenciais danos à bacia e seus usuários. **Revista de Geociências do Nordeste**, v. 7, n. 2, p. 24–34, 2021. Disponível em: <https://periodicos.ufrn.br/revistadoregne/article/view/24607/14480>)

2.2. RÃ-MANTEIGA (*Leptodactylus macrosternum*): CARACTERÍSTICAS GERAIS E POTENCIAL COMO BIOINDICADOR AMBIENTAL

Os anfíbios são considerados bioindicadores de equilíbrio ambiental, tanto por compartilharem uma vida aquática e terrestre, quanto pela suposta sensibilidade fisiológica e imunológica aumentada aos estressores ambientais (SPARLING *et al.*, 2010). Os anuros representam a ordem mais numerosa da Classe Amphibia, com 7252 espécies, distribuídas em 52 famílias (FROST, 2020). Compõem cerca de 90% de todas as espécies da classe e representam um importante elo entre ecossistemas terrestre e aquático, bem como entre saúde humana, animal e ambiental (HAYES *et al.*, 2002).

Leptodactylidae é uma das famílias de maior riqueza e abundância das Américas Central e do Sul. Compreende 223 espécies de anuros distribuídas em 14 gêneros. Abrange rãs de médio a grande porte (chegando até 185 mm de comprimento rostro-cloacal), terrestres, saltadoras, e com fortes membros posteriores (AMPHIBIAWEB, 2020).

O gênero *Leptodactylus* (Fitzinger 1826) compreende 78 espécies classificadas por critérios morfológicos, comportamentais e genéticos em quatro grupos, a saber: *L. fuscus*, *L. pentadactylus*, *L. latrans* e *L. melanonotus*. As espécies do grupo *L. latrans* são conhecidas popularmente como “rãs-manteiga”, e incluem oito espécies de tamanho médio a grande, dentre as quais *L. macrosternum*, uma das espécies de interesse deste trabalho. Recentemente, o gênero passou por uma revisão taxonômica que definiu geneticamente os limites antes incertos entre espécies do grupo (MAGALHÃES *et al.*, 2020).

L. macrosternum está atualmente distribuída na América do Sul, desde a Venezuela até a Argentina (AMPHIBIAWEB, 2020). São rãs de médio a grande porte, medindo de 48 a 98 mm de comprimento rostro-cloacal, com coloração corporal variável. A morfologia externa compreende pele lisa e mucosa, com dez dobras dérmicas longitudinais dorsais; duas dobras longitudinais dérmicas dorsais secundárias ou auxiliares; coloração posterior das coxas variando entre tons de azul, cinza, verde e amarelo; pigmentação dorsal e dorsolateral composta de manchas oceladas castanho-escuras sobre fundo castanho-claro a amarelado; coloração ventral bege-claro e lisa; presença de pares de espinhos epidérmicos escuros, triangulares e pontudos nos polegares, e saco vocal bilobado castanho-escuro nos

machos (MAGALHÃES *et al.*, 2020). Quanto ao seu habitat, *L. macrosternum* tanto podem ser encontrados em ambientes úmidos de floresta quanto em áreas secas de savanas e campos (HEYER *et al.* 2008), além de serem bem adaptados a ambientes antropizados (DE LA RIVA e MALDONADO, 1999). Possuem hábitos noturnos e, quando adultos, dieta carnívora generalista (STEBBINS E COHEN 1997; DE LA RIVA e MALDONADO, 1999; ZUG *et al.* 2001). Reproduzem-se por ciclo potencialmente contínuo, sendo que, na região tropical do nordeste do Brasil, o pico de gametogênese ocorre no meses de maio e junho (CHAVES, 2016). Realizam amplexo axilar e constroem ninhos de espuma para proteger a desova, que é feita em meio à vegetação (ARAÚJO, 2015).

A grande maioria dos estudos experimentais com anfíbios envolve *Xenopus laevis*; seguidas por *Bufo* spp. e *Lithobates* (sin. *Rana*) spp., para estudos fisiológicos, ecológicos, toxicológicos e de monitoramento ambiental (BURGGREN *et al.*, 2007; SIMON *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2016; PULSFORD *et al.*, 2017). Segundo D'Ávila *et al.* (2020), em ampla revisão de estudos de associação de contaminantes químicos com o declínio global de anfíbios, as famílias Hylidae, Ranidae e Bufonidae têm sido as mais estudadas ao longo das últimas quatro décadas, principalmente na América do Norte. Somente nos últimos anos, os membros da família Leptodactylidae vem sendo utilizados como modelos e bioindicadores ambientais na América do Sul (VIANA, 2010; CORREIA *et al.*, 2014).

Revisando a literatura publicada sobre o tema na América do Sul, foram levantadas 85 publicações, através dos descritores “Leptodactylidae”, “environment”, “toxicity”, “biomarker”, “Brazil” no Google Scholar. A revisão compreendeu 63 artigos de periódicos científicos revisados por pares, 20 itens de literatura não revisada por pares (14 dissertações, 2 teses, 3 monografias e 1 resumo de evento), e dois capítulos de livro, realizados na Argentina, no Uruguai e no Brasil, publicados entre 2004 e 2020. A maioria dos trabalhos (60,0%; n=51) teve Leptodactídeos como modelo de estudo; os demais compreenderam citações na discussão dos resultados.

O Brasil publicou 52 trabalhos no período avaliado, seguido pela Argentina com 31. No Brasil, dentre os trabalhos realizados com Leptodactídeos como bioindicadores de contaminação química orgânica e inorgânica ambiental espontânea, publicados em periódicos revisados por pares, destacaram-se Correia *et al.* (2014), Moresco *et al.*(2015), Josende *et al.* (2016), Oliveira *et al.* (2017), Fanali *et al.* (2018, 2020), Montalvão *et al.* (2018), Franco-Belussi *et al.* (2020) e Gondim *et al.* (2020).

No nordeste do Brasil, a região do Baixo Rio Jaguaribe possui considerável riqueza de espécies de anuros, sendo de grande importância para a conservação deste grupo no domínio da Caatinga (SANTANA *et al.*, 2015). A Caatinga, que já foi uma região considerada pobre em biodiversidade, tem revelado ampla diversidade de espécies de fauna e flora (LEAL *et al.*, 2005). Apesar da importância, a Caatinga é negligenciada pelos financiamentos públicos para pesquisa, sendo intensamente ameaçada pela fragmentação de habitats e uso intensivo do solo para pastagem e agricultura (ANTONGIOVANNI *et al.*, 2020). No contexto da exploração agrícola, é cada vez mais preocupante o uso de agrotóxicos e fertilizantes químicos nos perímetros irrigados do Baixo Rio Jaguaribe e os consequentes riscos às saúdes ambiental, humana e animal (BRAGA e MATUSHIMA, 2021).

Dentre as espécies de anuros nativas da microrregião do Baixo Rio Jaguaribe (BRJ), *L. macrosternum* (Figura 2) é considerada abundante e estável em status de conservação (AMPHIBIAWEB, 2020), portanto, se caracteriza como adequada para um possível biomonitoramento de toxicidade. Como outras do mesmo gênero, trata-se de uma rã de médio porte, com 60 a 80 mm de comprimento rostro-cloacal, noturna, dieta generalista e adaptada a áreas antropizadas (DIXON e STATON, 1976; TELES *et al.*, 2014). Seu potencial como bioindicador ambiental no Vale do Jaguaribe está sendo investigado, com resultados importantes na avaliação da assimetria flutuante (GONDIM *et al.*, 2020) e das alterações gonadais (GONDIM *et al.*, manuscrito em elaboração) secundárias à pressão antrópica em áreas de cultivo no BRJ.

Figura 2. *L. macrosternum*, adulto.



Fonte: Braga (2021).

2.3. BIOMARCADORES DE TOXICIDADE AMBIENTAL

Biomarcadores¹ são respostas bioquímicas, fisiológicas e morfológicas de organismos vivos a danos orgânicos diversos. Os biomarcadores também funcionam como preditores de danos futuros e servem de medida de resposta à toxicidade em indivíduos, espécies, comunidades e ecossistemas. Enzimas hepáticas, proteínas plasmáticas, alterações sanguíneas e danos ao DNA são frequentemente medidos e utilizados como biomarcadores de resposta à toxicidade ambiental. Entretanto, além de enzimas e proteínas plasmáticas, a formação de tumores e os danos celulares e teciduais, detectáveis à necrópsia e à histopatologia, funcionam como biomarcadores (MELANCON, 2003).

2.3.1. Anfíbios e ecotoxicologia

No último século, o avanço da industrialização resultou em contaminação do meio ambiente por componentes químicos orgânicos, inorgânicos, radioativos, gasosos e nanoparticulados. Dentre os componentes químicos inorgânicos destacam-se os EQTP, cuja denominação atual refere-se principalmente a metais e metaloides contaminantes que representam risco toxicológico para ambiente, animais e humanos (DUFFUS, 2002; POURRET e HURSTHOUSE, 2019; BRIFFA *et al.*, 2020).

Como parte do *National Pollution Discharge Elimination System*, vêm-se desenvolvendo os programas de biomonitoramento, que consistem na avaliação de toxicidade em populações de organismos endêmicos de áreas afetadas (NPDES, 1989 apud MELANCON, 2003). Os bioindicadores ambientais respondem aos contaminantes funcionando como preditores de danos futuros à sua população, ao seu ecossistema e aos humanos (MELANCON, 2003). As concentrações de contaminantes nos tecidos dos bioindicadores informam sobre distribuição geográfica e temporal, bem como seus gradientes e circunstâncias de contaminação (BEYER e MEADOR, 2011).

¹ Melancon (2003) interpreta “bioindicadores” e “biomarcadores” da mesma forma; neste trabalho, entretanto, considero “bioindicador” o organismo modelo de alterações e “biomarcador” a resposta fisiológica desse modelo, que será mensurada nas análises.

Em monitoramento ecotoxicológico, peixes, aves e mamíferos vinham sendo usados como bioindicadores gerais. No entanto, após os registros de declínio das populações de anfíbios nas Américas, Europa e Austrália, constatou-se que os testes conduzidos naqueles grupos não poderiam ser extrapolados para proteger répteis e anfíbios. Desta forma, foram testadas espécies de anuros das famílias Ambystomatidae, Microhylidae, Hylidae, Ranidae e Bufonidae. Esses resultados foram comparados com os de toxicidade em diferentes espécies de peixes, e observou-se grande variação de sensibilidade a contaminantes orgânicos e metais dentre as espécies de anfíbios, mostrando concentrações letais superiores às dos peixes na grande maioria dos experimentos (HOFFMAN, 2003).

Na última década, estudos ecológicos sobre o acúmulo de elementos potencialmente tóxicos em tecidos de anuros têm sido conduzidos em diversos continentes, especialmente em áreas de mineração e agricultura (JOFRÉ *et al.*, 2012; ADLASSNIG *et al.*, 2013; DMOWSKI *et al.*, 2015; PROKIC *et al.*, 2016; SINGH *et al.*, 2016; KUIWA *et al.*, 2020; THANOMSANGAD *et al.*, 2020). No Brasil, alguns estudos sobre acúmulo e efeito de elementos potencialmente tóxicos em anuros silvestres têm sido produzidos na última década, entretanto, poucos deles foram publicados em periódicos revisados por pares (CORREIA *et al.*, 2014; ZOCHE *et al.*, 2014). Os tecidos mais frequentemente analisados são fígado, rins e músculo esquelético, seguidos de ossos longos, pele e intestino. Na grande maioria dos trabalhos, eles são analisados separadamente e, raramente, a carcaça inteira é estudada (LOMBOURDIS e WRAY, 1998).

2.3.2. Disrupção endócrina

O sistema endócrino é responsável pelo controle geral das funções fisiológicas, incluindo metabolismo, crescimento e reprodução (GRECO e STABENFELDT, 2013). A endocrinologia ambiental estuda as influências de fatores naturais (fotoperíodo, temperatura, feromônios etc.) sobre o funcionamento do sistema endócrino e seus efeitos sobre os órgãos-alvo e homeostase. Diante do cenário mundial de desmatamento e antropização de ambientes naturais, passou-se também a pesquisar a disrupção endócrina, termo que define a influência de contaminantes sobre o controle do comportamento, crescimento e reprodução das espécies de vida livre (NORRIS e CARR, 2013).

Substâncias químicas que atuam como disruptores endócrinos podem agir por ligação seletiva a receptores hormonais, estimulando (agonistas) ou bloqueando (antagonistas) respostas mediadas por hormônios (JOBLING e TYLER, 2003).

Em humanos, diversas alterações foram associadas à interferência de compostos químicos na regulação dos eixos endócrinos, como, alterações no desenvolvimento fetal e na diferenciação sexual (criptorquidismo, hipospadia, baixa qualidade do sêmen); hipotireoidismo neonatal; puberdade precoce, e autoimunidade endócrina (diabetes mellitus tipo 1, tireoidite de Hashimoto, doenças de Graves e/ou de Addison, hipofisite, hipoparatiroidismo, ooforite, falência ovariana e insuficiência testicular) (LATINI et al., 2010).

Peixes, anfíbios e outros organismos aquáticos são frequentemente utilizados como bioindicadores de disrupção endócrina, em geral alterações que já foram descritas em humanos. Há quarenta anos, foram registradas as primeiras alterações hiperplásicas e hipertróficas em tireoides de salmonídeos de águas gravemente poluídas nos Estados Unidos (LEATHERLAND e SONSTEGARD, 1982; LEATHERLAND *et al.* 1989; LEATHERLAND, 1993). No Chile, foram observadas indução da vitelogenina, redução da testosterona sérica e alterações degenerativas nas gônadas do anuro *X. laevis* de vida livre em região de diferentes corpos d'água no centro do país (ROJAS-HUCKS *et al.*, 2019). No Canadá, foi observada frequência significativamente aumentada de *ovotestis* em *Rana pipiens* expostas a agrotóxicos em áreas de cultivo de milho (McDANIEL *et al.*, 2008). Foram observadas alterações testiculares em crocodilos jovens em um lago contaminado na Flórida (SEMENZA et al., 1997) e na costa sul dos Estados Unidos, *Tursiops truncatus* (golfinhos nariz-de-garrafa) expostos a derramamento de óleo apresentaram alterações adrenocorticais, com dano à produção de cortisol e secreção de aldosterona (HARVEY, 2016). Ressalta-se mais uma vez que a carência de estudos ecotoxicológicos publicados com anuros leva a uma extrapolação imperfeita com grupos taxonômicos diferentes, que tem maior intuito de informar, devido ao seu caráter especulativo.

2.3.3. Alterações imunológicas

Estudos têm mostrado que uma ampla variedade de contaminantes ambientais afeta o sistema imunológico de vertebrados e invertebrados (MELANCON, 2003).

Vários mecanismos podem alterar o sistema imunológico de animais e humanos, causando danos agudos, crônicos, primários e secundários. Dentre os mecanismos, a exposição a contaminantes químicos pode causar (GUPTA, 2007):

- Danos teciduais e imunoestimulação tóxica, com posterior autoimunidade;
- Imunodepressão, interferência em vacinação profilática e aumento de infecções;
- Estresse generalizado e interferência endócrina;
- Interação com macromoléculas, haptenos e consequente hipersensibilidade.

Várias classes de contaminantes químicos orgânicos (agrotóxicos) e EQTP são relatados na literatura com ação imunotóxica, como inseticidas organofosforados e herbicidas, metais como Cu, Cr (Cromo), Hg, Mo (Molibdênio), Pb, Se (Selênio), Va (Vanádio) e Zn, que reduzem a produção de anticorpos e alteram a morfologia de baço, timo e linfonodos (GUPTA, 2007).

Nos últimos anos, pesquisas sobre a interação imuno-neuroendócrina vêm esclarecendo sobre a importante influência dos disruptores endócrinos no sistema imune, produzindo, além dos supracitados efeitos, falhas na liberação de citocinas, hormônios e neurotransmissores, e alterações no desenvolvimento da imunidade fetal (GALBIATI *et al.*, 2021).

Inúmeros ensaios de função imunológica – como quantificação de metalotioneínas, proteínas de estresse térmico e anticorpos – além de produção de cDNA, exames histopatológicos e imunohistoquímicos estão disponíveis para avaliar respostas imunotoxicológicas que atuam como biomarcadores (MELANCON, 2003).

2.4. POSSÍVEIS DANOS DOS COMPOSTOS QUÍMICOS DETECTADOS NO VALE DO JAGUARIBE À SAÚDE ANIMAL, HUMANA E AMBIENTAL

Sobre os agrotóxicos detectados em maior concentração no Vale do Jaguaribe, esses podem afetar humanos e animais, causando principalmente alterações no fígado, nos sistemas reprodutivo e nervoso. Os fungicidas triazóis podem causar hepatotoxicidade aguda e carcinogênese hepática. A Atrazina e o Lindano funcionam como disruptores endócrinos, podendo causar feminização de indivíduos machos (pela expressão da aromatase) e toxicidade testicular. O Clorpirifós, dentre outros organofosforados, interfere na condutividade nervosa e na atividade da acetilcolinesterase, assim como estresse oxidativo no sistema nervoso central, podendo resultar em alterações neurocomportamentais. O Imidacloprida e a Clotianidina também podem alterar as reações colinérgicas, porém são considerados de alta margem de segurança por serem extremamente seletivos (GUPTA, 2007). Além dos previamente listados, pesquisas mais recentes levantaram outros efeitos em humanos e animais. O Lindano e seus isômeros (α , β , δ -hexaclorobenzeno) foram detectados no soro de 96% de pacientes com Doença de Parkinson, sendo o β -hexaclorobenzeno o componente estatisticamente mais associado (RICHARDSON *et al.*, 2009). Navaratne *et al.* (2014) observaram mortalidade aguda em girinos expostos a 0,1 ppm de Clorpirifós. Outras pesquisas relataram que a Atrazina causou degeneração miocárdica e desorganização sinusoidal hepática, por via direta e através de disfunção iônica (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+}) em codornas, bem como falhas de desenvolvimento transgeracionais em ratos (LIN *et al.*, 2016; McBIRNEY *et al.*, 2017). Sun *et al.* (2016) observaram que o imidacloprida induziu adipogênese e resistência à insulina em camundongos, enquanto outros autores observaram efeitos crônicos subletais em comunidades de invertebrados, dentre as quais abelhas polinizadoras, afetando comportamento, alimentação e funções ecológicas (VAN DIJK *et al.*, 2013; DVELY *et al.*, 2015; SUN *et al.*, 2016; MILES *et al.*, 2017). Ilyushina *et al.* (2019) observaram inibição da eritropoiese em medula óssea de camundongos expostos a fungicidas triazóis.

A exposição ocupacional a agrotóxicos está relacionada com o risco aumentado de neoplasias hematológicas (linfoma não-Hodgkin, leucemias e mieloma múltiplo); inclusive, níveis séricos de agrotóxicos não persistentes já foram significativamente correlacionados com contagens anômalas de células linfoides e

mieloides em trabalhadores rurais no sul do Brasil (MERHI *et al.*, 2007; PICCOLI *et al.*, 2019). Mesmo a exposição a inseticidas ou herbicidas residenciais, os quais são utilizados em menores concentrações ou frequência, pode aumentar o risco de neoplasias infantojuvenis de 1,23-1,47 vezes, incluindo neuroblastomas, nefroblastomas e leucemias (CHEN *et al.*, 2015).

Considerando a detecção de EQPT no Rio Jaguaribe e em seu estuário, os efeitos sobre humanos e animais também causam inquietações. Os EQPT em geral produzem toxicidade quando formam complexos com compostos celulares contendo S (enxofre), N (nitrogênio) e O (oxigênio), os quais inativam sistemas enzimáticos e modificam estruturas proteicas, afetando o metabolismo em nível celular, podendo causar a morte das células. Os sistemas mais afetados são o sistema nervoso central, gastrointestinal, cardiovascular, hematopoiético, renal e sistema nervoso periférico (SHARMA *et al.*, 2014).

O Cu foi um dos metais cuja detecção causou maiores preocupações. As doses tóxicas são variáveis entre as diferentes espécies animais. Em intoxicações agudas, lesões hepáticas e renais graves costumam se manifestar em até 48 horas, geralmente letais (THOMPSON, 2007a). Os principais relatos de intoxicação crônica em animais envolvem as espécies bovina e ovina, quando se alimentam em solos, água e pastos contaminados por calda bordalesa (mistura de CuSO_4 com ação fungicida), suplementos à base de Cu e esterco de aves e suínos (O'DELL, 1997).

Foram detectadas altas concentrações de Cu e Zn em viveiros de camarões na região do estuário do Rio Jaguaribe. Aventou-se que neste caso, esses camarões poderiam ser fonte de contaminação alimentar, uma vez que ocorre o acúmulo dos metais nos tecidos e a depuração via exoesqueleto. A intoxicação pelo Zn em humanos é considerada um evento raro, mais relacionado com ingestão acidental de grandes quantidades de suplementos; contudo, tem bastante gravidade, uma vez que promove estresse oxidativo metabólico e dispara a morte celular programada em diferentes tecidos, incluindo o sistema nervoso (PLUM *et al.*, 2010). O Cd, cujos níveis foram considerados abaixo do limite legal estabelecido, nem por isso deve ser excluído dos monitoramentos, uma vez que a exposição crônica de ratos a esse elemento químico, mesmo em baixos níveis, causou carcinogênese (LEE E WHITE, 1980), osteoporose e defeito de vascularização em ossos compactos (DURANOVA *et al.*, 2014), distrofia do esmalte dentário (ŚWIETLICKA *et al.*, 2019) e alterações inflamatórias na próstata (SANTANA *et al.*, 2016). Em humanos, a exposição

ocupacional tem sido relacionada a nefropatias e osteomalacia com osteoporose (HOOSE, 2007).

Segundo a *Food and Drug American Agency* (FDA), a acumulação de Hg em peixes para consumo não deve ultrapassar 1 ppm (GUPTA, 2007), o que é considerado pela ANVISA (BRASIL, 2013b) como 1,0mg/kg (peixes carnívoros) e 0,5mg/kg (peixes não-carnívoros). Mesmo em concentrações mínimas de 50µg/g, Amorim *et al.* (2000) encontraram correlação direta entre contaminação por metilmercúrio (metabólito do Hg inorgânico acumulado em peixes) e danos citogenéticos aos linfócitos periféricos em moradores de ilhas fluviais ao longo do Rio Amazonas. Em animais de laboratório, exposição crônica a metilmercúrio e fenilmercúrio, mesmo em níveis considerados baixos, pode causar danos aos rins, estômago e intestino grosso, alterações de pressão arterial e frequência cardíaca, anomalias de desenvolvimento e abortos, alterações espermáticas e espermatogênicas; em animais pecuários, além de alterações nos órgãos já citados, os sinais neurológicos mostraram-se mais evidentes (GUPTA, 2007; BRASIL, 2013; GENCHI *et al.*, 2017).

Os metais Al e Pb foram detectados em altas concentrações na água de um poço profundo na região do Baixo Jaguaribe. Ambos estão relacionados a estresse oxidativo geral e anemia hipocrômica, e danos orgânicos dependem de em qual tecido eles se depositam em maior concentração; o Pb causa neurotoxicidade por disrupção da barreira hematoencefálica e alteração de neurotransmissores, em animais e humanos (THOMPSON, 2007b), enquanto o Al tem sido implicado como participante de doenças neurodegenerativas (GUPTA, 2007).

Pireno e fluoranteno estão entre os PAHs detectados em maiores concentrações no Baixo Jaguaribe. Os PAHs em geral causam toxicidade aguda metabólica para organismos aquáticos e aves silvestres, exacerbada na presença de luz ultravioleta. Toxicidade crônica pode incluir carcinogênese e alterações de imunidade, reprodução e desenvolvimento (ABDEL-SHAFY E MANSOUR, 2016). Em humanos, a exposição aguda a altos níveis de PAHs, dependendo da via de exposição, pode causar irritação ocular, náusea, vômito, diarreia e confusão mental (UNWIN *et al.*, 2006). Efeitos crônicos compreendem catarata, insuficiências hepática e renal, disfunções respiratórias tipo asma, além de carcinogênese respiratória e digestória (OLSSON *et al.*, 2010; DIGGS *et al.*, 2011). O benzopireno, que também foi detectado no Baixo Jaguaribe, mas em níveis mais baixos, foi o primeiro dos PAHs

com atividade carcinogênica a ser descoberto. Em animais experimentais, o benzopireno produziu câncer de pulmão, quando inalado; câncer de estômago, quando administrado na água de beber; e câncer de pele, através de administração tópica (ABDEL-SHAFY E MANSOUR, 2016).

2.5. HIPÓTESES CIENTÍFICAS

2.5.1. Hipótese 1: H_0 = As carcaças de *L. macrosternum* (Lm) (exceto órgãos celômicos) em áreas cultivadas NÃO ACUMULAM diferentes concentrações de EQPT de áreas não cultivadas / H_A = As carcaças de Lm (exceto órgãos celômicos) em áreas cultivadas ACUMULAM diferentes concentrações de EQPT de áreas não cultivadas.

2.5.2. Hipótese 2: H_0 = A exposição a EQTP NÃO INFLUENCIA alterações morfológicas em órgãos endócrinos (tireoide, paratireoides, adrenais e pâncreas) de Lm / H_A = A exposição a elementos químicos potencialmente tóxicos INFLUENCIA alterações morfológicas em órgãos endócrinos (tireoide, paratireoides, adrenais e pâncreas) de Lm.

2.5.3. Hipótese 3: H_0 = A exposição a elementos químicos potencialmente tóxicos NÃO INFLUENCIA alterações morfológicas em órgãos linfoides (timo e baço) de Lm / H_A = A exposição a elementos químicos potencialmente tóxicos INFLUENCIA alterações morfológicas em órgãos linfoides (timo e baço) de Lm.

3. OBJETIVOS GERAIS

Examinar biomarcadores morfológicos e medir elementos químicos potencialmente tóxicos em amostras de tecidos do anuro *L. macrosternum* a fim de avaliar a espécie como possível ferramenta de biomonitoramento de agrossistemas na microrregião do BRJ, estado do Ceará, nordeste do Brasil.

3.1. Objetivos específicos

- a) Detectar e quantificar os elementos químicos inorgânicos e potencialmente tóxicos em carcaças de *L. macrosternum* coletados de áreas cultivadas e não cultivadas no BRJ, através de Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (*Inductively coupled plasma mass spectrometry* – ICP-MS);
- b) Avaliar tecidos linfoides e hematopoiéticos dos espécimes amostrados, quanto a possíveis alterações morfológicas, macro e microscópicas;
- c) Avaliar tecidos endócrinos dos espécimes amostrados, quanto a possíveis alterações morfológicas, macro e microscópicas;
- d) Classificar as lesões encontradas por critérios histopatológicos;
- e) Correlacionar possíveis alterações linfoides e endócrinas com os elementos químicos detectados nas carcaças.

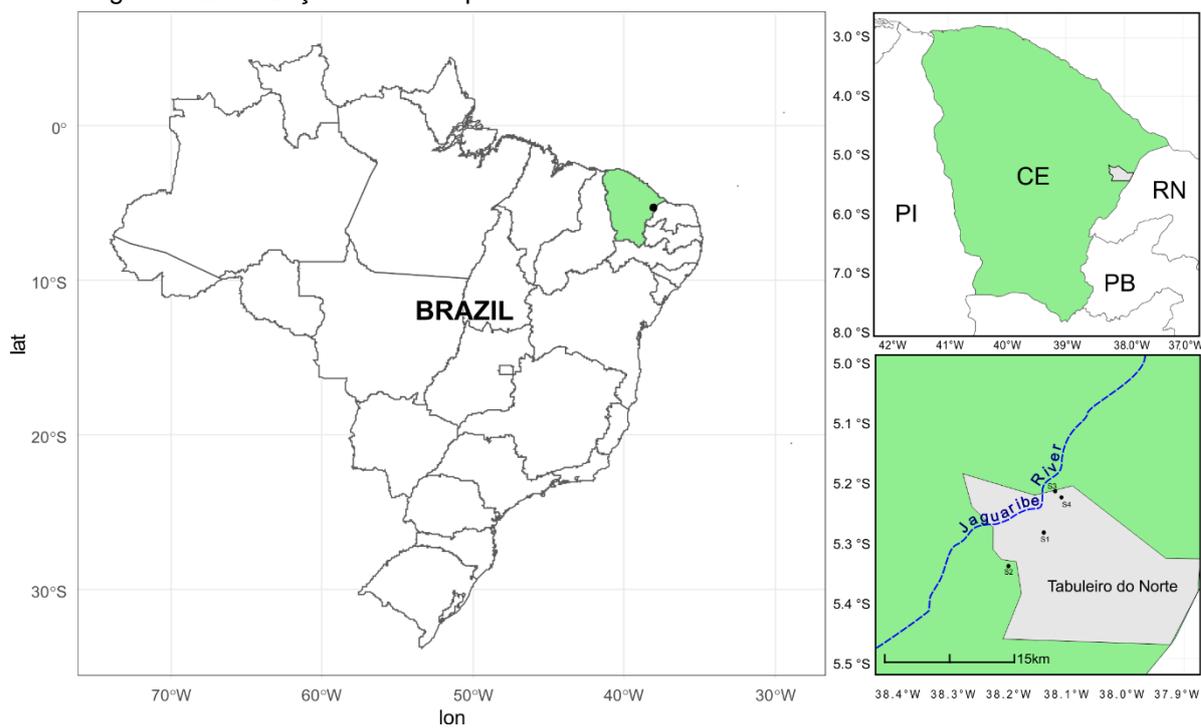
4. MATERIAL E MÉTODOS

Este deriva de um projeto original intitulado “O impacto das práticas agrícolas sobre as comunidades de anuros em uma área de caatinga do nordeste brasileiro” (CNPq n° 402241/2016-9), que avaliou assimetria flutuante, índices hepato e gonadossomáticos e anormalidades gonadais, utilizando o fígado e os corpos de gordura como amostras para detecção de compostos químicos orgânicos (agrotóxicos) e possíveis relações de causa e efeito (GONDIM et al., 2020; GONDIM, 2021).

4.1. Amostragem e área de estudo

O município escolhido foi Tabuleiro do Norte ($5^{\circ}13'44''\text{S}$ $38^{\circ}07'25''\text{W}$), localizado na Chapada do Apodi, BRJ, Brasil, importante polo de agricultura irrigada na fronteira entre os estados do Ceará e Rio Grande do Norte (Figura 3). A área de estudo pertence ao domínio morfoclimático da Caatinga, clima semiárido tropical, apresentando temperatura média e precipitação total de 27°C e 794 mm ao ano, respectivamente (CEARÁ, 2017). Foram selecionados diferentes sítios de coleta (S1, S2, S3 e S4), classificados como não cultivadas (áreas A0, incluindo os sítios S1 e S2, áreas de vegetação herbácea e arbustiva, ladeando corpos d'água, com áreas médias de 2 km^2) e áreas cultivadas (áreas A1, incluindo os sítios S3 e S4, sob regime de agricultura comercial de arroz, feijão, milho, banana; com áreas de 2 a 4 km^2), distantes no mínimo 8 km entre si. As áreas estão representadas nas Figuras 4 e 5.

Figura 3. Localização do município de Tabuleiro do Norte e dos sítios de coleta de amostras.



Fonte: Braga (2021). Elaborado no software R v.4.0.2 pacote GGLOT2.

Figura 4a. Tabuleiro do Norte, BRJ. Áreas não cultivadas, corpos d'água e vegetação herbácea.



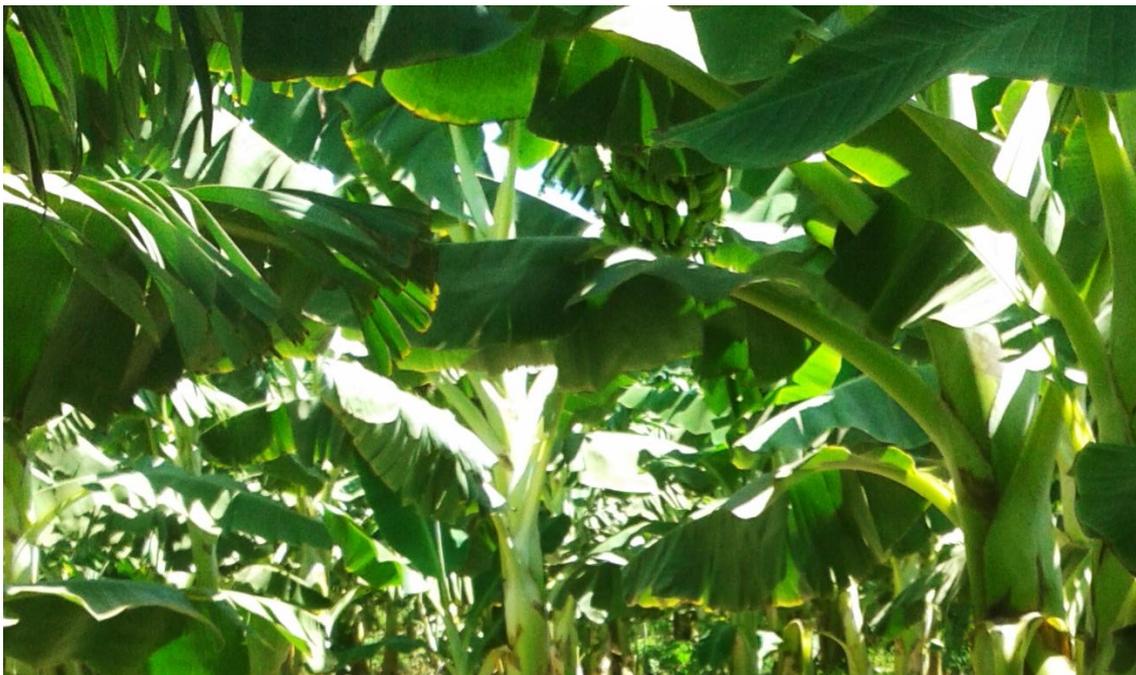
Fonte: Gondim (2017).

Figura 4b. Tabuleiro do Norte, BRJ. Áreas não cultivadas, vegetação xerófita e arbustiva.



Fonte: Gondim (2017).

Figura 5a. Tabuleiro do Norte, BRJ. Áreas cultivadas, plantação de bananas.



Fonte: Gondim (2017).

Figura 5b. Tabuleiro do Norte, BRJ. Áreas cultivadas, plantação de milho sob estrutura de irrigação.



Fonte: Gondim (2017).

Os espécimes foram coletados manualmente no final da estação chuvosa de 2017 (maio-junho), que se apresentou com 36% a mais de pluviosidade acumulada que a média dos cinco anos anteriores. Eles foram imediatamente transportados em sacos plásticos de polietileno, aerados, para um laboratório de apoio montado para este fim. No laboratório, foram mensurados comprimento rostro-cloacal (CRC) e massa corporal.

4.2. Aspectos éticos e eutanásia

A coleta foi autorizada pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SisBio-IBAMA nº 58724-1, Anexo 1), e os procedimentos foram avaliados e autorizados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP) (protocolo nº 4387250118). Os espécimes foram eutanasiados com injeção intracardíaca de cloridrato de lidocaína 30mg/kg (BRASIL, 2013; CHATIGNY *et al.*, 2017). Vale ressaltar que, logo após a eutanásia, os espécimes foram dissecados para coleta do fígado e das gônadas para outros estudos, enquanto as carcaças com o restante dos órgãos foram conservadas para este projeto.

4.3. Necrópsia e processamento histológico

As carcaças foram fixadas em formaldeído a 10% (v/v) por 48-72h, e transferidas para etanol 70% (v/v), em que foram conservadas por 12 meses até o momento das necrópsias e 24 meses até as análises químicas. Para acessar a tireoide, as laringes foram removidas e sofreram cortes sagitais e paramedianos, enquanto as faces de corte foram submetidas à microtomia. As paratireoides e o pâncreas passaram por prévia inspeção macroscópica; a tireoide e as interrenais foram avaliadas apenas microscopicamente. Os timos foram coletados dissecando-se a musculatura depressora da mandíbula, caudalmente ao tímpano, e os baços desconectados de ligamentos conjuntivos anexos ao intestino grosso e estômago dorsal. Os fragmentos de órgãos foram submetidos ao processamento histológico de rotina, cortados a 5µm de espessura e corados em hematoxilina-eosina. Amostras portadoras de granulomas foram coradas com Ziehl-Neelsen e metenamina de prata de Grocott para pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes e leveduras.

4.4. Histopatologia

As alterações histológicas dos órgãos endócrinos foram classificadas qualitativamente (presença/ausência e categorias) e semi-quantitativamente (ranqueamento), com base em Accordi e Cianfoni (1981) e NTP(2018).

As alterações histológicas dos órgãos linfoides foram classificadas com base em Cesta (2006), Elmore (2006), Franco-Belussi e Oliveira (2016) e NTP(2018).

4.5. Quantificação de elementos químicos potencialmente tóxicos nas carcaças de *L. macrosternum*

4.5.1. Secagem e trituração das carcaças

As carcaças conservadas foram transportadas para o Laboratório Acadêmico de Patologia Silvestre da Universidade Federal do Ceará (LAPS-UFC). No momento oportuno, as carcaças foram retiradas do álcool e secas ao ar por no mínimo 24h, seguindo para a secagem em estufa a $60 \pm 5^\circ\text{C}$ por 48-72h, até peso constante. Cada carcaça seca foi triturada em liquidificador doméstico de copo acrílico e lâmina inox, e homogeneizada em peneira de nylon com trama de 1mm^2 . Para evitar contaminação cruzada, os utensílios foram higienizados entre as triturações, com escova e detergente neutro, lavados com água sob pressão de 1740 libras/polegada², e posteriormente enxaguadas com água deionizada.

4.5.2. Preparação das amostras

Aproximadamente 0.2 g de amostra foram transferidos para tubos de 50 mL e 3.0 mL de HNO_3 concentrado, previamente purificado em sistema de destilação abaixo do ponto de ebulição (DST-1000, Savillex, EUA), foram adicionados. A mistura foi deixada em repouso por cerca de 48 h para a pré-digestão das amostras. Após isso, as amostras foram submetidas a aquecimento em banho-maria a uma temperatura de $95 \pm 5^\circ\text{C}$ por 4 h. Por fim, os tubos foram preenchidos com água ultrapura (resistividade igual a $18.2\text{ M}\Omega\text{ cm}$), obtida a partir de um sistema de purificação de água (Master System All, Gehaka, Brasil), até a marcação de 35 mL. As soluções

resultantes foram armazenadas sob refrigeração visando a posterior determinação de Al, As (Arsênio), Ca (Cálcio), Cd, Cr, Co (Cobalto), Cu, Fe (Ferro), Mg (Magnésio), Mn (Manganês), Ni (Níquel), P (Fósforo), Pb, S (Enxofre) e Zn (Zinco) por espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). Os elementos essenciais Ca, Mg, P e S foram mensurados para fins de correlação de elementos potencialmente tóxicos com tecidos pelos quais tivessem maior afinidade.

4.5.3. Cálculo dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

Para controlar possíveis contaminações dos reagentes e do manuseio das amostras durante o procedimento de preparo de amostras, brancos analíticos foram preparados e submetidos às mesmas etapas e procedimentos das amostras. As concentrações dos analitos obtidas nos brancos analíticos foram utilizadas para a obtenção dos LDs e LQs, os quais foram calculados de acordo com as instruções descritas no protocolo de validação analítica do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO, 2016).

4.5.4. Controles positivos e cálculo da exatidão

Com o intuito de avaliar a exatidão do método, dois materiais de referência certificados (CRMs) foram analisados. O CRM RB-1 (rim bovino) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) e o CRM TORT-3 (hepatopâncreas de lagosta) do *National Research Council* – Canada (NRC) foram submetidos aos mesmos procedimentos das amostras. Em suma, as concentrações obtidas para os elementos analisados nesse estudo não apresentaram diferenças significativas (teste t de Student, nível de confiança de 90%) dos valores reportados nos certificados desses materiais.

4.5.5. Determinação elementar por ICP-MS

As amostras foram analisadas em triplicata em um espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS 7900, Agilent, Hachioji, Japão) equipado com cela de colisão para a minimização de interferências espectrais. O gás de colisão utilizado foi o Hélio nos seguintes modos de análise: [He], em que a vazão

de He foi de 5 mL/min, e [HHe], em que a vazão de He foi de 10 mL/min. Uma solução padrão de Y (10 µg/L) foi utilizada como padrão interno para correção do sinal analítico devido aos efeitos de matriz. As faixas de trabalho das curvas de calibração variaram de 1 a 200 µg/L para Al, As, Cd, Co, Cu, Cr, Mn, Ni, Pb e Zn, e de 100 a 5000 µg/L para Ca, Fe, Mg, P e S.

4.5.6. Critérios de inclusão no estudo

Para a análise histológica, somente foram incluídas no estudo as lâminas que conseguiram amostrar os diminutos órgãos-alvo em quantidade e qualidade suficiente para realizar a análise (cortes não fragmentados, sem artefatos de preguçamento ou irregularidade na coloração).

Para as análises químicas, somente foram incluídas as carcaças conservadas com no mínimo 14g, pois após secas e trituradas produziram pelo menos 1,5g de amostra.

4.5.7. Análise de dados

Os principais achados histológicos foram apresentados em tabela com dados de frequência absoluta e relativa. Os dados de presença/ausência de alterações histológicas foram tabulados juntamente com dados demográficos (identificação do espécime, status de área [não cultivada, cultivada], comprimento rostro-cloacal (CRC) e sexo) para análise através de teste do Qui-quadrado de Pearson e de modelos lineares generalizados (*Generalized Linear Models*, GLM).

Posteriormente foram adicionados os dados de concentração de elementos químicos inorgânicos quantificados nas carcaças analisadas por ICP-MS em planilha eletrônica. As categorias utilizadas como variáveis resposta foram CRC, sexo, índice corporal, classes de lesões endócrinas e linfoides; enquanto o status de área e os sítios de coleta foram utilizados como variáveis explicativas. O índice corporal foi definido como a razão entre o CRC e a massa. As concentrações dos analitos foram expressas em médias \pm desvio padrão. As concentrações nos diferentes status de área foram comparadas quanto às medianas e variâncias pelos testes de Wilcoxon e teste F. As concentrações dos não-metais Ca, Mg, P e S foram utilizadas em matriz para esclarecer correlações entre os metais e elementos da própria carcaça. A análise

de componentes principais (*Principal Component Analysis*, PCA) explorou quais elementos foram responsáveis pela maior variabilidade de concentrações nos indivíduos estudados. Para realizar a PCA, os dados foram logaritmizados. A análise de agrupamento foi empregada a fim de agrupar os indivíduos em diferentes categorias, de acordo com o PCA.

Para investigar relações de causa e efeito entre os elementos potencialmente tóxicos quantificados nas carcaças e as alterações observadas nos órgãos endócrinos e linfoides, foram montadas duas matrizes separadas, a matriz X com as variáveis preditoras (contínuas: concentração dos elementos) e a matriz Y com as variáveis resposta (binárias: ausência/presença de alterações teciduais endócrinas ou linfoides), que foram submetidas à análise de redundância (*Redundancy Analysis*, RDA) para dados binários com respostas logísticas. A partir desta RDA, foram calculadas as probabilidades de relação causal entre os compostos potencialmente tóxicos e as lesões significativamente correlacionadas. Foi considerada significância estatística $p \leq 0,05$. As análises estatísticas foram executadas no software R versões 4.0.2 / 4.1.2 e pacotes diversos (R CORE TEAM, 2021; VICENTE-VILLARDÓN, 2021).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram incluídos órgãos de 100 indivíduos na análise (A0: 36 fêmeas, 14 machos; A1: 29 fêmeas, 20 machos, 1 juvenil). O CRC médio por área e sexo está apresentado na Tabela 2. Foi observado tamanho global significativamente menor nos indivíduos de áreas cultivadas.

Tabela 2. CRC médio de *L. macrosternum* nos diferentes status de área de exploração agrícola de Tabuleiro do Norte (CE).

Sexo	CRC médio (cm)		p-valor
	A0	A1	
Fêmeas	6,98	6,00	0,0001 ***
Machos	7,13	6,68	0,2631
CRC médio geral	7,02	6,25	0,0007 ***

***' $p \leq 0,001$. Fonte: Braga (2021).

5.1. Histopatologia endócrina

Os órgãos avaliados foram tireoides, paratireoides, ilhotas de Langerhans (pâncreas endócrino) e interrenais. Lesões degenerativas (46,5%) foram as mais observadas, seguidas por inflamatórias (21,0%). A frequência dos achados específicos está descrita na Tabela 3.

Tabela 3. Frequência relativa de alterações endócrinas observadas em amostras de *L. macrosternum* de áreas cultivadas (A1) e não cultivadas (A0) de Tabuleiro do Norte (CE).

Órgão	Processo	n	f(%)	
			A1	A0
Tireoide	Bócio nodular coloide	3	42,8	-
Paratireoides	Infiltrado granulocítico	9	20,0	9,6
	Congestão	4	8,3	2,9
	Granulomas	5	5,5	8,8
	Fibrose intersticial	2	-	5,8
	Coccídios (suspeito)	2	2,7	2,9
	Microcisto focal	2	-	5,8
Ilhotas	Hiperplasia	19	32,3	20,0
	Degeneração vacuolar	4	-	8,3
Interrenais	Degeneração vacuolar adrenocortical	37	34,1	60,5
	Degeneração vacuolar cromafin	34	31,7	55,2
	Congestão	24	26,8	34,2
	Hiperplasia adrenocortical	21	31,7	21,0
	Infiltrado mononuclear	21	24,3	28,9
	Angiectasia	14	19,5	15,8
	Microcisto focal	5	9,8	2,6
	Necrose adrenocortical	4	4,9	5,2
	Corpos residuais	3	2,4	5,2
	Fibrose periarteriolar	2	-	5,2

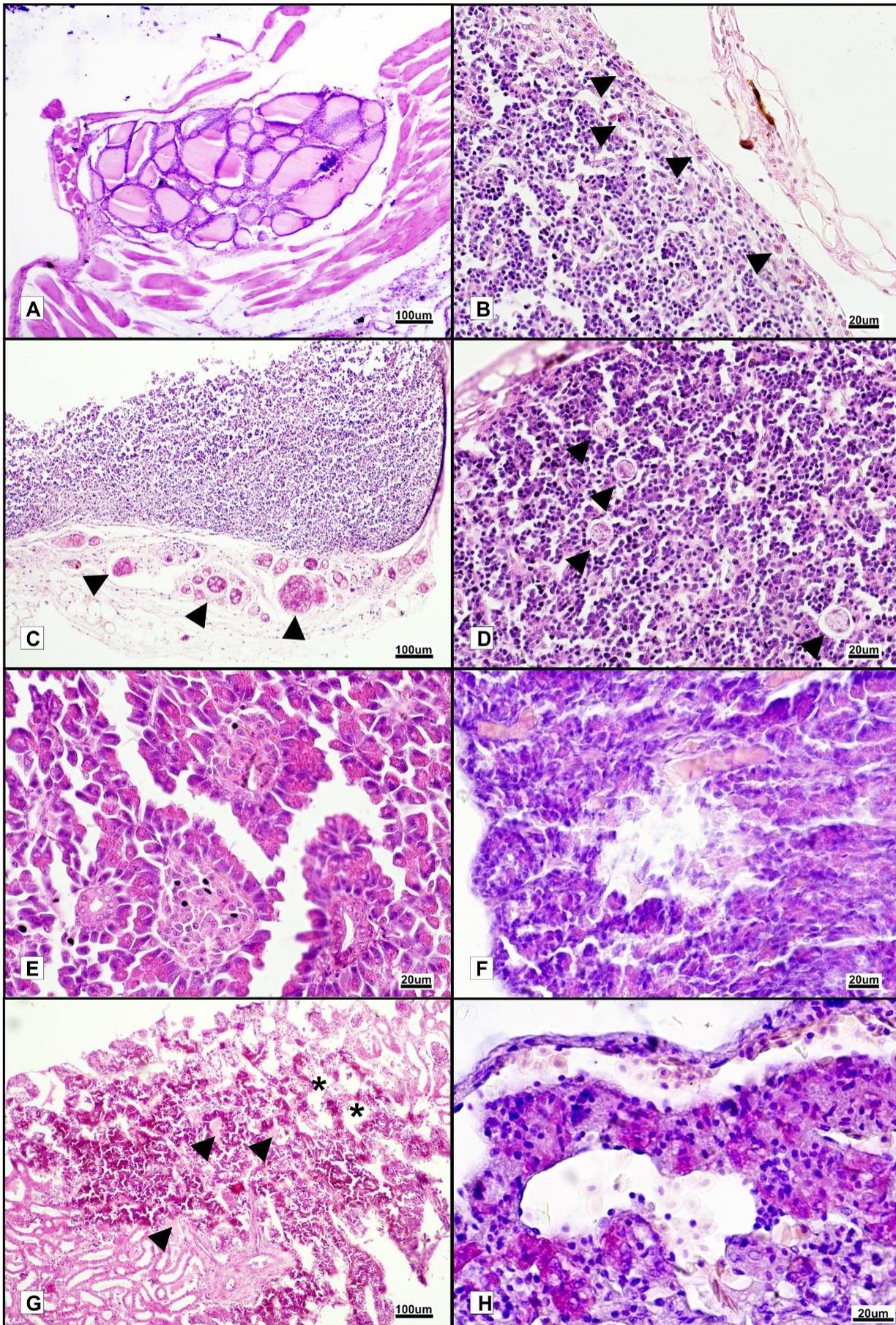
Fonte: Braga (2021).

5.1.1. Tireoide

Apesar das referências topográficas, as tireoides não foram observadas a olho nu durante as necrópsias. Pelo reduzido tamanho do órgão e o fato de se encontrar inserida na musculatura ventrolaringeana, houve dificuldade de obter o tecido nos cortes microtômicos. Baseando-se nos cortes bem-sucedidos, estimou-se que o tamanho do órgão no adulto da espécie amostrada não ultrapassou 0,8 x 0,8 x 0,4 mm. No final, apenas sete amostras estiveram disponíveis para análise, todas provenientes de áreas cultivadas. Bócio nodular foi detectado em 42,8% (3/7) das

amostras (Figura 6A), todos os achados em fêmeas, do sítio de coleta nº3, com CRC médio de 6,09cm. Embora a frequência relativa tenha se mostrado digna de nota, o reduzido tamanho da amostra se tornou um limitante para uma conclusão acurada.

Figura 6. Alterações histológicas observadas em órgãos endócrinos de *L. macrosternum* em áreas cultivadas de Tabuleiro do Norte (CE). A) Tireoide. Bócio nodular coloide. Macro e microfoliculos, revestidos predominantemente por epitélio folicular achatado. Os folículos maiores são preenchidos por coloide denso, eosinofílico, enquanto os menores são preenchidos por coloide mais pálido. 100x, HE. B) Paratireoide. Infiltrado granulocítico leve periférico (setas). Parênquima rarefeito, com arranjos celulares glandulares, formados predominantemente por células principais escuras, com presença de granulócitos (predominantemente heterófilos) nos seios periféricos. 100x, HE. C) Paratireoide. Granulomas multiloculares no tecido conectivo adjacente (setas). Nódulos granulomatosos, medindo de 30 a 100µm de diâmetro, mostrando cápsula lisa acidofílica, múltiplos vacúolos de conteúdo granular, lamelados, entremeados por macrófagos epitelioides e fibroblastos. 100x, HE. D) Paratireoide. Vacúolos com estruturas esféricas sugestivas de esquizontes de coccídeos (setas). As estruturas medem 13µm de diâmetro médio e parecem não provocar reação inflamatória significativa. 400x, HE. E) Ilhotas de Langerhans. Ilhotas relativamente hiperplásicas. A maior ilhota contém mais de 40 células, com relação núcleo: citoplasma levemente aumentada, em relação a outras amostras. 400x, HE. F) Ilhotas de Langerhans. Degeneração de células endócrinas. Espaço vazio, sem células, com debris celulares na periferia. 400x, HE. G) Interrenais. Degeneração de células adrenocorticais e cromafins. Vacuolização de células adrenocorticais, retração de células cromafins. Microcistos focais (setas). Angiectasia (asteriscos). 100x, HE. H) Interrenais. Necrose de células adrenocorticais. 400x, HE.



Fonte: Braga (2021)

5.1.2. Paratireoides

Apesar das pequenas dimensões, as paratireoides foram prontamente identificadas durante as disseções de *L. macrosternum*, nas faces cranioventrais das curvas ascendentes de cada ramo da veia jugular externa. Mostraram formato ovoide, cor esbranquiçada, consistência elástica e cápsula lisa. As dimensões médias foram de 0,21 x 0,17 x 0,09 cm. Não foram registradas alterações macroscópicas, nem externas nem ao corte. A alteração mais frequente foi o infiltrado granulocítico subcapsular difuso leve. O GLM apontou para influência significativa do status de área (cultivada) e do tamanho/faixa etária sobre este achado (Tabela 4). O infiltrado granulocítico também se mostrou negativamente correlacionado com a densidade do parênquima ($z = -2,085$, $p = 0,037$). Os achados estão representados nas Figuras 6B, 6C e 6D.

Tabela 4. Resultado do GLM mostrando significância menor que 5% na ocorrência de infiltrado granulocítico em paratireoides de *L. macrosternum* adultos em áreas cultivadas de Tabuleiro do Norte (CE).

	Estimação	Erro P.	z-valor	Pr(> z)
(Intercept)	-173,744	57,338	-3,030	0,00244 **
Status de área	21,841	0,9604	2,274	0,02296 *
CRC	19,586	0,7174	2,730	0,00633 **

Null deviance: 53,713 on 69 degrees of freedom / Residual deviance: 39,401 on 67 degrees of freedom / (30 observations deleted due to missingness) / AIC: 45,401 / Códigos de significância: *** $p \leq 0,01$ ** $p \leq 0,05$.

Fonte: Braga (2021), elaborado no software R.

Os granulomas e as congestões no parênquima da paratireoide se mostraram ligeiramente mais frequentes em áreas cultivadas, a maioria em fêmeas, mas sem significância estatística. Os demais achados foram pontuais.

5.1.3. Ilhotas de Langerhans

O pâncreas foi o órgão mais acessível às avaliações macro e microscópicas, sendo examinado em 93,0% (93/100) das lâminas satisfatórias de *L. macrosternum*. As ilhotas de Langerhans foram reconhecidas como agrupamentos de células alongadas e de citoplasma levemente acidofílico, situadas no parênquima acinar da porção exócrina. Também foram reconhecidas células endócrinas isoladas,

alongadas ou poligonais, e distribuídas em múltiplos focos entre os ácinos. A hiperplasia das ilhotas (Figura 6E) foi considerada relativa, pois a quantidade na maioria das amostras não ultrapassou 10 células/ilhota, em 1-2 ilhotas por amostra. Foi detectada em frequência moderada, superior em fêmeas na área cultivada, comparadas ao restante da amostra, mas sem relação significativa nem com o status de área nem com o tamanho dos indivíduos. Também foi observada degeneração das ilhotas (Figura 6F) em frequência baixa. No pâncreas exócrino foram observadas alterações com maior frequência, como degenerações acinares focais e extensivas, eventuais necroses do parênquima e inflamações leves a moderadas do ducto colédoco, que não serão discutidas nesse momento, mas que podem afetar a integridade das ilhotas dependendo dos graus de inflamação que avancem pelo parênquima.

5.1.4. Interrenais

As interrenais foram avaliadas em 79,8% (79/99) das lâminas adequadas de *L. macrosternum*. Apresentaram-se como grupamentos de células adrenocorticais (poliédricas de citoplasma claro), e células cromafins (poliédricas de citoplasma castanho avermelhado), embutidas nas faces ventromediais dos rins. Foi observado que as interrenais normais ocupam 9-10% das áreas de corte transversal dos rins.

Foram observadas alterações diversas, com frequências moderadas. A degeneração de células adrenocorticais foi a mais frequente, seguida por hiperplasia adrenocortical e degeneração vacuolar de células cromafins. No modelo de sítios de coleta + sexo, os resultados do GLM mostraram que a degeneração adrenocortical foi influenciada pelo sexo (prevalência significativamente maior nos machos) diretamente, e inversamente pelos sítios de coleta (significativamente maior em S3, Tabela 5). O modelo sugere que as degenerações de células adrenocorticais e cromafins estiveram associadas principalmente com áreas não cultivadas. O GLM não comprovou influência do status de área, porém, demonstrou influência do tamanho dos animais, direta na degeneração e inversa na hiperplasia (Tabelas 5 e 6). As demais alterações se mostraram equilibradas entre as áreas, sem possíveis influências de cultivo ou tamanho/faixa etária dos indivíduos. Os achados estão representados nas Figuras 6G e 6H.

Tabela 5. Resultado do GLM mostrando significância menor que 5% na ocorrência de degeneração vacuolar de células adrenocorticais de *L. macrosternum* adultos, independente de status de área, de Tabuleiro do Norte (CE).

	Estimação	Erro P.	z-valor	Pr(> z)
(Intercept)	-42,390	18,038	-2,350	0,01877 *
Status de área	-0,6351	0,5155	-1,232	0,21794
CRC	0,6554	0,2479	2,643	0,00821 **

Null deviance: 107,98 on 78 degrees of freedom / Residual deviance: 100,47 on 76 degrees of freedom / (21 observations deleted due to missingness) / AIC: 106,47 / Códigos de significância: *** p ≤ 0,01 ** p ≤ 0,05.

Fonte: Braga (2021), elaborado no software R.

Tabela 6. Resultado do GLM mostrando significância menor que 5% na ocorrência de hiperplasia de células adrenocorticais de *L. macrosternum*, independente de status de área, de Tabuleiro do Norte (CE).

	Estimação	Erro P.	z-valor	Pr(> z)
(Intercept)	299,513	180,078	1,663	0,096
Status de área	0,08591	0,57685	0,149	0,882
CRC	-0,61974	0,25646	-2,417	0,016 *

Null deviance: 91,491 on 78 degrees of freedom / Residual deviance: 83,957 on 76 degrees of freedom / (21 observations deleted due to missingness) / AIC: 89,957 / Códigos de significância: ** p ≤ 0,05.

Fonte: Braga (2021), elaborado no software R.

5.1.5. Tamanho corporal e alterações endócrinas – Discussão dos achados

O tamanho global dos indivíduos adultos nas áreas cultivadas mostrou-se significativamente menor do que nas áreas não cultivadas. Estudos ecológicos já comprovaram que ambientes de agrossistemas deterioram a saúde geral dos anfíbios, afetando as taxas de crescimento tanto de larvas quanto de adultos (HEGDE e KRISHNAMURTHY, 2014; WOOD e WELCH, 2015). Ao longo das últimas décadas, ensaios de laboratório e pesquisas *in situ* conseguiram demonstrar efeito negativo de agrotóxicos no desenvolvimento, metamorfose e crescimento de anfíbios (BOONE *et al.*, 2001; RELYEA, 2004; ROHR *et al.*, 2006; BÓKONY *et al.*, 2018; ADELIZZI *et al.*, 2019). Outro estudo concluiu que indivíduos de uma área cultivada tinham crescimento acelerado, portanto havia jovens maiores, com menor expectativa de vida, por isso aumentavam seu investimento energético nos eventos reprodutivos (ZAMORA-CAMACHO e COMAS, 2017). Sabe-se que os hormônios da tireoide são os principais fatores de regulação da metamorfose dos anfíbios (GALTON, 1992). No presente estudo, foram observadas ocorrências de bócio nodular colóide com frequência moderada em um dos sítios cultivados. Embora necessite-se cautela na extrapolação comparativa, estudos mostram aumento de prevalência de doenças da

tireoide, incluindo bócio nodular, em indivíduos expostos a pesticidas em áreas agrícolas (REQUENA *et al.* 2019). O bócio nodular coloide é a representação morfológica do hipotireoidismo, mostrando múltiplos folículos de tamanho e formato irregulares, distendidos por coloide, cercados por células foliculares em diferentes estágios de atividades, cúbicas, colunares ou achatadas (LA PERLE, 2012). Tal ocorrência poderia explicar atraso no crescimento ou redução de tamanho máximo nos adultos das áreas cultivadas; entretanto, não foi obtida uma amostra de tireoides representativa para testarmos essa hipótese nesse momento.

As paratireoides mostraram diversas alterações, dentre as quais o infiltrado granulocítico periférico, que foi significativamente mais frequente nos maiores indivíduos das áreas cultivadas. Foi notada correlação significativa entre o infiltrado e a rarefação celular do parênquima. Fisiologicamente, as glândulas endócrinas realizam processo de autofagia, para reciclar os hormônios ou componentes celulares especializados após períodos de maior demanda. Os neutrófilos são granulócitos fagocíticos profissionais, que também atuam nas vias de autofagia, podendo ser ativados por fagocitose de patógenos ou ativação de receptores por suas toxinas (WECKMAN *et al.*, 2014). As paratireoides dos anfíbios realizam citólise sazonal do parênquima durante o inverno no hemisfério norte, regenerando o parênquima com a chegada da primavera. Porém, pesquisadores perceberam que essa retroalimentação cíclica não ocorrera em anuros após permanência em cativeiro; portanto, acreditaram que a supressão das influências dos habitats naturais levava a alterações no ciclo das paratireoides (BOSCHWITZ, 1967). No presente trabalho, todos os indivíduos da amostra foram coletados no mesmo período; desta forma, a citólise sazonal não se justifica. A presença de granulócitos margeando paratireoides com rarefação celular pode sinalizar a ocorrência de autofagia para conter processos patogênicos, para suprimir a produção do paratormônio por hipercalcemia ou para economizar componentes celulares devido à inanição. As causas desse achado continuam sob análise.

Outros achados nas paratireoides tiveram menor ocorrência. Congestão leve à moderada dos pequenos espaços vasculares da paratireoide teve maior ocorrência nas áreas cultivadas. Explica-se o aumento do fluxo sanguíneo nas glândulas endócrinas pelo aumento da demanda hormonal, aumentando a oferta energética para a produção e oferecendo maior volume sanguíneo para a distribuição dos hormônios recém-produzidos (SCHAEFFER *et al.*, 2011). Já os granulomas, que

foram observados próximos aos vasos do tecido conectivo periférico, exibiam um envoltório eosinofílico liso e bem delimitado, com estruturas multiloculadas granulares, entremeadas por macrófagos epitelioides e fibroblastos. Não foram detectados bacilos álcool-ácido resistentes na coloração de Ziehl-Neelsen. A descrição é compatível com Polinas *et al.* (2021), que apresentaram estágios de resposta granulomatosa a protozoários e metazoários teciduais em peixes ósseos. Os granulomas podem estar associados aos vacúolos contendo coccídeos também encontrados no parênquima de paratireoides, porém ainda sem reação inflamatória notável. Fibrose intersticial leve do estroma foi observada, com evidenciação de septos conjuntivos discretos e incompletos entre os agregados celulares glandulares, juntamente com presença de vacúolos (lipídios) e eventuais corpos residuais. DeLellis (2011) descreve processos de fibrose em casos de hiperparatireoidismo por formação de adenomas, lipoadenomas e carcinomas. No presente trabalho, observou-se arranjos celulares cordonais, glandulares, irregulares e mistos, que podem representar estágios hiperplásicos de formação de adenomas. Não foi observada associação desses caracteres morfológicos com tamanho/faixa etária nem status de área. Por fim, foram observados microcistos focais, em fêmeas de áreas não cultivadas. Os microcistos na paratireoide parecem estar relacionados com degeneração de áreas adenomatosas centrais (GUILMETTE e SADOW, 2019).

A hiperplasia de ilhotas de Langerhans é observada geralmente em indivíduos obesos (JONES *et al.*, 2010), mas também já foi associada a esteroides androgênicos ou xenoandrogênicos ambientais (EVANS, 2007; WEINAND E KEMP, 2018). Novamente, sem publicações análogas para comparar, apontamos a degeneração seletiva das ilhotas relatada em cães diabéticos, como um processo espontâneo ou secundário à pancreatite (LA PERLE, 2012).

Análises químicas preliminares detectaram pelo menos uma classe de agrotóxico em fígados (45,0%) e corpos de gordura (61,2%) dos anuros amostrados, (GONDIM, 2021). O inseticida organoclorado endosulfan foi o agrotóxico mais frequentemente detectado nas amostras examinadas. Os efeitos tóxicos do endosulfan incluem degeneração em gônadas, tireoide e interrenais (GOULET e HONTELA, 2003; DA CUÑA *et al.*, 2016; LEEMANS *et al.*, 2019). As glândulas adrenais são extremamente sensíveis a lesões tóxicas, e, dentre os agroquímicos, foi relatado que os herbicidas 2-chloro-s-triazínicos e inseticidas organoclorados afetam a esteroidogênese e causam necrose seletiva do córtex da adrenal (HINSON e

HAVEN, 2006; GUPTA, 2007). Neste estudo, degeneração vacuolar multifocal foi principalmente observada em machos de áreas não cultivadas.

Ao início desse estudo, as áreas de coleta foram classificadas como “cultivadas” e “não cultivadas”, e nós assumimos que os efeitos da prática agrícola seriam restritos às áreas cultivadas, o que pode não ser totalmente correto. Agrotóxicos podem se disseminar por longas distâncias, pois, depois de separados em compostos mais simples, eles volatilizam, condensam-se na atmosfera e se precipitam com as chuvas, contaminando potencialmente amplas áreas de terra e corpos d'água (SOUZA *et al.*, 2020). Estudos consideraram o município de Tabuleiro de Norte altamente vulnerável à contaminação por agrotóxicos devido à susceptibilidade a enchentes e consequente dispersão de substâncias químicas por lixiviação e infiltração do solo (SOUZA *et al.*, 2020). Além disso, nossos resultados preliminares indicaram efeito significativo do Cd sobre a atividade testicular de rãs-manteiga no BRJ (BRAGA *et al.*, 2021), o que sugere disfunção endócrina por elementos potencialmente tóxicos nos indivíduos desta amostra. Além do impacto potencial dos agrotóxicos, diversos xenobióticos, hidrocarbonetos aromáticos e metais potencialmente tóxicos podem se depositar em áreas não habitadas através do despejo de esgotos domésticos (HOFFMAN, 2003). Sabe-se que os maiores centros urbanos ao longo do Vale do Rio Jaguaribe podem despejar 1,8 a 4,0 milhões de litros de esgoto por dia no leito do rio (STUDART, 2013). Agrotóxicos, além de uma ampla gama de fatores antrópicos podem induzir alterações nas interrenais, incluindo Cd, glicocorticoides exógenos, solventes organoclorados industriais, cetoconazol, etomidato, mitotano dentre outros (HINSON e HAVEN, 2006). Estudos recentes associaram a circulação moderada de xenoandrogênicos com a proteção da glândula adrenal contra efeitos do envelhecimento em ratos (GANNON *et al.*, 2019). Uma hipótese levantada é que xenoandrogênicos possam afetar os níveis normais de androgênicos naturais nos anuros das áreas amostradas, indiretamente causando lesões de envelhecimento precoce nas interrenais.

Essa seção foi publicada no *Journal of Comparative Pathology* (Anexo 9)

BRAGA, R.; GONDIM, P.M.; MATUSHIMA, E. R. Histopathology of endocrine organs of Miranda's White-Lipped Frogs (*Leptodactylus macrosternum*) from cultivated and non-cultivated regions in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Comparative Pathology**, v. 192, 2022. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0021997521002929>

5.2. Histopatologia linfoide

Os órgãos avaliados foram timo e baço. O tecido linfoide associado ao cólon (*Gastrintestinal associated lymphoid tissue*, GALT) e os sacos endolinfáticos paravertebrais não tiveram concluídas suas análises para serem apresentadas aqui; portanto, serão posteriormente submetidas para publicação separadamente. As lesões proliferativas (31,6%) foram as mais frequentes, seguidas por degenerativas (24,8%). Os achados específicos estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7. Frequência relativa de alterações linfoides observadas em amostras de *L. macrosternum* de áreas cultivadas (A1) e não cultivadas (A0) de Tabuleiro do Norte, BRJ, (CE).

Órgão	Processo	n	f(%)	
			A0	A1
Timo	Normal	19	21,1	78,9
	Hiperplasia epitelial	10	50,0	50,0
	Rarefação medular	8	50,0	50,0
	Pigmentação	8	37,5	62,5
	Cistos	4	100,0	-
	Apoptose de linfócitos corticais	1	-	100,0
	Hiperplasia atípica	1	-	100,0
Baço	Congestão	20	70,0	30,0
	Atrofia PALS	12	75,0	16,7
	HEM	11	72,7	27,3
	Hiperplasia de linfócitos	10	40,0	60,0
	Hiperplasia de células estromais	6	66,7	33,3
	Granulomas	5	20,0	80,0
	Infiltrado granulocítico moderado	5	40,0	60,0
	Angiectasia	4	100,0	-
	Eritrofagocitose	2	50,0	50,0
	Necrose multifocal PALS	1	-	100,0
	Necrose do estroma	1	-	100,0

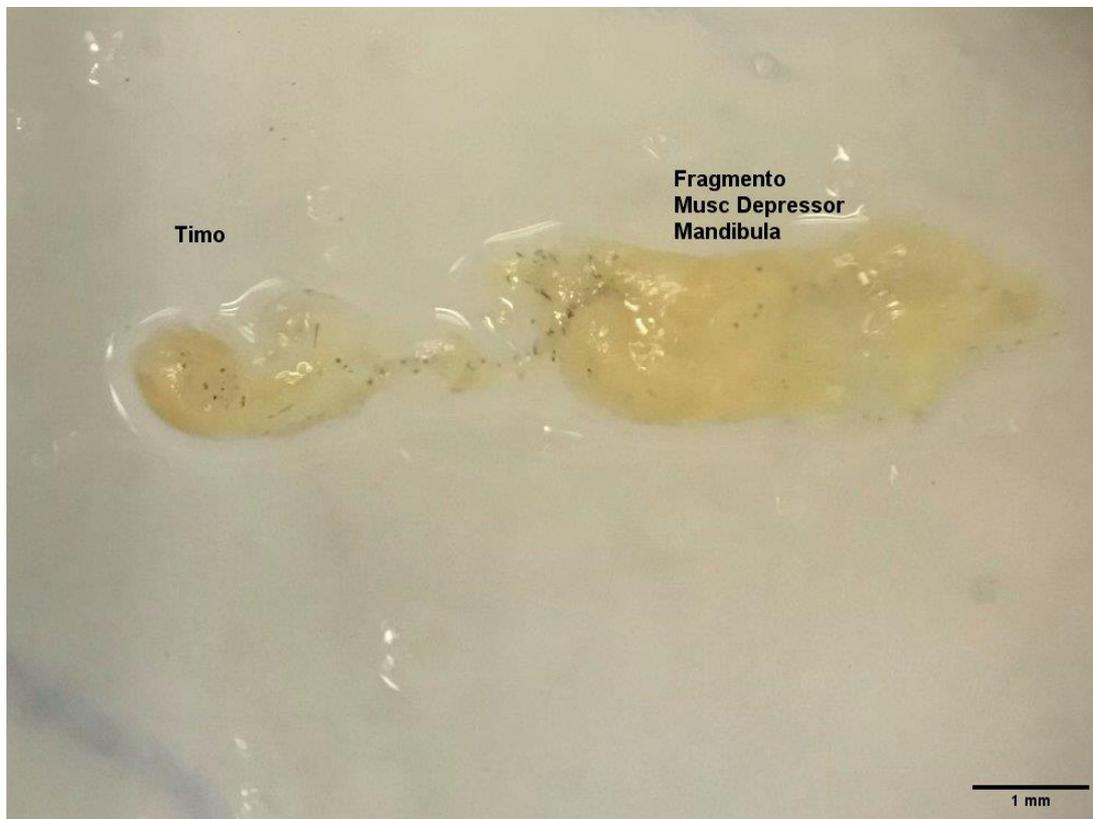
Fonte: Braga (2022).

5.2.1. Timo

Foram recuperadas 38 amostras de timo dos espécimes amostrados. Macroscopicamente, os timos de *L. macrosternum* (Figura 7) apresentaram-se como órgãos piriformes, esbranquiçados, achatados, de superfície irregular, medindo aproximadamente 0,15 x 0,10 x 0,05 cm. São órgãos pareados, localizados

caudalmente às membranas timpânicas, mediais à musculatura depressora da mandíbula, como descrito por Holmes (1924) em *Lithobates* (sin. *Rana*) *pipiens*.

Figura 7. Timo de *L. macrosternum*, visualização macroscópica.

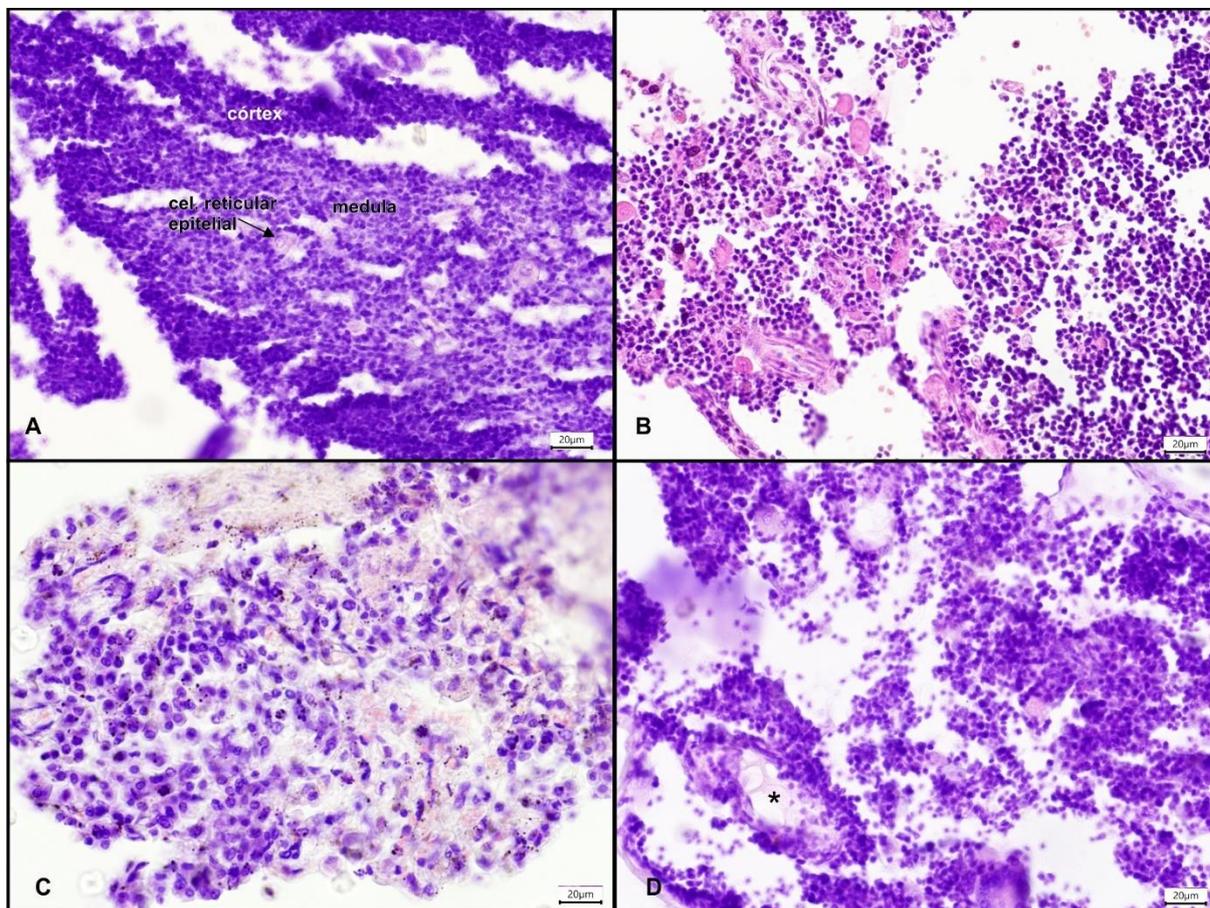


Fonte: Braga (2018).

Microscopicamente, mostraram arquitetura típica, com um córtex de linfócitos pequenos e justapostos, de cromatina nuclear densa; limite córtico-medular mal definido; presença de linfócitos médios, de cromatina nuclear mais delicada, e células epiteliais reticulares nucleadas em números variados na medula tímica. Diferente do timo nos humanos e de outras espécies de mamíferos, suas células epiteliais reticulares não costumaram formar a estrutura concêntrica multicelular anucleada, conhecida como corpúsculo de Hassall ou corpúsculo tímico.

Do total de amostras de timo avaliadas, 15/38 vieram de áreas não cultivadas e 23/38 de áreas cultivadas. As alterações observadas estão dispostas individualmente na Tabela 7 e demonstradas na Figura 8; contudo, na análise estatística, foram consideradas ocorrências combinadas de até três alterações.

Figura 8. Alterações histológicas observadas em timos de *L. macrosternum* de Tabuleiro do Norte, BRJ (CE). A) Arquitetura típica, mostrando córtex de linfócitos pequenos e bem justapostos, medula de linfócitos médios e células reticulares epiteliais; B) Rarefação medular com hiperplasia de células reticulares epiteliais e banda estromais; C) Hiperplasia medular atípica, com pleomorfismo moderado e pigmentos depositados em fagócitos e células reticulares epiteliais; D) Cisto tímico (asterisco) contendo secreção levemente eosinofílica.



Fonte: Braga (2022).

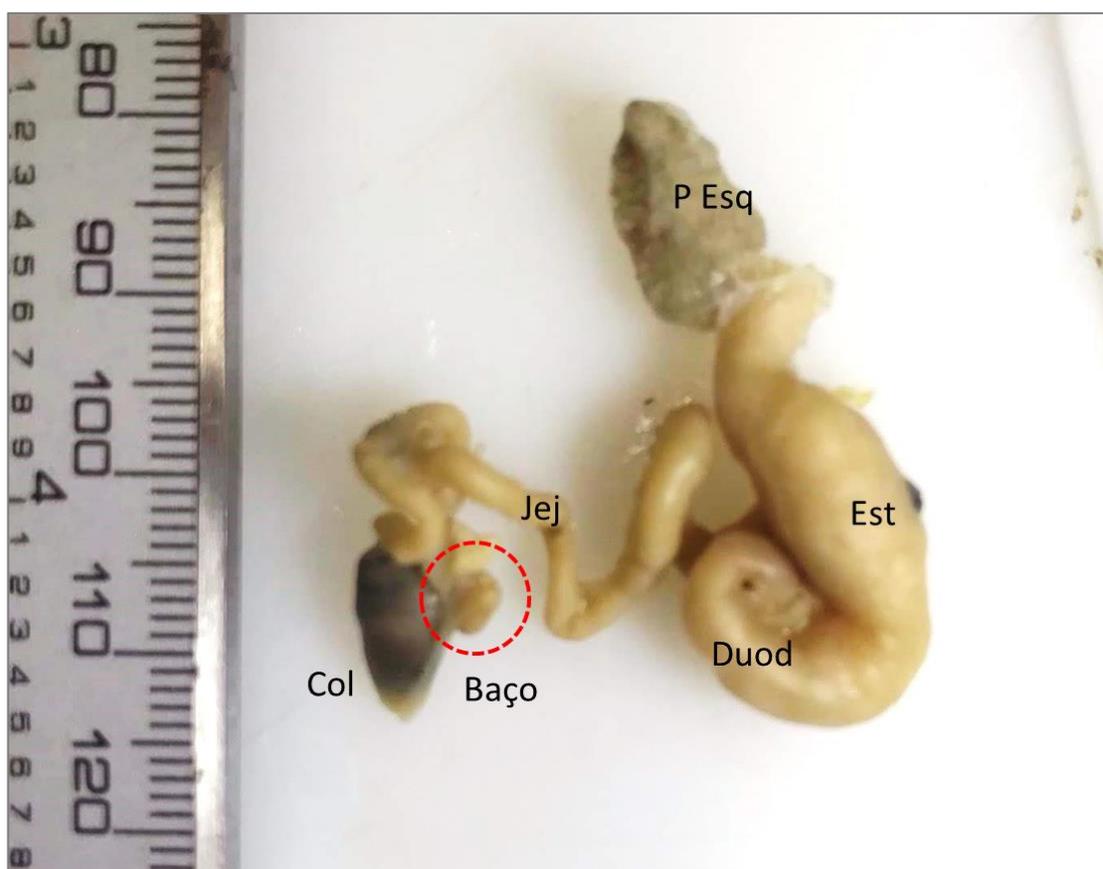
Ao GLM, o modelo de regressão logística multinomial revelou que a maioria das lesões observadas foi significativamente mais frequente em áreas cultivadas, em animais de qualquer tamanho/faixa etária e de ambos os sexos ($p < 0,0001$). Somente a hiperplasia epitelial e a rarefação medular (como alterações isoladas) foram significativamente mais prevalentes em indivíduos com maior CRC, independente de área.

5.2.2. Baço

Foram analisadas 72 amostras de baço dos espécimes amostrados e todas elas apresentaram pelo menos um tipo de alteração (Tabela 7).

O baço dos *L. macrosternum* (Figura 9) é um órgão esférico ou elipsoide, encapsulado e de coloração castanho avermelhada, localizado na região retrocelomática caudal, ligado ao mesentério. Seu diâmetro (ou maior eixo) variou de 3 a 12% do CRC de indivíduos adultos. Ao corte, observou-se parênquima granular e, na maioria das vezes, a distinção macroscópica entre as polpas branca e vermelha.

Figura 9. Trato digestório de *L. macrosternum*, mostrando a morfologia e a posição do baço.



P Esq = pulmão esquerdo; Est = estômago; Duod = duodeno; Jej = jejuno; Col = cólon. Fonte: Braga (2018).

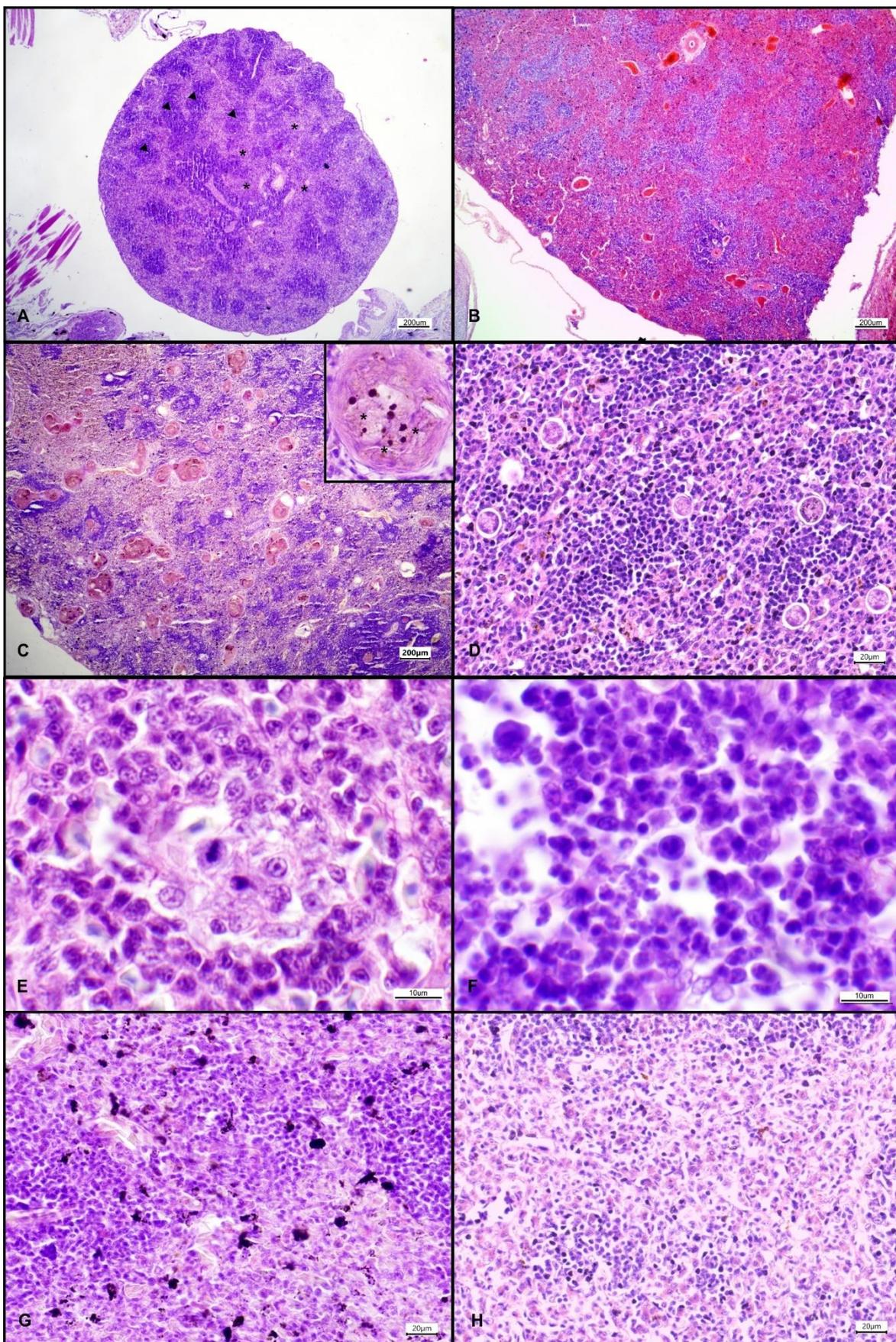
À avaliação histológica, as polpas vermelha e branca foram distinguíveis aos menores aumentos de microscopia; contudo, o estroma não revelou múltiplas trabéculas bem definidas como em vertebrados superiores, havendo menor compartimentalização das populações celulares distintas. Uma larga trabécula única carreava a artéria e a veia principais pela região mediana do órgão. Identificaram-se os agregados de linfócitos de tamanhos variados, com núcleos de cromatina mais ou menos compacta, ao redor das arteríolas; entremeados por eventuais plasmócitos, granulócitos e macrófagos. Os agregados linfoides não formavam centros germinativos; limitavam-se a formar um revestimento celular em torno das arteríolas,

como as bainhas linfocíticas periarteriolas (*Periarteriolar lymphocytic sheaths*, PALS) nos mamíferos. Esse revestimento mostrou capacidade de se expandir e formar estruturas nódulos-símile, bem individualizados ou contíguos com expansões adjacentes. Nos cortes com menor concentração de células, a coloração mostrou-se mais fraca e com menor contraste entre as polpa branca e vermelha. Os agregados observados foram considerados “pequenos”, medindo 2,2 – 4,7 μm^2 de área, com predominância de linfócitos médios (núcleo medindo 2,0 - 2,5x um núcleo de eritrócito), cujos núcleos apresentavam cromatina mais fina e frouxa, nucléolos imperceptíveis a evidentes. De outro modo, nos cortes com maiores celularidades, a coloração mostrava-se mais vívida, com intenso contraste entre a polpa branca e a vermelha. Os agregados foram classificados como “grandes”, com 6,5 – 14,4 μm^2 de área, pois expandiam-se e fundiam-se com os adjacentes.

Os achados histopatológicos estão apresentados na Figura 10. A lesão mais frequente foi a congestão (20/72), seguida pela atrofia linfoide das PALS (12/72).

As lesões foram organizadas em planilha de presença/ausência, incluindo hiperplasia estromal, infiltrado granulocítico moderado, hematopoiese extramedular, congestão, atrofia de PALS, hiperplasia de macrófagos, hiperplasia de linfócitos, angiectasia, degeneração/necrose de PALS, degeneração/necrose de estroma, apoptose de PALS, hiperplasia de melanomacrófagos, hiperplasia de plasmócitos, eritrofagocitose, corpúsculos de Russell e coccídeos.

Figura 10. Alterações histológicas observadas em baços de *L. macrosternum* em áreas cultivadas de Tabuleiro do Norte (CE). A) Arquitetura típica. 40x, HE. Polpa branca (cabeças de seta) e polpa vermelha (asteriscos). B) Congestão difusa com redução de PALS. 40x, HE. C) Desorganização do parênquima por múltiplos granulomas. 40x, HE. Detalhe canto superior direito: granuloma com cristais no centro (asteriscos). 1000x, HE. D) Múltiplos vacúolos contendo estruturas esféricas, compatíveis com esquizontes de coccídeos. 400x, HE. E) Hiperplasia de macrófagos na polpa vermelha, contendo célula hematopoiética em mitose no centro. 1000x, HE. F) Foco de hematopoiese extramedular na polpa branca. 1000x, HE. G) Hiperplasia difusa de melanomacrófagos. 400x, HE. H) Depleção difusa das polpas branca e vermelha. 400x, HE.



Fonte: Braga (2022).

Os resultados da análise de variância multivariada não encontraram diferença entre as áreas, mas revelaram diferença significativa dos achados histopatológicos no baço entre os diferentes sítios de coleta. O teste post-hoc mostrou que a diferença se encontrava entre S3 e S4 ($F= 3,0326$; $p = 0,007^{**}$). Os demais sítios não apresentaram diferenças significativas entre si no conjunto de lesões analisadas. Em análises isoladas no GLM, foram observadas frequências significativamente maiores de infiltrados granulocíticos em A1 ($z=1,975$; $p=0,04832^*$), e de atrofia linfóides em A0 ($z=-2,186$; $p=0,0288^*$).

5.2.3. Alterações linfóides – Discussão dos achados

Mesmo após três décadas de preocupação com o declínio mundial das populações de anfíbios, ainda são raros os estudos ecotoxicológicos usando modelos anfíbios. As evidências mais frequentes de imunotoxicidade em anfíbios são produzidas *in vitro* com linhagens celulares ou espécies experimentais como *X. laevis* (KATAOCA e KISHIWADA, 2021). A escassez de dados específicos dificultou a discussão dos achados do presente trabalho; desta forma, citamos ocorrências em grupos taxonômicos distintos, que podem, eventualmente, ter comprovada sua semelhança futuramente.

Compostos químicos de uso agrícola e industrial podem causar efeitos deletérios em órgãos linfóides. Além dos efeitos anticolinesterásicos amplamente conhecidos, relata-se que inseticidas organofosforados e carbamatos podem ter efeitos imunotóxicos, produzindo atrofia de córtex tímico e reduzindo o tamanho dos centros germinativos no baço de coelhos, além de inibirem a lise de eritrócitos sensibilizados por anticorpos em ovinos, e a dinâmica celular em reações de hipersensibilidade e imunidade inata (GUPTA, 2007).

Os metais potencialmente tóxicos Pb, Cd e Hg afetam o sistema imune em doses de exposição, sem afetar os demais sistemas e assim dificultam o diagnóstico das síndromes decorrentes. Pb, Hg e Ni são relatados como imunossupressores em diversos relatos, enquanto baixas doses de Se, Zn e Mn são imunestimulantes. Os mecanismos de ação imunotóxicas dos metais são variados, formando complexos com macromoléculas, alterando síntese proteica, integridade das membranas e a replicação dos ácidos nucleicos (GUPTA, 2007).

Apesar de ser essencial para a maioria dos organismos, o Mn pode ser tóxico em altas doses ou concentrações de exposição. A imunotoxicidade do Mn em organismos aquáticos invertebrados foi revisada por Hernroth *et al.* (2020), ressaltando efeitos deletérios dose-dependentes, incluindo proliferação de monócitos e neutrófilos, redução de linfócitos, estimulação à apoptose de células hematopoiéticas, dentre outros efeitos (HERNROTH *et al.*, 2020). Ao contrário dos achados em invertebrados aquáticos, o resultado do GLM apontou para tendência à influência positiva do Mn quantificado na contagem de linfócitos nas amostras de timo, o que necessita de mais análises com maiores amostras para conclusões sólidas.

Compostos de latão orgânico, empregados amplamente como estabilizadores de materiais plásticos, conservantes de madeira, antimofos e defensivos agrícolas, são conhecidos como altamente tóxicos. Em interação tanto com o latão orgânico quanto com outros compostos, o Cd pode ter efeitos estimulantes sobre o sistema imune (JOHNSON *et al.*, 2000). Sabe-se que a atividade metal-mecânica em Tabuleiro do Norte é bem desenvolvida, e que seus resíduos podem gerar contaminação ambiental mesmo em áreas afastadas da origem (SOUZA *et al.*, 2020).

À avaliação histopatológica, foram observadas alterações vasculares e inflamatórias. A congestão esplênica é considerada um achado comum em animais experimentais, pois pode estar associada ao método de eutanásia ou à técnica de necrópsia utilizada; mas distúrbios vasculares, septicemia, doenças hemolíticas e neoplasias também podem ser a causa (SUTTIE, 2006; FRY e McGAVIN, 2012). Em alguns animais, foi possível observar a indefinição de áreas da polpa vermelha, que em baço congestos pode decorrer de necrose focal. Já a formação de granulomas deriva muitas vezes da hiperplasia do sistema fagocitário do baço, reagindo especialmente contra hemoparasitas, micobactérias e fungos (FRY e McGAVIN, 2012). As amostras contendo granulomas foram submetidas às colorações de Ziehl-Neelsen e metenamina de prata de Grocott, que se mostraram negativas para bacilos álcool-ácido resistentes e fungos leveduriformes, respectivamente. Foram notados cristais castanho-amarelados aciculares ou prismático nos centros de alguns granulomas, sugestivos de corpúsculos de Gamna-Gandy. Os corpúsculos de Gamna-Gandy são nódulos esplênicos originários de reação inflamatória granulomatosa do tipo corpo estranho, desencadeados por depósitos de sais de Fe ou Ca no parênquima esplênico. Estão associados a vários tipos de carcinomas, e condições vasculares como hipertensão portal, púrpura e anemia hemolítica em

humanos (PIUBELLI *et al.*, 2019). Pela falta de relatos publicados, parece não ser comum em animais, tendo sido encontrado apenas um registro em felino doméstico (RYSEFF *et al.*, 2014). Em animais, há proliferação crônica de macrófagos em condições de anemia hemolítica e de congestão crônica, secundária à hipertensão portal ou da veia esplênica (FRY e McGAVIN, 2012). Causas de hipertensão da veia esplênica podem ser obstrutivas, neoplásicas, autoimunes e tóxicas, como exposição a corticosteroide exógeno (LAURENSEN *et al.*, 2010); ou por aumento de atividade pró-coagulante dos eritrócitos secundária à exposição a elementos químicos como Hg e Cd (LIM *et al.*, 2010; ARBI *et al.*, 2017).

A hematopoiese extramedular em anfíbios tem sido estudada por diversos pesquisadores há décadas. Sabe-se que na fase jovem, a eritropoiese ocorre no fígado e nos rins, enquanto em adultos ocorre na medula óssea, no fígado e no baço. A linfopoiese ocorre no timo, com a maturação ocorrendo no baço, mas possui peculiaridades entre espécies (ARIKAN e ÇIÇEK, 2014). Em uma rápida metanálise, a frequência global de hematopoiese extramedular foi significativamente superior ($X^2 = 5,2864$, $df = 1$, $p\text{-valor} = 0,02149$) à observada por DE PAULA (2011) em anfíbios da Estação da Boraceia (SP). A hiperplasia linfoide esplênica também se mostrou proporcionalmente superior, mas sem significância estatística ($X^2 = 1.068$, $df = 1$, $p\text{-valor} = 0,3014$). Esses são dos poucos dados disponíveis na literatura e que foram utilizados numa tentativa de comparação entre anfíbios de áreas com diferentes graus de antropização.

Não foram observadas diferenças estatísticas entre as áreas de coleta. Este resultado sugere que todos os indivíduos coletados estavam sujeitos às mesmas condições ambientais, independente dos diferentes graus de aplicação de práticas agropecuárias descritas nas diferentes áreas. É possível que a espécie escolhida para o estudo, por ser bem abundante nos municípios da região e, por conseguinte, bem adaptada aos seus habitats, possa ter maior resistência imunológica às pressões tóxicas registradas na região. Embora os sítios escolhidos como controles (S1 e S2) não registrassem cultivo tradicional há mais de 10 anos, não foi realizada nenhuma análise ambiental local de deposição de substâncias químicas no solo e nas águas para confirmá-las como livres de contaminação. Nas áreas cultivadas, havia agricultura comercial em larga escala e potencial uso de inseticidas, como o Dimetoato. Estudos já mostraram que os agrotóxicos empregados na fruticultura da região são potenciais contaminantes de água e solos (MILHOME *et al.*, 2009; GAMA

et al., 2013; PINHEIRO *et al.*, 2016). Análises regionais já detectaram contaminação de águas superficiais e profundas por inseticidas, fungicidas, herbicidas (AVELINO *et al.* 2013, MILHOME *et al.*, 2015, SOUSA *et al.* 2016) e EQPT, como Al e Pb, acima do permitido pelo CONAMA (NOBRE *et al.*, 2018). Sabe-se que o Dimetoato tem imunotoxicidade específica, causando retardo em reações de hipersensibilidade e na dinâmica das células imunes (GUPTA, 2007)

5.3. Química analítica

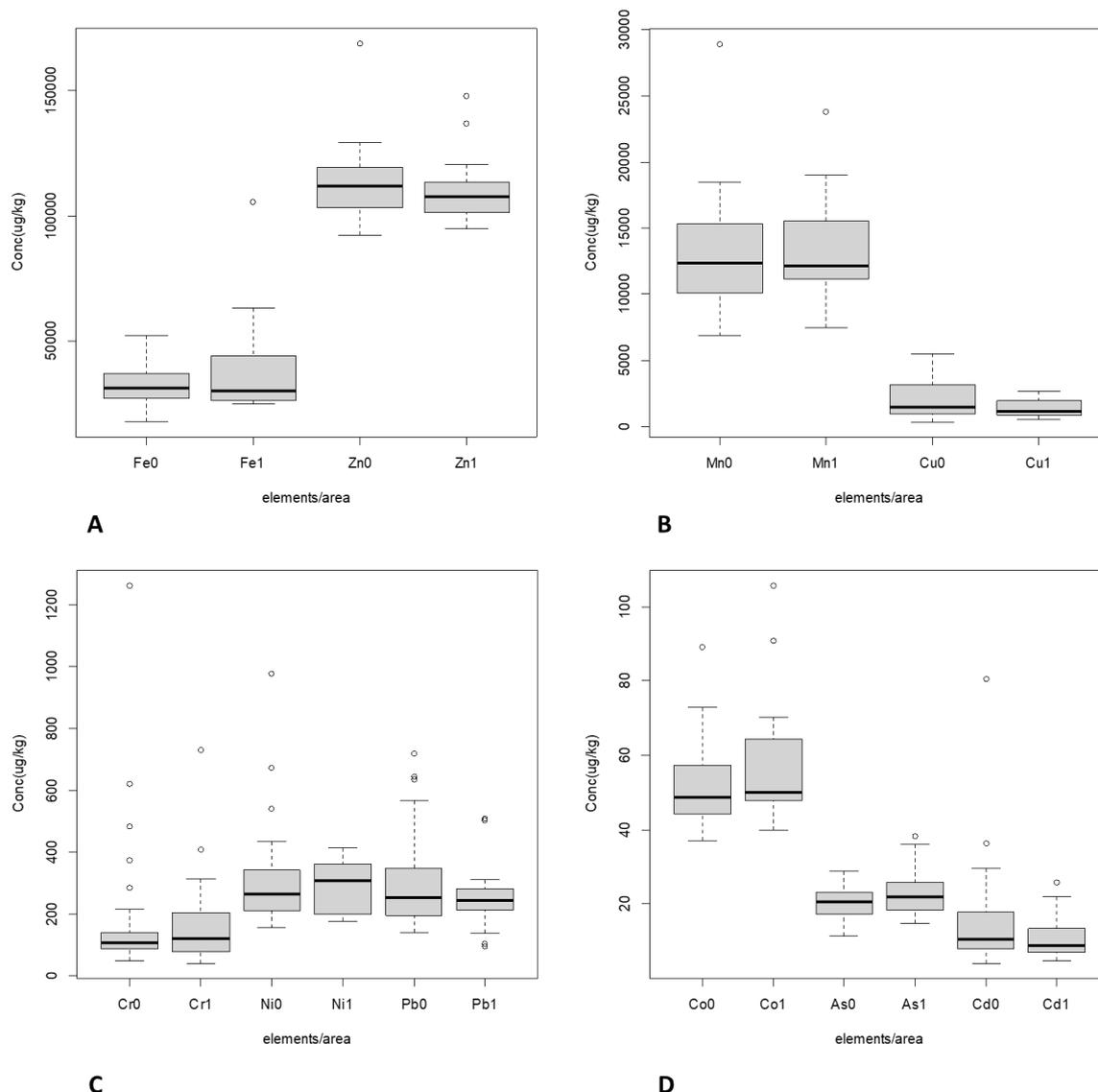
Foram incluídos indivíduos adultos de ambos os sexos, cuja massa corporal variou entre 14 e 65g. Indivíduos menores que 14g foram excluídos, pois após secos e triturados não atingiriam a massa mínima para a preparação das soluções de análise. Do total de indivíduos coletados, 39,8% (41/103) não atingiram a massa mínima final para o ICP-MS, sendo mais da metade deles (27/41) provenientes de A1. A amostra final foi composta por 63 indivíduos, distribuídos como apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Distribuição da amostra de *L. macrosternum* de Tabuleiro do Norte, BRJ (CE), analisada por ICP-MS.

Sexo	Status de área		Total
	A0	A1	
Fêmeas	28	9	37
Machos	12	14	26
Total	40	23	63

Fonte: Braga (2021)

Gráfico 2. Distribuição das concentrações de elementos de importância toxicológica em carcaças de *L. macrosternum*, em diferentes status de áreas de coleta (0/1), do BRJ, Ceará, Brasil. a) Fe e Zn; b) Mn e Cu; c) Cr, Ni e Pb; e d) Co, As e Cd.



Fonte: Braga (2021), elaborado no software R.

Não foi observada diferença significativa nas concentrações dos elementos detectados nas carcaças por status de área, exceto pela significância marginal ($0,05 \leq p \leq 0,1$) do As ($W = 325$, $p\text{-valor} = 0,07291$), apontando maior mediana em A1. Cr, Fe, Cu, Co, Ni, As, Cd e Pb apresentaram variâncias significativamente diferentes por área (Tabela 9). Menores variâncias sugerem amostras com exposição mais homogênea e constante. Maior variância pode estar ligada a indivíduos mais jovens/menor CRC/menor massa e por conseguinte menor exposição até o momento da coleta. Valores de F maiores que 1 mostram variância superior em A0. Fe, Co e As mostraram mais homogeneidade de concentrações (menores variâncias) nas áreas não cultivadas, o que sugere exposição constante e/ou população

homogênea em tamanho e faixa etária. Cu, Ni, Cd e Pb mostraram menores variâncias e medianas ligeiramente superiores em A1.

Tabela 9. Comparação das variâncias de concentração de metais em carcaças de *L. macrosternum* entre A0/A1 no BRJ, Ceará, Brasil.

Analito	F-valor	IC	p-valor
As	2,42	1,09-4,96	0,029 *
Cd	4,86	2,19-9,95	0,000 ***
Co	181,62	82,0-371,34	0,000 ***
Cr	20482,01	9248-41877	0,000 ***
Cu	9,77	4,41-19,97	0,000 ***
Fe	18,97	0,57-38,79	0,000 ***
Mn	1,28	0,57-2,61	0,546
Ni	10353,01	4675-21168	0,000 ***
Pb	2,23	1,00-4,56	0,047 *
Zn	0,96	0,43-1,98	0,900

(Códigos de significância: '***' 0,001 '**' 0,01 '*' 0,05). Fonte: Braga (2021)

Uma amostra (A0, S1) apresentou as mais altas concentrações de Cr (138.152,484 mg/kg), Mn (24.439,499 mg/kg), Fe (558.616,896 mg/kg), Co (1.411,087 mg/kg) e As (80,385 mg/kg). Esses valores discrepantes representaram duas a 60 vezes as médias da concentração de seus respectivos elementos detectados.

As correlações entre os analitos foram classificadas como fortes ($\geq 0,66$), moderadas (0,34-0,65) e fracas ($\leq 0,33$) (Tabela 10). Foram observadas correlações significativas entre Ca, P e Mg, o que era esperado, uma vez se tratando da análise predominante de tecidos ósseo e músculo esquelético. As correlações significativas mais fortes foram do Zn com Mg, Ca e P; correlações significativas de menor força foram observadas entre o Cr, Ni, Cu, As e Pb.

Tabela 10. Matriz de correlação entre os elementos metais e não-metais quantificados pela ICP-MS.

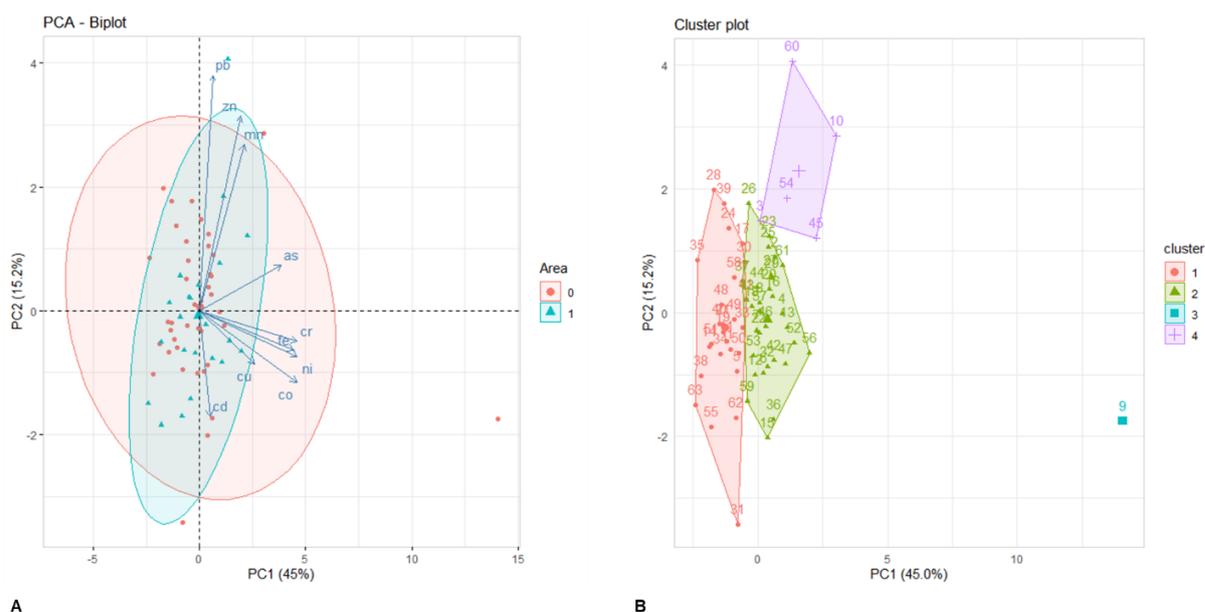
	Mg	P	S	Ca	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	As	Cd	Pb
Mg	1,000													
P	0,609 ***	1,000												
S	-0,062 *	0,312 *	1,000											
Ca	0,604 ***	0,979 ***	0,243	1,000										
Cr	0,127 *	0,345 **	0,301	0,320 **	1,000									
Mn	0,240 ***	0,181 *	-0,062	0,151	0,050	1,000								
Fe	0,016	0,039	0,211	-0,002 **	0,565 **	0,267	1,000							
Co	-0,024	-0,046	0,008	-0,075 ***	0,480 ***	0,242	0,696 ***	1,000						
Ni	0,119 *	0,139 *	0,193	0,125 ***	0,559 ***	-0,058	0,290	0,370 *	1,000					
Cu	0,367 *	0,146	0,263	0,146	0,307 ***	-0,067	0,028	0,077	0,457 *	1,000				
Zn	0,691 ***	0,380 ***	-0,106 *	0,410 ***	0,289	0,330 **	0,092	0,166	0,282 ***	0,452 *	1,000			
As	0,287 **	0,300 *	0,052	0,297	0,257	0,102	0,349 ***	0,283 *	0,364 **	0,027	0,271 **	1,000		
Cd	0,053	0,059	-0,018	0,090	0,243	-0,145	0,206	0,229 **	0,192	0,042	0,113	0,133	1,000	
Pb	0,159 *	0,259 *	-0,153	0,291 *	0,166 *	0,253	0,052	-0,104	0,012	-0,128	0,257 **	0,298	-0,149	1,000

(Códigos de significância: '***' 0,001 '**' 0,01 '*' 0,05). Fonte: Braga (2021), elaborado no software R.

O PCA (Gráfico 3A) revelou que os componentes principais PC1 e PC2 responderam por 60,2% da variabilidade do conjunto dos dados. Dentre os metais dos eixos principais: Cr e Ni tiveram as maiores correlações com o PC1 (43,0%), seguidos por Co, Fe e As (42,9 a 36,1%); Pb teve a maior correlação com o PC2 (61,5%), seguido por Zn e Mn (50,7 a 43,3%). As elipses representam os intervalos de confiança da variância nos status de área, confirmando a maior dispersão de dados em A0.

A análise de grupamento de indivíduos (Gráfico 3B) indicou um número ótimo de grupamentos igual a 4, o qual causaria o melhor distanciamento entre os grupos de indivíduos afetados, com a menor variância intra-grupo (Average Silhouette Width = 0,13). A grande maioria dos indivíduos (n=31) se acumulou no grupamento 1, seguida pelo grupamento 2 (n=26); enquanto uma parcela menor (n=5) se acumulou no grupamento 4, e um indivíduo discrepante foi considerado como grupamento 3. Os resultados mostraram que não houve coincidência perfeita de indivíduos afetados com os status de área; contudo, os grupamentos 2, 3 e 4 mostraram uma maior influência de PC1 (Cr, Ni, Co, Fe e As), ao mesmo tempo que o grupamento 1 foi principalmente influenciado por PC2 (Pb, Zn e Mn).

Gráfico 3. Análises multivariadas das amostras de *L. macrosternum* coletadas no BRJ. a) PCA com vetores de correlação das variáveis aos eixos principais. b) Análise de grupamento (*cluster*) dos indivíduos quanto às concentrações dos elementos quantificados.

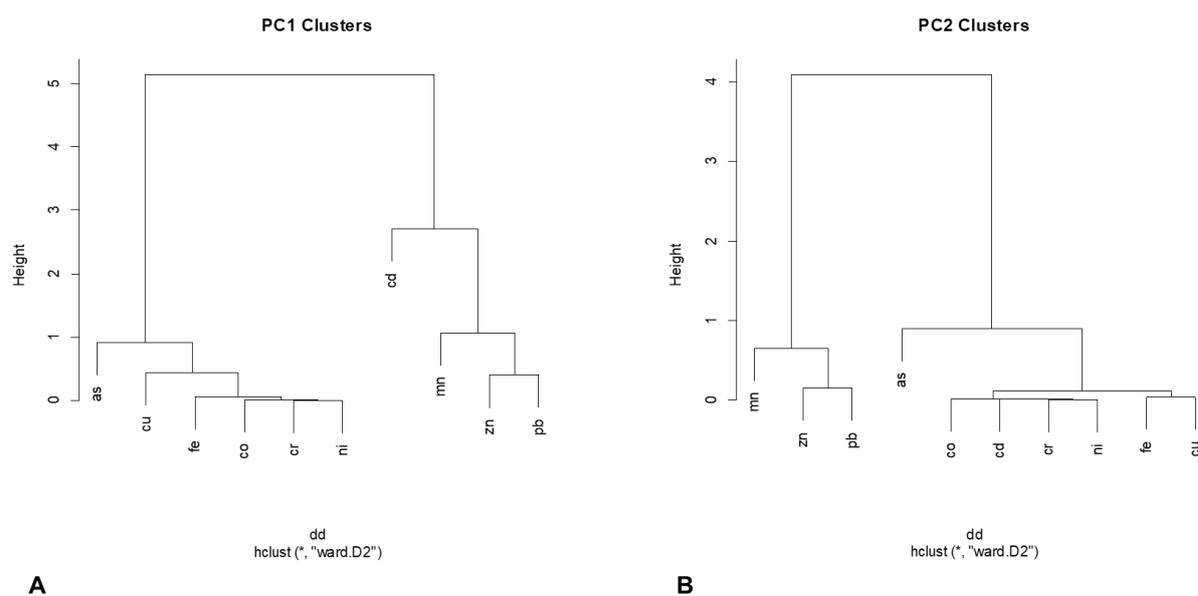


Fonte: Braga (2022), elaborado no software R, pacote GGPlot2.

A análise de agrupamento dos eixos principais PC1 e PC2 está representada no Gráfico 4. O dendrograma revelou as correlações entre os metais mais influentes em cada eixo principal, agrupando-os em suas prováveis origens.

Sobre as influências das variáveis categóricas, o GLM (Tabela 11) revelou que as concentrações de Mn e Pb foram influenciadas inversamente pelo índice corporal dos indivíduos; Fe foi influenciado inversamente pelo sexo (maiores concentrações em fêmeas), e As foi influenciado diretamente pelo status de área (maiores concentrações em A0). Além disso, Pb também se mostrou negativamente influenciado pela concentração corporal de Ca.

Gráfico 4. Análises multivariadas das amostras de *L. macrosternum* coletadas no BRJ. Análise de agrupamento dos elementos correlacionados aos eixos principais a) PC1 e b) PC2.



Fonte: Braga (2021), elaborado no software R.

Tabela 11. Resultado do GLM mostrando alfa menor que 5% nas relações entre Mn, Pb, Fe e As e fatores de influência em carcaças de *L. macrosternum* adultos, de Tabuleiro do Norte (CE).

	Estimação	Erro P.	t-valor	Pr(> t)
Mn				
(Intercept)	9,98E-02	9,70E-03	10,291	1,30E-14 ***
Índice Corp	-1,03E-01	3,99E-02	-2,582	0,0124 *
Sexo-m	-1,40E-03	6,11E-03	-0,229	0,8198
Status de Área	4,81E-04	6,19E-03	0,078	0,9383
Pb				
(Intercept)	8,00E+00	1,25E+00	6,422	2,90E-08 ***
Índice Corp	-5,11E+00	2,52E+00	-2,030	0,047 *
Sexo-m	1,01E+00	4,35E-01	2,322	0,02384 *
Ca	-7,02E-08	2,11E-08	-3,334	0,00151 **
Fe				
(Intercept)	3,69E-02	4,32E-03	8,549	7,42E-12 ***
Índice Corp	-2,53E-02	1,78E-02	-1,422	0,161
Sexo-m	-5,71E-03	2,54E-03	-2,254	0,028 *
As				
(Intercept)	0,049901	0,001982	25,172	<2e-16 ***
Status de Área	-0,007573	0,002933	-2,582	0,0123 *

(Códigos de significância: 0 '***' 0,001 '**' 0,01 '*' 0,05). Fonte: Braga (2021), elaborado no software R.

5.3.1. Química analítica – Discussão dos achados

De acordo com o volume de publicações disponíveis em periódicos indexados, o uso de anfíbios como biomarcadores de elementos potencialmente tóxicos vem se popularizando nos últimos dez anos. Comparando os resultados (Tabela 12), percebeu-se que as concentrações aqui obtidas são equivalentes à maioria dos valores disponíveis para diferentes espécies de anuros na literatura.

Tabela 12. Comparação entre concentrações de elementos potencialmente tóxicos em tecidos de anfíbios (amostras secas), publicadas entre 1998 e 2020.

mg/kg	Este trabalho	Lombourdis E Wray, 1998	Marques <i>et al.</i> , 2011	Marques <i>et al.</i> , 2011	Correia <i>et al.</i> , 2014	Qureshi <i>et al.</i> , 2015	Prokić <i>et al.</i> , 2016	Thanomsangad <i>et al.</i> , 2020
Tecido	carcaça	carcaça	ossos	músculo	músculo	músculo	músculo	músculo
Cr	0,17 ± 0,19	21 ± 5	1,41 ± 0,30	1,20 ± 0,10	14,9 ± 4,62	0,89 ± 0,41	0,41 ± 0,06	2,28 ± 0,07
Mn	13,07 ± 4,01	160 ± 38	248,09 ± 46,57	1,81 ± 0,20	2,67 ± 3,56	1,64 ± 0,46	NA	NA
Fe	34,88 ± 13,67	NA	45,88 ± 3,48	26,77 ± 5,85	78,5 ± 11,4	58,76 ± 28,33	22,17 ± 1,38	NA
Co	0,05 ± 0,01	3 ± 0	0,92 ± 0,07	0,08 ± 0,02	NA	1,11 ± 0,19	0,02 ± 0,00	NA
Ni	0,30 ± 0,13	27 ± 3	3,63 ± 0,19	0,41 ± 0,10	17,2 ± 4,35	7,76 ± 0,95	0,25 ± 0,03	NA
Cu	1,74 ± 1,14	27 ± 15	2,37 ± 0,14	3,14 ± 0,39	0,550 ± 0,540	2,84 ± 1,24	1,12 ± 0,07	NA
Zn	111,84 ± 12,69	840 ± 136	170,95 ± 6,98	21,91 ± 1,63	39,1 ± 22,58	13,94 ± 6,77	23,81 ± 1,75	NA
As	0,21 ± 0,05	NA	0,10 ± 0,02	0,18 ± 0,02	NA	NA	NA	0,27 ± 0,05
Cd	0,01 ± 0,01	0,7 ± 0,1	<LD	<LD	NA	7,69 ± 0,82	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
Pb	0,28 ± 0,13	5 ± 1	1,59 ± 0,41	<LD	NA	11,44 ± 4,0	0,05 ± 0,02	0,40 ± 0,12

* NA = não se aplica. LD = limite de detecção. Fonte: Braga (2021).

Lombourdis e Wray (1998) compararam concentrações de Al, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Rb (Rubídio), Sr (Estrôncio), Mo, Cd, Cs (Césio), Ba (Bário) e Pb em fígados e carcaças de *Rana ridibunda* de um rio em área urbana na Macedônia. Encontraram valores significativamente superiores de Al, Mn, Sr e Ba em carcaças, e de Cr, Co, Ni, Cu, Mo e Cd em fígados. Zn, Rb, Cs e Pb não mostraram diferença significativa entre os dois tecidos. Esse foi o único trabalho realizado com carcaças inteiras e as concentrações superaram os demais achados citados, incluindo os deste trabalho.

Sobre as concentrações dos elementos detectados em carcaças de *L. macrosternum* no presente trabalho, comparadas a referências na última década:

- Concentrações de Mn, Fe e Zn superaram as concentrações em músculo, mas foram inferiores às concentrações em ossos detectados por Marques *et al.* (2011) em espécimes de *Pelophylax perezi*, em uma mina de Urânio desativada em Portugal;
- Concentrações de Cr foram inferiores às das demais referências citadas;
- Concentrações de Co e Ni superaram levemente somente às de Prokić *et al.* (2016) em *P.perezi* de um rio antropizado na Sérvia;
- Concentrações de Cu foram inferiores às demais, exceto às de Correia *et al.* (2014) em *L. ocelatus* no Rio Contas, também no nordeste do Brasil;
- Concentrações de Zn foram superiores às de Correia *et al.* (2014), Zocche *et al.* (2014), Qureshi *et al.* (2015) e Prokić *et al.* (2016), e equivalentes às de Marques *et al.* (2011) e Idowu *et al.* (2014);
- Concentrações de As foram equivalentes às de Marques *et al.* (2011) e Thanomsangad *et al.* (2020);

- Concentrações de Cd foram inferiores às de Idowu *et al.* (2014) e Qureshi *et al.* (2015), e equivalentes às de Prokić *et al.* (2016) e Thanomsangad *et al.* (2020);
- Concentrações de Pb foram inferiores às demais, exceto às de Prokić *et al.* (2016).

Cr, Mn, Cu, Fe, Co, Ni, Zn, Cd e Pb já foram detectados e quantificados em solos do BRJ (TEIXEIRA FILHO, 2016). Uma tentativa de metanálise sobre esses dados foi realizada; contudo, correlações entre contaminantes em solos e tecidos de animais terrestres são bastante complexas, pois dependem da afinidade do elemento pelo tecido testado. Miranda *et al.* (2009) observaram correlações significativas apenas entre Ni acumulado nos rins, Cu acumulado em fígado e músculo de bovinos, e os mesmos metais acumulados em solos e plantas forrageiras na região da Galícia, Espanha.

Mn, Fe e Zn são microminerais essenciais ao metabolismo animal. Mn é um metal de transição que atua como cofator bioquímico e enzimático, além de participar do desenvolvimento e da regulação de neurônios e células imunes. Contudo, superexposição ao Mn causa toxicose sistêmica em diferentes estágios de desenvolvimento. Seus principais sítios de acúmulo são ossos, fígado, rins, pâncreas, adrenais e pituitária. O cérebro é o principal alvo de toxicidade do Mn, seguido por coração e fígado (O'NEAL e ZHENG, 2015). As concentrações quantificadas neste trabalho podem envolver acúmulo no tecido nervoso, uma vez que carcaças inteiras, incluindo cérebro e medula espinhal, foram utilizadas na análise.

Puro, reativo e corrosível, o Fe é o metal mais abundante da crosta terrestre (NCBI,2021). Do total de Fe presente no organismo, mais de 30% encontram-se ligados à hemoglobina, cerca de 10% à mioglobina e enzimas, e o restante ligado a proteínas de reserva Ferritina e Hemossiderina. A excreção do Fe é limitada; portanto, sua homeostase é regulada pela distribuição do mesmo entre necessidades orgânicas. Fatores que influenciam a absorção do Fe incluem a idade e o status de saúde do indivíduo, condições do trato digestório, quantidade e forma química do Fe e outros componentes da dieta. As maiores concentrações de Fe são encontradas em fígado, baço e medula óssea; a toxicidade se manifesta em trato digestório, fígado e miocárdio, quando a capacidade de ligação iônica dos órgãos-alvo é ultrapassada. Íons de Fe livres causam danos oxidativos, incluindo desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (GUPTA, 2007).

O Zn é um dos metais mais comuns na crosta terrestre, presente na água, nos solos e no ar. Os usos comerciais do Zn incluem anticorrosivos, baterias secas, produção de latão e bronze, tintas, borracha, corantes, conservantes de madeira e unguentos (NCBI,2021). Segundo Gupta (2007), como microelemento essencial do metabolismo dos vertebrados, participa da composição de mais de 200 enzimas. Distribui-se pela corrente sanguínea para fígado, pâncreas, rins, baço, próstata e músculos. Sinais clínicos de toxicose por Zn incluem hipercreatinemia, azotemia, hiperfosfatemia e cilindrúria granular. Pancreatite, artrite e insuficiência renal agudas são também relatadas (GUPTA, 2007). Os achados patológicos incluem necrose hepática, nefrite intersticial, necrose tubular aguda, coagulopatias, e, em casos de ingestão crônica, anemia sideroblástica e síndrome mielodisplásica (AGNEW e SLESINGER, 2021). Concentrações médias de Zn de $22,20 \pm 1,51$ mg/kg, em fígados, e $7,02 \pm 0,24$ mg/kg, em músculo (significativamente maiores que as amostras da área controle), foram detectadas em *P. ridibundus* adultos de rios poluídos na Bulgária, diante de uma concentração de $58\mu\text{g/L}$ de Zn em amostras de água *in situ* (ZHELEV *et al.*, 2020). As concentrações em carcaças de *L. macrosternum* deste trabalho representam cerca de cinco vezes a acumulação hepática e quinze vezes a acumulação muscular observada nos anuros da Bulgária, sugerindo maior concentração ambiental do Zn ou mais tempo de exposição dos indivíduos.

As é um metaloide ubíquo, disponível em formas orgânica e inorgânica. É utilizado na produção de inseticidas, herbicidas e fertilizantes, e está envolvido na intoxicação de humanos e animais. Acumula-se lentamente no fígado, sendo então distribuído para baço, rins e pulmões. Em exposição crônica, pode ser armazenado em ossos, pele e tecidos queratinizados (GUPTA, 2007). Essa informação revela que o As detectado e quantificado em *L. macrosternum* do BRJ é um contaminante crônico da região, uma vez que foi detectado nas carcaças, em ossos, músculo, conjuntivo e pele.

Concentrações de Cr, Co, Ni, Cu, Cd e Pb acumulados nas carcaças de *L. macrosternum* do BRJ se apresentaram inferiores a todas (ou quase todas) as referências em anfíbios na última década. É possível que realmente as concentrações ambientais fossem mais baixas que nos demais locais citados na literatura; no entanto, note-se que os presentes resultados decorreram da análise de tecidos mistos (ossos, músculos e pele) e foram comparados com concentrações apenas em músculo. Outra questão importante é a do acúmulo diferencial dos metais em tecidos

e órgãos por afinidade bioquímica. A matriz de correlação apontou que Zn, Cr, Ni, Cu, As e Pb mostraram forte a moderada afinidades por Mg, P e Ca da carcaça. Conforme Swaminathan (2003), 60% do Mg orgânico encontram-se nos ossos e 20% na musculatura esquelética. Desta forma, a carcaça seria adequada para o estudo de metais com ampla afinidade orgânica, como o Pb, ou com afinidade seletiva pelos tecidos das carcaças, como Cr, Mn, Zn e As (GUPTA, 2007; BENCKO *et al.*, 2017). Ossos e músculos não acumulam altas concentrações de Cd (GUPTA, 2007). Ni tem rápido *clearance* metabólico, portanto, baixo acúmulo tecidual, exceto nos pulmões (EISLER, 1998).

As fontes de contaminação por elementos potencialmente tóxicos no perímetro irrigado do BRJ podem ter origem em formulações de fertilizantes e agrotóxicos. Apesar de não terem sido investigados possíveis contaminações em água e solos dos sítios de coleta, embalagens (tanto lacradas quanto vazias para descarte) dos produtos Dimetoato (Agritoato 400®, inseticida organofosforado), haloxifope-metilico (Verdict R®, herbicida seletivo derivado do ácido alioxifenoxipropiônico), metomil (Brazuka®, inseticida carbamato), além de hidrocarbonetos aromáticos (Dash HC®, adjuvante emulsionável para diluição de agrotóxicos concentrados) foram observadas em uma área de armazenamento num dos sítios de cultivo comercial. Segundo Gimeno-Garcia *et al.* (1996), Cd, Co, Cu e Zn foram observados como impurezas de fertilizantes fosfatados; Pb e Ni como impurezas dos sais de Fe e Cu. Já nos agrotóxicos, Fe, Mn, Zn, Pb, Ni, Cd e Co foram detectados no benticarb (Saturn G®) e molinato (Ordram®), herbicidas para rizicultura, e no propinebe (Antracol®), fungicida orgânico de amplo espectro. Entretanto, o Vale do Jaguaribe tem amplas potencialidades econômicas também no ramo industrial. Os processos de desenvolvimento levaram ao inchamento dos centros urbanos, à ocupação desordenada dos solos urbanos, e à produção excessiva de resíduos sólidos, com consequente poluição dos recursos hídricos por efluentes domésticos, hospitalares e industriais sem tratamento adequado (CEARÁ, 2016; ANDRADE e ALVES, 2019).

Sobre a PCA, como PC1 e PC2 responderam juntos por 60,2% da variância das concentrações de metais quantificadas. Os demais componentes principais não foram considerados nessa análise, pois responderam por parcelas menores da variância.

O dendrograma do eixo PC1 revelou grupamentos de metais provavelmente de mesma origem. O grupamento Fe-Co-Cr-Ni contém metais que são empregados em metalurgia (EL-SAYED *et al.*, 2012; REZAZADEH *et al.*, 2020). Mais distante dos

terminais já citados, o grupamento Zn-Pb-Mn-Cd compreende fontes de origem comuns, como metalurgia, produção de ligas metálicas, baterias, selantes e pigmentos (TCHOUNWOU *et al.*, 2012). O uso de metalurgia e pigmentos é justificado pela existência de várias empresas metalúrgicas e têxteis de pequeno e médio porte na região do Vale do Jaguaribe, incluindo nos entornos dos sítios de coleta. A recente implementação do pólo metalmeccânico industrial do Vale do Jaguaribe irá formalizar e impulsionar esse setor (LIMA, 2013; FALCÃO, 2021), gerando um incremento no potencial contaminador ambiental. A mineração clandestina e a produção de cerâmica existentes na região, notadamente no município de Tabuleiro do Norte, utilizam técnicas de baixa tecnologia e contribuem para a erosão e poluição dos solos e do lençol freático (PANTALENA *et al.*, 2014). Devido à alta capacidade adsorptiva, rochas calcárias contêm teores variados de elementos potencialmente tóxicos, de acordo com a formação geológica adjacente, o que pode gerar contaminação ambiental através da distribuição de produtos extraídos, como por meio da calagem para correção de solos (SOARES *et al.*, 2015). Segundo o Governo do Estado do Ceará, a mineração clandestina e predatória no Vale do Jaguaribe consiste em uma preocupante questão ambiental (CEARÁ, 2016).

Segundo os resultados do GLM, o índice corporal foi influenciado por acúmulo de Mn e Pb, no qual carcaças com maiores massas tiveram maiores acúmulos. O achado foi compatível com o de Lombourdis e Wray (1998). Deficiência mineral e dieta rica em gordura pode aumentar a absorção do Pb de 7 a 20 vezes. Indivíduos jovens absorvem maiores quantidades de Mn e Pb pela via digestiva. Deficiência de Ca permite o aumento da absorção de Pb (GUPTA, 2007; O'NEAL e ZHENG, 2015). Mn e Pb tiveram correlações positivas de menor força com o Mg da carcaça, o que justifica a influência apontada pelo GLM. Possivelmente isto pode ser justificado pela exposição crônica precoce de indivíduos jovens. Os anuros absorvem a maior parte do Ca através da pele; portanto, dermatopatias podem alterar esse processo (FERRIE *et al.*, 2014). O Mn pode se originar de fontes naturais, como erosão de solos, ou de fontes antropogênicas, como atividades metalúrgicas e fabricação de baterias secas, vidro, couro, artigos têxteis, e fertilizantes. Outras fontes antropogênicas são a queima de combustíveis com aditivos de Mn, suspensão de poeira de estradas, atividades em pedreiras, construção civil e agricultura. Metalurgia e siderurgia são as principais fontes de poluição atmosférica por Mn (WHO, 2000). Em solos superficiais do BRJ, a concentração de Mn variou de 124,6 – 349,9 mg/kg (TEIXEIRA FILHO, 2016). Solos,

rochas e plantas em decomposição são fontes naturais de depósito de Mn no meio ambiente; entretanto, as potenciais fontes de contaminação antrópica incluem mineração (MnO_2), fabricação de baterias secas, fundições, siderurgia, produção de soluções de contraste para diagnóstico médico, purificadores de água e produção de agrotóxicos (O'NEAL e ZHENG, 2015). Concentrações de Fe foram superiores nas carcaças de machos, uma vez que possuem maior carga muscular (YEKTA e BLACKBURN, 1992). As concentrações do Fe em solos subsuperficiais no BRJ chegaram a 25.000mg/kg. Neste trabalho, as concentrações de Fe em carcaças de *L. macrosternum* chegaram ao máximo de 48mg/kg; porém, certamente as análises em fígado, baço e medula óssea poderiam chegar a valores até 200 vezes superiores a este (MARQUES *et al.*, 2011). Concentrações de As foram superiores em áreas não cultivadas, e podem estar relacionadas à própria distribuição geoquímica natural do elemento na região (CALADO, 2016). Em ampla revisão de literatura, Shaji *et al.* (2021) mostraram a importância do As como contaminante de águas profundas, com relatos em todos os continentes. Fontes naturais de contaminação incluem rochas vulcânicas e sedimentares, porém as ações antropogênicas de mineração e exploração de petróleo e carvão têm contribuído progressivamente mais. A disseminação do As nas águas subterrâneas se dá através de processos biogeoquímicos. Frizzo (2006) coordenou um levantamento de contaminação por metais nas águas de abastecimento público do estado do Ceará, encontrando um valor de 0,01mg/L de As em 44 amostras de água subterrânea no estado. Já Teixeira Filho (2016) não encontrou valores detectáveis de As em solos do BRJ, o que remete a uma possível contaminação antropogênica focal nos sítios de coleta.

Essa seção foi publicada no *Environmental Chemistry and Ecotoxicology* (Anexo 10):

BRAGA, R.R. et al. *Leptodactylus macrosternum* (Anura: Leptodactylidae) as a bioindicator of potentially toxic chemical elements in irrigated perimeters in northeastern Brazil. **Environmental Chemistry and Ecotoxicology**, v. 4, p. 124–131, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.enceco.2022.02.003>.

5.4. Influência dos contaminantes químicos sobre as lesões avaliadas

Escassas publicações sobre a influência de elementos químicos potencialmente tóxicos na função de órgãos endócrinos e linfóides de anuros, dentre outros animais ectotérmicos, estão disponíveis na literatura; por conseguinte serão citadas as correlações já comprovadas, mesmo que contemplem alvos de outros grupos taxonômicos, mesmo endotérmicos.

5.4.1. Órgãos endócrinos: paratireoides, ilhotas pancreáticas e interrenais

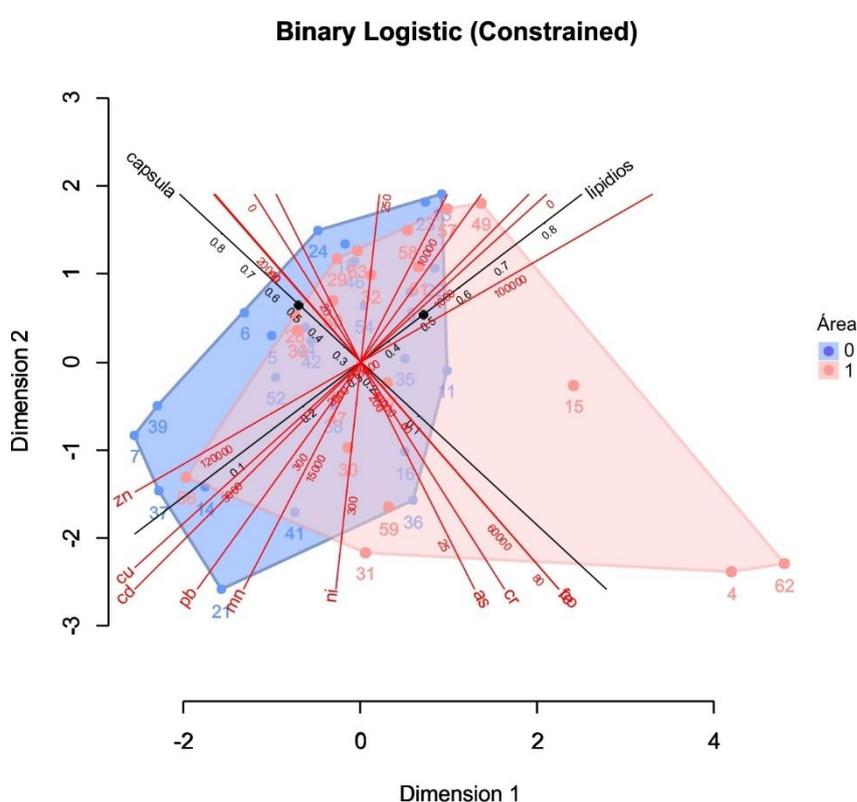
A RDA para dados binários consiste em um tipo de regressão logística múltipla multivariada, realizada a partir da redução das variáveis preditoras a seus componentes principais.

Sobre o estudo de causalidade, a RDA para dados binários revelou que:

- Nas paratireoides, o eixo PC1 dos elementos potencialmente tóxicos detectados mostrou influência significativa predominante em espessamento de cápsula, acúmulo periférico de melanomacrófagos, infiltrado granulocítico e acúmulo de lipídios no parênquima, os quais contaram com 58 a 39% da variância dos dados analisados. Dentre as variáveis resposta inseridas no modelo, o espessamento de cápsula e o acúmulo de lipídios mostraram Pseudo-R² relativamente superior (apesar de considerados absolutamente baixos) e significâncias estatísticas (Tabela 13). Novamente, de acordo com o Gráfico 5, vários elementos potencialmente tóxicos se mostraram correlacionados entre si, confirmando os resultados da PCA e da análise de agrupamento, que os aponta como provenientes de uma mesma origem comum. Ainda referente ao gráfico, é possível observar que Zn, Cu, Cd, Pb, Mn e Ni influenciaram maior frequência de acúmulo de lipídios, enquanto Fe, Cr e As influenciaram maior frequência de espessamento da cápsula.

Poucos dados científicos sobre a influência de elementos químicos potencialmente tóxicos na função das paratireoides estão disponíveis na literatura. Sabe-se que exposição ocupacional ao Cd pode afetar a produção e liberação de hormônios da paratireoide em humanos e, experimentalmente, em ratos machos, causando hipercalcúria, disfunção renal e osteoporose (IBRAHIM *et al.*, 2016).

Gráfico 5. Resultados da RDA para dados binários com respostas logísticas para alterações de glândulas paratireoides. Disposição das variáveis predictoras (retas vermelhar), resposta (retas pretas) e grupos de indivíduos por área.



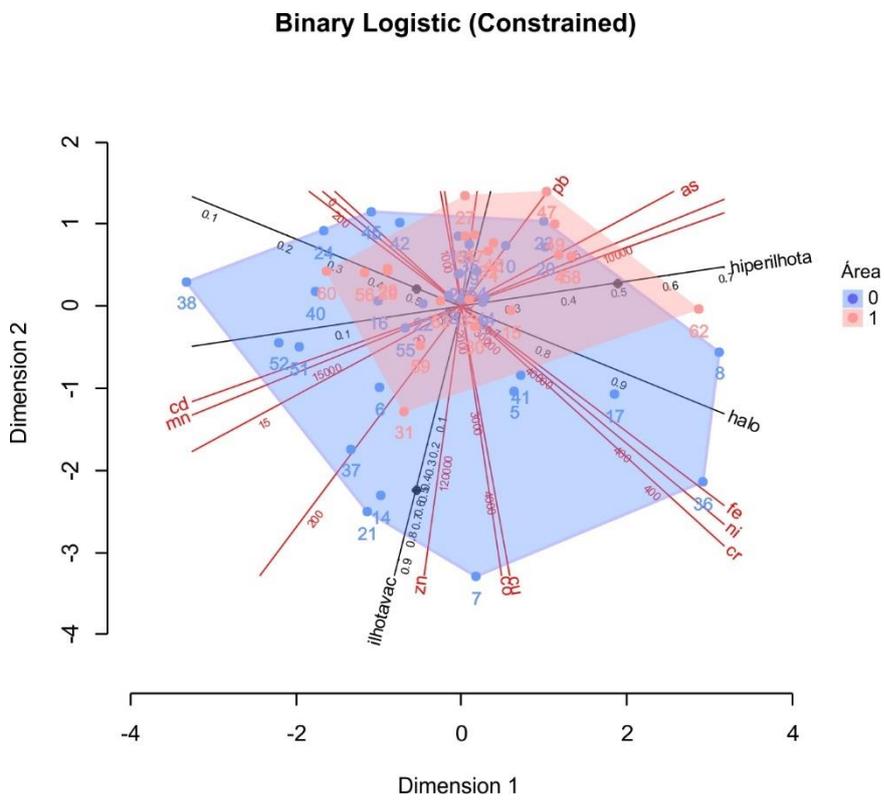
Ver legendas sob a Tabela 13. Fonte: Braga (2022), elaborado pelo software R, pacote MultBiplotR. Editado em CorelDraw Home&Student X7.

- No pâncreas, a ocorrência de halo perinuclear e hiperplasia de ilhotas apareceram com alta influência positiva predominante de PC1, enquanto a vacuolização das ilhotas teve influência negativa do eixo principal citado (Tabela 14). Todas as influências foram consideradas significativas e o comportamento da vacuolização das ilhotas mostrou altos valores de Pseudo R^2 , levando a crer que este modelo de biomarcador endócrino superou os

demais analisados neste trabalho até agora. Através do Gráfico 6, é possível observar que Cu, Zn e Co mostraram-se correlacionados entre si, e que o eixo de vacuolização das ilhotas apareceu sob influência direta predominante desses três elementos. Ainda segundo o gráfico, os halos perinucleares foram mais influenciados pelos elementos Fe, Ni e Cr, enquanto a hiperplasia das ilhotas teve maior influência de Pb e As. Os polígonos de alterações por área mostraram-se majoritariamente congruentes, mas com maior similaridade entre as ocorrências nos indivíduos amostrados, maior influência de Pb e As, maior chance de ocorrência de hiperplasia de ilhota e menor de vacuolização de ilhotas.

A degeneração espontânea das ilhotas pancreáticas em cães diabéticos pode ter causas ambientais, como exposição a As, ao hidrocarboneto dioxina (Parker *et al.*, 2002), a Cd, Ni e Hg (CHEN *et al.*, 2009). Neste estudo também foram detectadas lesões no pâncreas exócrino, que podem indiretamente afetar a integridade das ilhotas, dependendo dos graus de inflamação do parênquima (GILOR *et al.*, 2020).

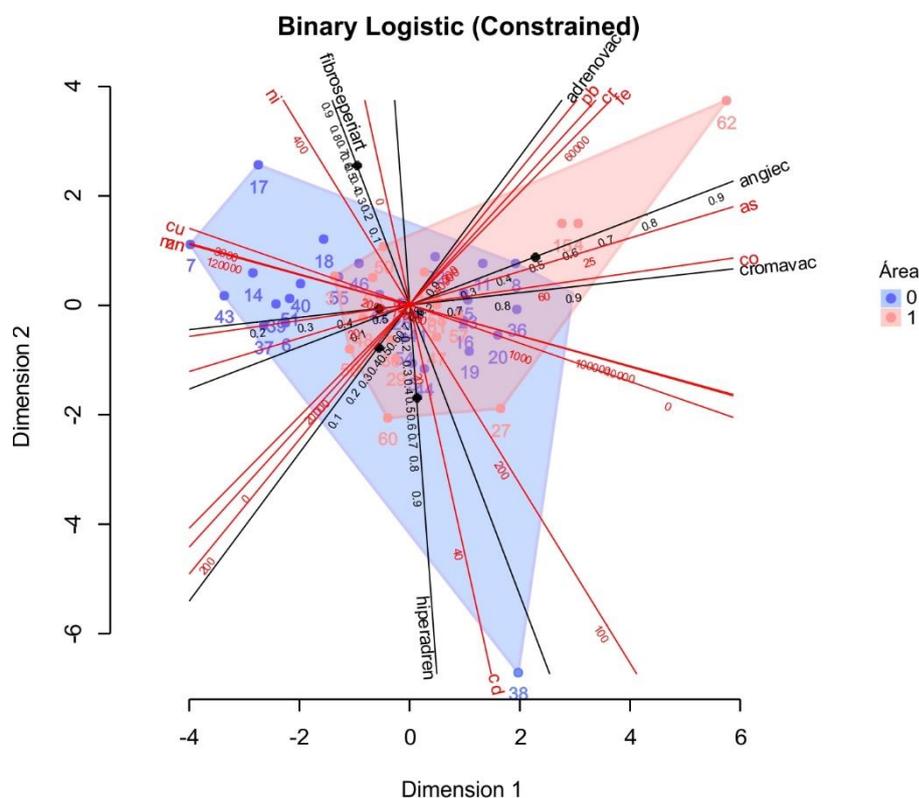
Gráfico 6. Resultados da RDA para dados binários com respostas lógicas para alterações de ilhotas pancreáticas. Disposição das variáveis predictoras (retas vermelhas), resposta (retas pretas) e grupos de indivíduos por área.



Ver legendas sob a Tabela 14. Fonte: Braga (2022), elaborado pelo software R, pacote MultBiplotR. Editado em CorelDraw Home&Student X7.

- Dentre as alterações nas interrenais (Tabela 15), todas mostraram-se estatisticamente significativas, porém, a fibrose periarteriolar e a vacuolização de células adrenocorticais apresentaram os parâmetros mais expressivos: as maiores proporções de influência de PC2 (81,6% e 66,4%); os mais altos índices de adequação ao modelo (McFadden's 0,64 e 0,34); as maiores participações na variação das alterações (76,2 e 68,1%). De acordo com o Gráfico 7, a fibrose periarteriolar revelou-se influenciada direta e predominantemente por Ni, Cu, Zn e Mn; a vacuolização de células adrenocorticais por Pb, Cr e Fe; a angiectasia por As; a vacuolização de células cromafins por Co; e a hiperplasia de células adrenocorticais por Cd. Os polígonos de alterações por área mostraram distinção parcial e maior ocorrência de angiectasias e vacuolização de células cromafins nas áreas cultivadas.

Gráfico 7. Resultados da RDA para dados binários com respostas lógicas para alterações de interrenais. Disposição das variáveis predictoras (retas vermelhas), resposta (retas pretas) e grupos de indivíduos por área.



Ver legendas sob a Tabela 15. Fonte: Braga (2022), elaborado pelo software R, pacote MultBiplotR. Editado em CorelDraw Home&Student X7.

Após expostas a Hg, Cd, Co e Cu, células corticais murinas isoladas sofreram degeneração e produção reduzida de corticosterona induzida por corticotropinas (NG e LIU, 1990). A exposição crônica experimental de anfíbios caudados ao Cd alterou o funcionamento das interrenais, aumentando os níveis de aldosterona e epinefrina, e reduzindo os de corticosteronas e ACTH (GAY *et al.*, 2013). A hiperplasia de células interrenais associada ao Cd, e a degeneração de células cromafins associada ao Co, observadas no presente trabalho, podem representar os mecanismos de alteração dos níveis hormonais dos estudos supracitados.

Tabela 13. Resultados da RDA para dados binários com respostas logísticas para alterações em glândulas paratireoides.

	intercept	dim1	dim2	Deviance	D.F	P-val	Nagelkerke	Cox-Snell	MacFaden	% correct	Sensitivity	Specificity	Thresholds	Dim1	Dim2	Communalities
capsula	-11.424	-0.862	0.805	9.832	2	0.0017 **	0.277	0.200	0.174	68.181	21.428	90.000	-0.116	-0.558	0.521	0.582
ajuste	0.482	-0.226	-0.192	1.642	2	0.2	0.049	0.036	0.028	59.090	85.185	17.647	0.294	-0.217	-0.184	0.081
mm	-23.044	-0.829	0.73	5.155	2	0.0231 *	0.197	0.111	0.143	86.363	0.000	100.000	-0.447	-0.556	0.490	0.550
lipídios	-0.721	0.64	0.49	9.443	2	0.0021 **	0.263	0.193	0.163	75.000	43.750	85.714	-0.076	0.498	0.382	0.394
granuloc	-18.446	0.659	0.472	6.837	2	0.0089 **	0.232	0.144	0.161	81.818	12.500	100.000	-0.270	0.512	0.367	0.397
corpos	-2.667	0.268	0.736	3.585	2	0.0582	0.169	0.078	0.132	90.909	0.000	100.000	-0.744	0.211	0.580	0.381
Total				36.497	12	0.0002 ***	0.198	0.129	0.131	76.893	45.333	88.889				

Legenda: capsula=cápsula espessada; ajuste=células justapostas ou frouxas; mm=melanomacrófagos periféricos; lipídios=lipídios parênquima; granuloc=infiltrado granulocítico moderado; corpos=corpos residuais.

Tabela 14. Resultados da RDA para dados binários com respostas logísticas para alterações em ilhotas pancreáticas.

	intercept	dim1	dim2	Deviance	D.F	P-val	Nagelkerke	Cox-Snell	MacFaden	%correct	Sensitivity	Specificity	Thresholds	Dim1	Dim2	Communalities
halo	0.483	0.758	-0.312	8.733	2	3.124076e-03 ***	0.209	0.155	0.124	61.538	87.096	38.095	0.055	0.587	-0.242	0.402
hiperilhota	-1.238	0.642	0.097	5.999	2	1.431307e-02 *	0.161	0.109	0.102	78.846	15.384	97.435	-0.207	0.539	0.082	0.297
ilhotavac	-5.672	-0.594	-2.401	30.774	2	2.897681e-08 ***	0.923	0.447	0.895	98.076	100.000	100.000	-0.184	-0.223	-0.900	0.860
Total				45.507	6	3.709975e-08 ***	0.389	0.253	0.278	79.487	68.085	87.155				

Legenda: halo=halo perinuclear; hiperilhota=hiperplasia das ilhotas; ilhotavac=vacuolização das ilhotas.

Tabela 15. Resultados da RDA para dados binários com respostas logísticas para alterações em interrenais.

	intercept	dim1	dim2	Deviance	D.F	P-val	Nagelkerke	Cox-Snell	MacFaden	% Correct	Sensitivity	Specificity	Thresholds	Dim1	Dim2	Communalities
hiperadren	-2.137	0.091	-1.256	11.735	2	6.132873e-04 ***	0.387	0.225	0.292	86.956	42.857	100.000	-0.182	0.057	-0.781	0.614
infiltrado	-1.436	-0.409	-0.018	4.148	2	4.167734e-02 *	0.133	0.086	0.086	78.260	0.000	97.222	-0.346	-0.379	-0.017	0.144
adrenovac	1.401	0.868	1.176	20.816	2	5.055546e-06 ***	0.502	0.364	0.350	76.086	93.750	57.142	0.067	0.490	0.664	0.681
cromavac	0.351	0.619	0.069	10.521	2	1.179829e-03 **	0.274	0.204	0.167	73.913	84.615	55.000	0.033	0.526	0.059	0.280
angiec	-1.535	0.590	0.227	9.234	2	2.374928e-03 **	0.279	0.182	0.190	80.434	30.000	97.222	-0.166	0.499	0.192	0.286
congestao	-1.155	0.335	-0.311	4.702	2	3.011597e-02 *	0.142	0.097	0.089	76.086	8.333	97.058	-0.245	0.305	-0.283	0.174
necadren	-3.317	-0.639	-0.613	4.860	2	2.747657e-02 *	0.253	0.100	0.210	93.478	0.000	100.000	-0.682	-0.479	-0.459	0.440
edema	-2.754	0.240	-0.032	0.674	2	4.113505e-01	0.038	0.015	0.030	93.478	0.000	100.000	-4.081	0.234	-0.031	0.056
fibroseperiar	-4.909	-0.630	1.674	13.062	2	3.011878e-04 ***	0.692	0.247	0.643	97.826	50.000	100.000	-0.375	-0.308	0.817	0.762
corpos.1	-3.170	0.563	-0.246	4.043	2	4.435014e-02 *	0.215	0.084	0.177	93.478	0.000	100.000	-0.784	0.480	-0.210	0.275
Total				83.800	20	8.807826e-10 ***	0.286	0.167	0.209	85.000	55.555	94.886				

Legenda: hiperadren= hiperplasia de células adrenocorticais; infiltrado=infiltrado linfocítico moderado; adrenovac= vacuolização de células adrenocorticais; cromavac=vacuolização de células cromafins; angiec=angiectasia multifocal; congestão=congestão difusa; necadren=necrose de células adrenocorticais; edema=edema intersticial moderado; fibroseperiar=fibrose periarterial multifocal; corpos.1=corpos residuais.

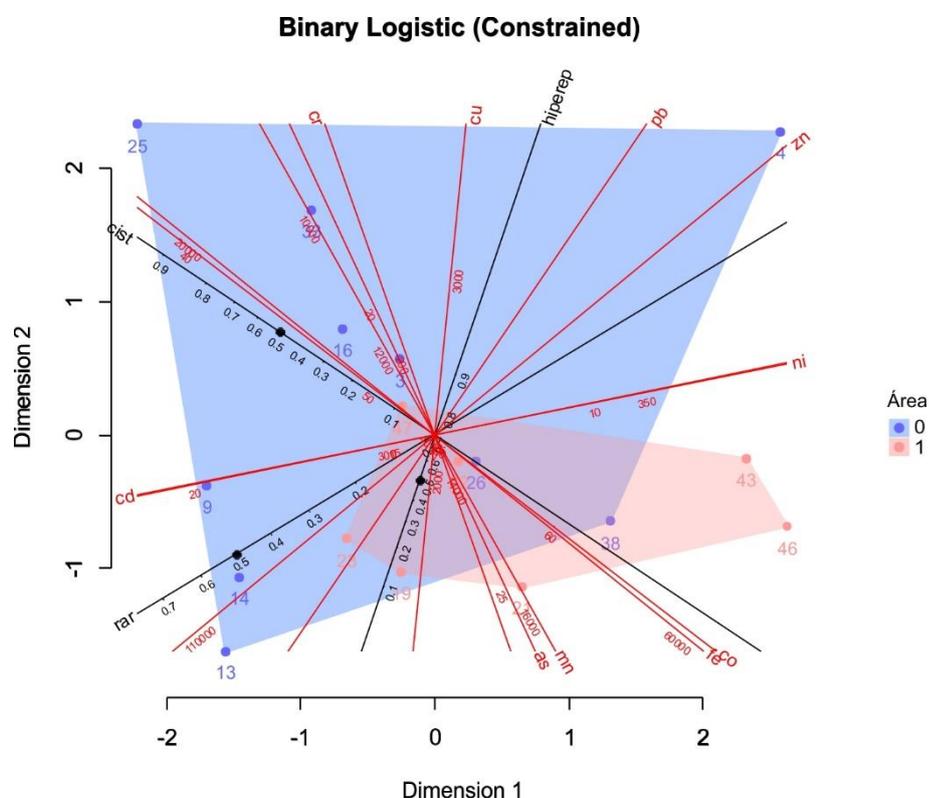
(Códigos de significância: ****0,001 *** 0,01 ** 0,05). Fonte: Braga (2022), elaborado no software R, pacote MultBiplotR.

5.4.2. Órgãos linfoides: timo e baço

A RDA para dados binários aplicada aos órgãos linfoides revelou que:

- No timo, os cistos e a rarefação medular foram os achados mais influenciados por PC1 (75,2% e 68,3%, respectivamente) e a hiperplasia epitelial foi mais influenciada por PC2 (88,5%) (Tabela 16). De acordo com o Gráfico 8, os elementos Cu, Pb, Cr e Zn mostraram maiores correlações com a hiperplasia epitelial; Cd mostrou maior correlação com a rarefação medular, e os menores valores de Fe e Co mostraram correlação com os cistos típicos. Os polígonos de alterações por área mostraram maior dispersão de valores em áreas não cultivadas.

Gráfico 8. Resultados da RDA para dados binários com respostas logísticas para alterações no timo. Disposição das variáveis predictoras (retas vermelhas), resposta (retas pretas) e grupos de indivíduos por área.



Ver legendas sob a Tabela 16. Fonte: Braga (2022), elaborado pelo software R, pacote MultBiplotR. Editado em CorelDraw Home&Student X7.

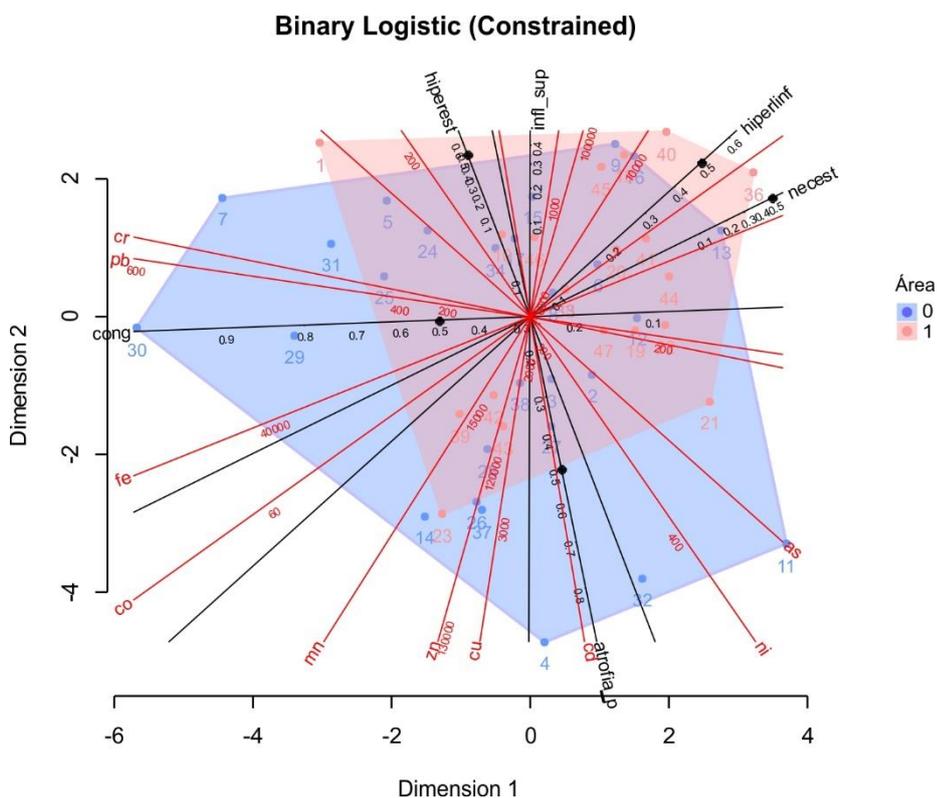
Novamente, raros estudos ecológicos com dados para comparação foram encontrados. Na Flórida (EUA), análise de timos de crocodilos de lagos expostos a contaminantes químicos mostrou redução da razão medula:córtex, com rarefação medular (ROONEY *et al.*, 2003). Estudos experimentais com *X. laevis* observaram que células do sangue, timo e baço de indivíduos tratados com Diazinon, transplantadas para novos indivíduos, perderam a capacidade hematopoiética. Isso não foi observado em indivíduos tratados com $Pb(C_2H_3O_2)_2$ (ROLLINS-SMITH *et al.*, 2005). Exposição ao Cd induziu apoptose de timócitos em camundongos, e esse elemento possui centenas de evidências de interferência em outras células do sistema imune inato e adaptativo em diferentes espécies de mamíferos (WANG *et al.*, 2021). Efeitos de outros elementos sobre a morfologia do timo não foram encontrados nem em trabalhos experimentais.

- Já no baço, a hiperplasia do estroma, o infiltrado granulocítico e a atrofia de PALS foram os achados mais influenciados por PC2 (90,5%, 82,1% e 61,6%, respectivamente), enquanto a necrose focal do estroma e a eritrofagocitose foram mais influenciados por PC1 (86,1% e 76,8% respectivamente) (Tabela 17). Conforme apresentado no Gráfico 9, a congestão esplênica mostrou-se diretamente correlacionada a Pb, Cr, Co e Fe e a atrofia de PALS diretamente correlacionada a Cd, Zn, Cu e Ni. Os polígonos de alterações por área mais uma vez mostraram congruência parcial, e maior dispersão de valores em áreas não cultivadas.

No Arquipélago de Bermuda, no Atlântico a leste da América do Norte, um estudo verificou os efeitos da poluição e contaminação química na função imunológica de *Bufo marinus* e *Eleutherodactylus johnstonei* (LINZEY *et al.*, 2003). Cd, Cr e Pb foram detectados em pele e músculo esquelético de ambas as espécies, em quase todos os sítios de coleta do estudo. As amostras de solo confirmaram a ocorrência dos metais nos pontos de coleta. Amostras de fígado mostraram degeneração de hepatócitos, granulomas e numerosos centros de melanomacrófagos, e amostras de baço mostraram redução da polpa branca. Foi observada resposta reduzida dos esplenócitos à proliferação quando estimulados por LPS (lipopolissacarídeo) (LINZEY *et al.*, 2003). Agrotóxicos organoclorados também foram isolados nos espécimes

estudados, ressaltando a complexidade de interações entre toxicantes diversos em ambientes antropizados.

Gráfico 9. Resultados da RDA para dados binários com respostas logísticas para alterações no baço. Disposição das variáveis predictoras (retas vermelhas), resposta (retas pretas) e grupos de indivíduos por área.



Ver legendas sob a Tabela 17. Fonte: Braga (2022), elaborado pelo software R, pacote MultBiplotR. Editado em CorelDraw Home&Student X7.

Tabela 16. Resultados da RDA para dados binários com respostas logísticas para alterações histológicas em timo.

	intercept	dim1	dim2	Deviance	D.F	P-val	Nagelkerke	Cox-Snell	MacFaden	%Correct	Sensitivity	Specificity	Thresholds	Dim1	Dim2	Communalities
fibest	-1.1483924	-0.8201462	0.6809041	5.740501	2	1.657807e-02 *	0.4055268	0.2865740	0.2753262	82.35294	40.00000	100.00000	-0.20005091	-0.5611296	0.4658626	0.5318944
hiperep	0.9370827	0.8363561	2.4822039	17.580425	2	2.754087e-05 ***	0.8464528	0.6444689	0.7217300	100.00000	100.00000	85.71429	0.05330262	0.2983026	0.8853262	0.8727869
rar	-2.3048202	-1.1389421	-0.6920775	6.487832	2	1.086154e-02 *	0.5008229	0.3172573	0.3802378	88.23529	66.66667	100.00000	-0.35525277	-0.6835643	-0.4153675	0.6397903
cist	-2.9637402	-1.7671224	1.1806630	14.659292	2	1.287981e-04 ***	0.8468427	0.5778148	0.7519938	94.11765	66.66667	100.00000	-0.20217485	-0.7523631	0.5026744	0.8187318
Total				44.468050	8	4.640700e-07	0.6861808	0.4800080	0.5438518	91.17647	76.19048	97.87234				

Legenda: fibest= fibrose do estroma; hiperep = hiperplasia epitelial; rar = rarefação medular; cist = cistos tímicos focais.

Tabela 17. Resultados da RDA para dados binários com respostas logísticas para alterações histológicas em baço.

	intercept	dim1	dim2	Deviance	D.F	P-val	Nagelkerke	Cox-Snell	MacFaden	%Correct	Sensitivity	Specificity	Thresholds	Dim1	Dim2	Communalities
hiperest	-5.63805124	-0.25699046	2.204121182	35.15249061	2	3.048712e-09 ***	0.8498608438	0.526652426	0.7736289592	95.74468	50.00000	100.00000	-0.16038839	-0.10558503	0.90556749	0.831200674
infl_sup	-4.29692979	0.33114648	1.515600025	18.17473823	2	2.015344e-05 ***	0.6032802059	0.320702809	0.5098650100	91.48936	0.00000	100.00000	-0.2364232	0.17941267	0.82114068	0.706460921
hem	-0.75817224	0.02496947	-0.002513411	0.02756667	2	8.681317e-01	0.0008209962	0.000586353	0.0004683011	68.08511	0.00000	100.00000	-2.750.321.769	0.02496161	-0.00251262	0.000629395
cong	-0.91043133	-0.54166252	0.164446540	11.09836049	2	8.640407e-04 ***	0.2939097402	0.210326200	0.1877926109	76.59574	33.33333	90.62500	-0.08203296	-0.47137799	0.14310844	0.242677231
atrofia_p	-1.80840580	-0.11982854	-0.787720977	15.90913348	2	6.645724e-05 ***	0.4363684758	0.287155662	0.3154300259	85.10638	50.00000	94.59459	-0.11367092	-0.09371726	-0.61607232	0.388328033
hiperlinf	-2.59253837	0.63498922	0.364907450	9.42389335	2	2.141763e-03 **	0.3282657590	0.181685359	0.2486927252	87.23404	0.00000	97.56098	-0.27510269	0.51229323	0.2943981	0.349114597
angiec	-1.85629968	-0.12867638	0.281016065	2.04218744	2	1.529895e-01	0.0746346009	0.042520336	0.0515244825	85.10638	0.00000	100.00000	-0.90897615	-0.12293829	0.26848466	0.087197836
necest	-7.64584172	1.83573239	0.407497319	12.21656643	2	4.736702e-04 ***	0.8221134058	0.228892083	0.7965625103	97.87234	0.00000	100.00000	-0.62585848	0.86193478	0.19133296	0.779539866
mm	0.04325936	-0.07583446	0.209671108	1.94728247	2	1.628800e-01	0.0541214834	0.040584987	0.0298963008	51.06383	66.66667	60.86957	0.02221525	-0.07401698	0.20464604	0.047358513
granuloma	-2.26072959	0.18516863	-0.251353873	1.59891110	2	2.060576e-01	0.0678345941	0.033447232	0.0500739279	89.36170	0.00000	100.00000	-141.391.825	0.17675506	-0.23993301	0.088810201
plasm	-2.14727836	-0.12054569	0.621477353	6.66883940	2	9.811306e-03 **	0.2292322979	0.132283473	0.1648826514	85.10638	28.57143	100.00000	-0.32198682	-0.10185186	0.52510072	0.286104564
celsret	-3.27749337	0.83435640	-0.120330539	8.28727631	2	3.992383e-03 **	0.3450954806	0.161654547	0.2790269068	91.48936	0.00000	100.00000	-0.39548499	0.63793077	-0.09200212	0.415420061
eritrofrag	-5.74010628	1.20590092	0.096700541	5.54151775	2	1.857047e-02 *	0.5016033611	0.111219191	0.4703422407	97.87234	0.00000	100.00000	-103.583.649	0.76830049	0.0616096	0.594081385
rus	-3.25588414	0.14976508	0.268188269	0.64323035	2	4.225435e-01	0.0457289835	0.013592528	0.0387982767	95.74468	0.00000	100.00000	-506.177.011	0.14316325	0.25636619	0.086219342
apop_p	-3.86825309	-0.44936984	-0.502142464	3.97561497	2	4.616359e-02 *	0.2619279513	0.081108799	0.2282620644	95.74468	0.00000	100.00000	-0.9729949	-0.37265738	-0.41642112	0.312280077
coc	-4.24154011	1.13504646	-0.100541121	11.48284411	2	7.024156e-04 **	0.4988755952	0.216759777	0.4285948910	93.61702	0.00000	100.00000	-0.36938062	0.74868158	-0.06631736	0.5649222101
Total				144.19045317	32	3.330669e-16	0.3237796784	0.174480690	0.2476935342	86.70213	27.27273	97.66355				

Legenda: hiperest = hiperplasia do estroma; infl_sup= infiltrado granulocítico leve a moderada; hem = hematopoiese extramedular; cong= congestão difusa; atrofia_p= atrofia de PALS; hiperlinf=hiperplasia linfóide; angiec=angiectasia; necest=necrose focal do estroma; mm=melanomacrófagos moderados; granuloma=granulomas multifocais; plasm= plasmócitos moderados; celsret=células reticulares evidentes; eritrofrag=eritrofagocitose moderada; rus=Corpúsculos de Russell; apop_p=apoptose de PALS; coc= coccídeos.

Códigos de significância: '***'0,001 '**' 0,01 '*' 0,05. Fonte: Braga (2022), elaborado no software R, pacote MultBiplotR.

6. CONCLUSÕES

A detecção e a quantificação de elementos potencialmente tóxicos em carcaças de *L. macrosternum* nativos de Tabuleiro do Norte, no BRJ, foram satisfatórias no presente estudo. Concentrações de Cu, Zn e Mn se mostraram superiores às de *L. ocelatus* do Rio Contas, também na região nordeste do Brasil. Já os elementos Cr, Co, Ni, Cd e Pb se apresentaram inferiores a quase todas as referências de estudos similares nos últimos dez anos, o que é controverso: apesar dos valores terem sido inferiores, comprovou-se a presença e o acúmulo de elementos tóxicos nos tecidos de vertebrados da região. Apesar disso, há de se considerar que os presentes resultados decorreram da análise de tecidos mistos, e foram comparados com o acúmulo em tecido muscular. Fe, Co e As mostraram mais homogeneidade de concentrações nas áreas não cultivadas, enquanto Cu, Ni, Cd e Pb mostraram valores mais homogêneos nas áreas cultivadas, o que sugeriu exposição constante e/ou população exposta homogênea em tamanho e faixa etária, e fontes diferentes de contaminação entre os dois status de área. O metal Zn apresentou a maior afinidade, enquanto Cd e Co apresentaram menores afinidades pelos elementos essenciais das carcaças analisadas. A maioria dos indivíduos analisados foi classificada no grupo sob maior influência de Co, Zn, Fe e Pb, provavelmente provenientes de duas fontes distintas. Indivíduos machos, com menor índice corporal e menores concentrações de Ca foram mais afetados pelo acúmulo de Pb. Não foi observada diferença significativa nas concentrações dos elementos detectados nas carcaças entre as áreas cultivadas e não cultivadas, exceto por uma tendência a maiores concentrações de Pb em áreas não cultivadas e As em áreas cultivadas. Apesar desses achados, não ficou provada influência significativa de áreas de cultivo comercial no acúmulo de metais nos espécimes analisados. Difusão de contaminantes químicos para regiões mais distantes por meio do vento e das águas deve ser considerada.

Os indivíduos amostrados em áreas cultivadas de Tabuleiro do Norte mostraram-se globalmente menores, significativamente as fêmeas. Além disso, mostraram redução na densidade do parênquima das paratireoides e presença de infiltrado granulocítico significativos, o que pode ter tido consequências clínicas de hipoparatireoidismo primário. Não foi possível avaliar alterações tireoidianas com acurácia, devido ao pequeno número de amostras obtida. Hiperplasia de ilhotas pancreáticas se revelaram em frequências moderadas e podem sugerir presença de

disruptores endócrinos nas áreas cultivadas. As interrenais mostraram alterações significativas, principalmente nos machos de áreas não cultivadas. Baixas frequências e graus de ocorrência podem significar alterações crônicas, que podem estar associadas ao nível de adaptação da espécie ao ambiente antropizado. Neste estudo, as paratireoides se mostraram bons biomarcadores morfológicos de insultos tóxicos em áreas cultivadas.

As análises estatísticas multivariadas mostraram probabilidade significativa de influência de compostos inorgânicos potencialmente tóxicos na presença de alterações histológicas observadas, principalmente na vacuolização das ilhotas pancreáticas e na hiperplasia do estroma esplênico. No entanto, os elementos químicos quantificados nas carcaças responderam por sessenta por cento da variância dos dados analisados, o que ressalta a interação de 40% de outros fatores (fragmentação de habitat, aumento de temperatura e da radiação ultravioleta, redução da pluviosidade, presença de compostos químicos orgânicos, estressores de presença humana, dentre outras possibilidades) nas alterações observadas.

Os resultados sugeriram que a espécie *L. macrosternum* é potencial bioindicadora regional de elementos potencialmente tóxicos. Contudo, biomarcadores morfológicos podem não ser sensíveis o suficiente em todos os tipos de tecidos para medir o efeito de elementos químicos inorgânicos potencialmente tóxicos na região avaliada.

A ausência de quantificação simultânea de elementos químicos nos solos e águas da região e alguns aspectos da metodologia, como a escolha dos tecidos avaliados, a prévia conservação em formaldeído, e as técnicas de preparação das amostras podem ser considerados possíveis limitantes para a definição de *L. macrosternum* como bioindicador ambiental do Vale do Rio Jaguaribe neste estudo.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Essa pesquisa não termina aqui. Muitos dados provenientes dessa amostra ainda serão trabalhados e publicados nos próximos meses e anos. Pretende-se utilizar a experiência adquirida até aqui para contribuir com a regulação do uso de compostos químicos, especialmente na Bacia do Rio Jaguaribe, consequentemente prevenindo problemas de saúde em humanos e na fauna silvestre nativa. Outra perspectiva é compartilhar e multiplicar o conhecimento conquistado nessa empreitada.

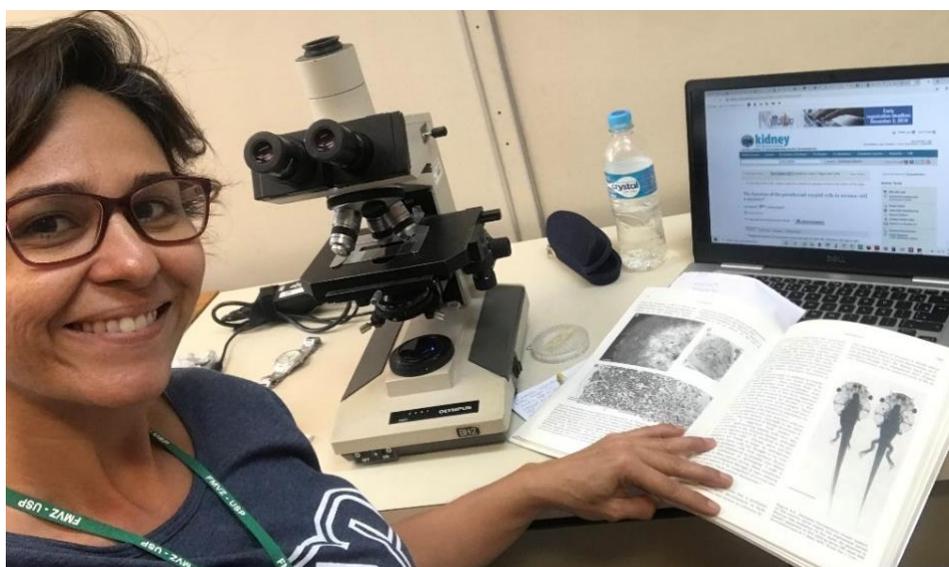
...

Chega ao final mais um ciclo da minha vida profissional. Sinto-me realizada por ter chegado até aqui, por ter conseguido planejar e executar essa investigação e produzir esses resultados. O conhecimento adquirido nessa etapa e as relações construídas certamente serão compartilhados com outros profissionais a fim de continuarmos descobrindo e produzindo ciência.

Todos aqueles que passaram por mim nessa jornada – orientadora, professores, funcionários da USP, colegas da pós, parceiros, palestrantes, colegas de trabalho, familiares e amigos deixaram um pedacinho de si nessas páginas. Construímos relações e elas nos constroem, permitindo que construamos o nosso legado, que deixemos nossa marca no mundo.

A todos os que participaram, o meu sincero agradecimento. Esse documento não é apenas científico; ele é uma prova de resistência e de persistência durante esses tempos sombrios. Este documento evidencia como a colaboração em prol de um objetivo comum, mesmo em condições não-ideais, pode ser bem-sucedido.

Que venham dias melhores, para a ciência e para o Brasil.



8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AB´SABER, A.N. **Litoral do Brasil**. São Paulo: Metalivros; 2001. 286 p.

ABDEL-SHAFY, H. I.; MANSOUR, M. S. M. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. **Egyptian Journal of Petroleum**, v. 25, n. 1, p. 107–123, mar. 2016. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1110062114200237> .

ACCORDI, F.; CIANFONI, P. Histology and ultrastructure of the adrenal gland of *Rhacophorus leucomystax* (Amphibia, Anura). **Bolletino di zoologia**, v. 48, n. 3–4, p. 277–284, 14 jan. 1981. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/11250008109439344> .

ADELIZZI, R.; PORTMANN, J.; VAN METER, R. Effect of Individual and Combined Treatments of Pesticide, Fertilizer, and Salt on Growth and Corticosterone Levels of Larval Southern Leopard Frogs (*Lithobates sphenoccephala*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 77, n. 1, p. 29–39, 24 jul. 2019. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00244-019-00629-6> .

ADLASSNIG, W. et al. Amphibians in metal-contaminated habitats. v. 49, n. 3, p. 149–158, 2013. Disponível em: <http://www.salamandra-journal.com> .

AGNEW, U.; SLESINGERTL. Zinc Toxicity. In: **StatPearls [Internet]**. Treasure Island: StatPearls Publishing, 2021.

AKTAR, W.; SENGUPTA, D.; CHOWDHURY, A. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 2, n. 1, p. 1–12, 1 mar. 2009. Disponível em: <http://content.sciendo.com/view/journals/intox/2/1/article-p1.xml>.

ALEXANDRE, S.F. **Exposição a agrotóxicos e fertilizantes químicos: agravos à saúde dos trabalhadores no agronegócio do abacaxi em Limoeiro Do Norte-Ce**. 2009. 154 f. Fortaleza. Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará; 2009. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/15792>

AMORIM, M. I. M. et al. Cytogenetic damage related to low levels of methyl mercury contamination in the Brazilian Amazon. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 72, n. 4, p. 496–507, 2000.

AMPHIBIAWEB: Information on amphibian biology and conservation. [web application]. 2020. Berkeley, California: AmphibiaWeb. Available: <https://amphibiaweb.org/> . (Accessed: 12 Out. 2020).

ANDRADE, J. H. R.; ALVES, T. R.M. A problemática da disposição final dos resíduos sólidos na região do Vale Do Jaguaribe: um olhar sobre o CGIRS-VJ. In: II Congresso Sul-Americano de Resíduos Sólidos e Sustentabilidade, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: IBEAS, 2019. Disponível em: <http://www.ibeas.org.br/conresol/conresol2019/IV-144.pdf> . Acesso em 23 set. 2021.

ANDRADE, M. V. F. et al. Influence of sediment parameters on the distribution and fate of PAHs in an estuarine tropical region located in the Brazilian semi-arid (Jaguaribe River, Ceará coast). **Marine Pollution Bulletin**, v. 146, n. July, p. 703–710, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.07.027> .

ANTONGIOVANNI, M. et al. Chronic anthropogenic disturbance on Caatinga dry forest fragments. **Journal of Applied Ecology**, v. 57, n. 10, p. 2064–2074, 5 out. 2020. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1365-2664.13686> .

ARAÚJO, F.F.S. História natural de *Leptodactylus macrosternum* (Anura: Leptodactylidae) em áreas de caatinga nos estados da Paraíba e Rio Grande do Norte, nordeste do Brasil. 2015, 66 f. Trabalho de conclusão de curso (Licenciatura em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande. Disponível em: http://www.cstrold.sti.ufcg.edu.br/grad_cienc_bio/tcc_15_1/14_fernanda_de_fatima_souto_araujo_2015_1.pdf.

ARBI, S. et al. Effects of chronic exposure to mercury and cadmium alone and in combination on the coagulation system of Sprague-Dawley rats. **Ultrastructural Pathology**, v. 41, n. 4, p. 275–283, 4 jul. 2017. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01913123.2017.1327909> .

ARIKAN, H.; ÇIÇEK, K. Haematology of amphibians and reptiles: A review. **North-Western Journal of Zoology**, v. 10, n. 1, p. 190–209, 2014.

AVELINO, F. F.; TEIXEIRA, Z. A.; PEREIRA, D. M. Análise de agrotóxicos em águas da Chapada do Apodi, Ceará, Brasil. In: Revista Águas Subterrâneas, Supl, São Paulo. **Anais do III Congresso de Meio Ambiente Subterrâneo**, São Paulo: 2013.

BARBOSA, I. M. et al. Cancer among children and adolescents: Relationship with the poles of agricultural irrigation in the state of Ceará, Brazil. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 24, n. 4, p. 1563–1570, 2019.

BENCKO, V.; FOONG, F. Y. L. The history of arsenical pesticides and health risks related to the use of Agent Blue. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 24, n. 2, p. 312–316, 2017.

BEYER, W. N.; MEADOR, J. P. **Environmental contaminants in Biota: interpreting tissue concentrations**. Boca Raton: CRC Press, 2011.

BÓKONY, V. et al. Endocrine disruptors in breeding ponds and reproductive health of toads in agricultural, urban and natural landscapes. **Science of The Total Environment**, v. 634, p. 1335–1345, set. 2018. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969718311239> .

BOONE, M. D.; BRIDGES, C. M.; ROTHERMEL, B. B. Growth and development of larval green frogs (*Rana clamitans*) exposed to multiple doses of an insecticide. **Oecologia**, v. 129, n. 4, p. 518–524, 1 dez. 2001. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s004420100749> .

BOSCHWITZ, D. On the problem of seasonal changes in anuran parathyroids: observations on *Bufo viridis* in Israel. **Israel Journal of Zoology**, v. 16, p. 46–48, 1967.

BRAGA, R.R.; MATUSHIMA, E. R. Jaguaribe Valley : a threatened oasis in the brazilian semi-arid region – Systematic review on environmental contamination and potential hazard to the basin and its users. **Revista de Geociências do Nordeste**, v. 7, n. 2, p. 24–34, 2021. Disponível em: <https://periodicos.ufrn.br/revistadoregne/article/view/24607/14480> .

BRAGA, R.R. et al. Influência do Cádmiu sobre a atividade testicular em *Leptodactylus macrosternum* (Anura: Leptodactylidae) de agrossistemas no nordeste do Brasil. In: Anais do VI Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária / XX Encontro Nacional de Patologia Veterinária, Online. **Anais...** Online: Congresse.me, 2021. Disponível em: <https://eventos.congresse.me/xxenapave/edicoes/6-congresso-brasileiro-de-patologia-veterinaria-e-xx-encontro-nacional-de-patologia-1-edicao/anais> .

BRASIL. **Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA**. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Brasília: 2013, 54p. Disponível em: https://antigo.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Anexo-Resolucao-Normativa-n-37-Diretriz-da-Pratica-de-Eutanasia_site-concea-.pdf. Acesso em 29 Ago. 2021.

BRASIL. Ministério da Educação. **Indicadores socioeconômicos do Ceará 2010**. Disponível em: http://portal.mec.gov.br/setec/arquivos/pdf/indicad_ce.pdf. Acesso em: 26 out. 2019.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Agência Nacional das Águas. **Reservatórios do Semiárido Brasileiro. Hidrologia, balanço hídrico e operação. Anexo C – Jaguaribe**. Brasília: ANA, 2017. Disponível em <https://www.ana.gov.br/noticias/estudo-reservatorios/anexo-c-jaguaribe.pdf>. Acesso em: 08 nov. 2019.

BRASIL. **RDC nº 42 de 29 de Agosto de 2013. Dispõe sobre o Regulamento Técnico MERCOSUL sobre Limites Máximos de Contaminantes Inorgânicos em Alimentos**. Brasília: Ministério da Saúde, Agência Nacional de Saúde, 2013. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/rdc0042_29_08_2013.pdf/c5a17d2d-a415-4330-90db-66b3f35d9fbd . Acesso em 28 Nov. 2019.

BRIFFA, J.; SINAGRA, E.; BLUNDELL, R. Heavy metal pollution in the environment and their toxicological effects on humans. **Heliyon**, v. 6, n. 9, p. e04691, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04691> .

BURGGREN, W. W.; WARBURTON, S. Amphibians as animal models for laboratory research in physiology. **ILAR Journal**, v. 48, n. 3, p. 260–269, 2007.

CALADO, B. O. **Atlas geoquímico do Ceará**. Rio de Janeiro: Ministério de Minas e Energia. CPRM. Serviço Geológico do Brasil, 2016 157p. Disponível em <https://rigeo.cprm.gov.br/bitstream/doc/18059/3/atlas_geog_ceara.pdf>. Acesso em 24 set. 2023.

CARSON, R. **Silent spring**. Boston: Houghton Mifflin, 1962, 400p.

CASTRO, M.G.G.M. **Avaliação do Uso de Agrotóxicos e da Qualidade dos Recursos Hídricos nos Assentamentos de Reforma Agrária Bernardo Marin II e Mundo Novo, Município de Russas (CE): um estudo de caso**. 2008, 80 f. Rio de Janeiro. Dissertação (Mestrado Profissional em Saúde Pública) – Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz; 2008. Disponível em <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/4715>

CEARÁ. Assembleia Legislativa. **Caderno regional da sub-bacia do Médio Jaguaribe**. Santana, E.W. (editor). Fortaleza: INESP; 2009. 102 p. Disponível em: <http://portal.cogerh.com.br/wp-content/uploads/2018/09/Bacia-do-Medio-Jaguaribe.pdf>. Acesso em: 19 set. 2019.

CEARÁ. Assembleia Legislativa. **Pacto das Águas (2010)**. Disponível em: <https://www.al.ce.gov.br/index.php/pacto-das-aguas>. Acesso em: 03 dez, 2019.

CEARÁ. Secretaria das Cidades. **Programa de desenvolvimento urbano de pólos regionais – Vale do Jaguaribe e Vale do Acaraú. Atualização do Plano de Desenvolvimento do Vale do Jaguaribe**. [s.l: s.n.]. 2016. Disponível em: https://www.cidades.ce.gov.br/wp-content/uploads/sites/12/2015/12/P8_Sumário-Executivo_Vale-Jaguaribe.pdf . Acesso em 23 set. 2021.

CEARÁ. SECRETARIA DE GESTÃO E PLANEJAMENTO. **Tabuleiro do Norte - Perfil Básico Municipal 2017**. Disponível em: < https://www.ipece.ce.gov.br/wp-content/uploads/sites/45/2018/09/Tabuleiro_do_Norte_2017.pdf> . Acesso em: 29 ago. 2021.

CESTA, M. F. Normal Structure, Function, and Histology of the Spleen. **Toxicologic Pathology**, v. 34, p. 455–465, 2006.

CHATIGNY, F. et al. Uses and doses of local anesthetics in fish, amphibians, and reptiles. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science** :

JAALAS, v. 56, n. 3, p. 244–253, 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28378704> .

CHAVES, M. F. et al. Influence of rainfall and temperature on the spermatogenesis of *Leptodactylus macrosternum* (Anura: Leptodactylidae). **Zoologia**, v. 34, p. 1–7, 2017.

CHEN, M. et al. Residential exposure to pesticide during childhood and childhood cancers: A meta-analysis. **Pediatrics**, v. 136, n. 4, p. 719–729, 2015.

CHEN, Y. W. et al. Heavy metals, islet function and diabetes development. **Islets**, v. 1, n. 3, p. 169–176, 27 nov. 2009. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/isl.1.3.9262> .

CORREIA, L. O. et al. Evaluation of the use of *Leptodactylus ocellatus* (anura: Leptodactylidae) frog tissues as bioindicator of metal contamination in Contas river, northeastern Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n. 4, p. 1549–1561, 2014.

COSTA, B. G. B.; LACERDA, L. D. Mercury (Hg) in fish consumed by the local population of the Jaguaribe River lower basin, Northeast Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 23, p. 13335–13341, 15 dez. 2014. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s11356-014-3297-6> .

D'AVILA, R. dos S. et al. Análise quantitativa temporal sobre os efeitos do uso de agrotóxicos em anfíbios – anuros. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 8, p. e383985682, 9 jul. 2020. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/5682> .

DA CUÑA, R. H. et al. Mechanism of action of endosulfan as disruptor of gonadal steroidogenesis in the cichlid fish *Cichlasoma dimerus*. **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP**, v. 187, p. 74–80, set. 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27235598> .

DA-SILVA-DIAS, F. J.; MARINS, R. V.; MAIA, L. P. Impact of Drainage Basin Changes on Suspended Matter and Particulate Copper and Zinc Discharges to the Ocean from the Jaguaribe River in the Semiarid NE Brazilian Coast. **Journal of Coastal Research**, v. 290, p. 1137–1145, 30 set. 2013. Disponível em: <http://www.bioone.org/doi/abs/10.2112/JCOASTRES-D-12-00115.1> .

DE LA RIVA, I.; MALDONADO, M. First record of *Leptodactylus ocellatus* (Linnaeus, 1758) (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) in Bolivia and comments on related species.

Graellsia, v. 55, p. 193–197, 1999. Disponível em <https://doi.org/10.3989/graellsia.1999.v55.i0.328> .

DELELLIS, R. A. Parathyroid tumors and related disorders. **Modern Pathology**, v. 24, n. S2, p. S78–S93, 1 abr. 2011. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/modpathol2010132> .

DIGGS, D. L. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons and digestive tract cancers: a perspective. **Journal of environmental science and health. Part C, Environmental carcinogenesis & ecotoxicology reviews**, v. 29, n. 4, p. 324–57, out. 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22107166> .

DIÓGENES, S.S. **(In)Visibilização das causas de câncer na zona rural de Limoeiro do norte, a vulnerabilização e os riscos do uso dos agrotóxicos**. 2017, 173 f. Fortaleza. Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará; 2017. Disponível em <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/30154> .

DIVELY, G. P. et al. Assessment of chronic sublethal effects of imidacloprid on honey bee colony health. **PloS one**, v. 10, n. 3, p. e0118748, 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25786127> .

DIXON, J.; STATON, M. Some Aspects of the Biology of *Leptodactylus macrosternum* Miranda-Ribeiro (Anura : Leptodactylidae) of the Venezuelan Llanos. Published by : **Herpetologists ' League Stable. Herpetologica**, v. 32, n. 2, p. 227–232, 1976. Disponível em: <https://www.jstor.org/stab>

DMOWSKI, K. et al. Thallium in spawn, juveniles, and adult common toads (*Bufo bufo*) living in the vicinity of a zinc-mining complex, Poland. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 187, n. 1, 2015.

DUFFUS, J. H. “Heavy metals” - A meaningless term? (IUPAC technical report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 793–807, 2002.

DURANOVA, H. et al. Changes in compact bone microstructure of rats subchronically exposed to cadmium. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 56, n. 1, p. 64, 24 dez. 2014.

Disponível em: <http://actavetscand.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13028-014-0064-0> .

EISLER, R. Nickel Hazards to Fish, Wildlife, and Invertebrates : A Synoptic Review. **Biological Science Report USGS/BRD/BSR-1998-0001. Contaminant Hazard Reviews. Report n°34.** Disponível em: https://www.pwrc.usgs.gov/eisler/CHR_34_Nickel.pdf . Acesso em Sept. 12, 2021.

ELMORE, S. A. Enhanced histopathology of the spleen. **Toxicologic Pathology**, v. 34, n. 5, p. 648–655, 2006. Disponível em: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=17067951&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers3://publication/doi/10.1080/01926230600865556> .

EL-SAYED, A.-R.; MOHRAN, H. S.; ABD EL-LATEEF, H. M. Corrosion Study of Zinc, Nickel, and Zinc-Nickel Alloys in Alkaline Solutions by Tafel Plot and Impedance Techniques. **Metallurgical and Materials Transactions A**, v. 43, n. 2, p. 619–632, 6 fev. 2012. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s11661-011-0908-4> .

EVANS, T. J. Reproductive toxicity and endocrine disruption. In: GUPTA, R. C. (Ed.). **Veterinary Toxicology**. 1st. ed. [s.l.] Academic Press, 2007. p. 206–244.

FALCÃO, L. Governo do Ceará inaugura infraestrutura do Polo Metalmeccânico de Tabuleiro do Norte para fortalecer o setor e gerar empregos. **Diário do Nordeste**, 2021. Disponível em: <https://www.ceara.gov.br/2021/09/02/governo-do-ceara-inaugura-infraestrutura-do-polo-metalmeccanico-de-tabuleiro-do-norte-para-fortalecer-o-setor-e-gerar-empregos/> . Acesso em 23 set. 2021.

FANALI, L.Z. **Alterações morfofuncionais nos melanomacrófagos hepáticos de peixes e anfíbios induzidas pelo contaminante benzo[a]pireno**. São José do Rio Preto, 2020, 87f. Tese (Doutorado em Biologia Animal) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita”, 2020. Disponível em <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/192893> .

FANALI, L. Z. et al. Effects of benzo[a]pyrene on the blood and liver of *Physalaemus cuvieri* and *Leptodactylus fuscus* (Anura: Leptodactylidae). **Environmental Pollution**,

v. 237, p. 93–102, jun. 2018. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749117338800> .

FAO. **AQUASTAT - FAO's Global Information System on Water and Agriculture**. Disponível em: <http://www.fao.org/aquastat/en/geospatial-information/global-maps-irrigated-areas/irrigation-by-country/country/BRA>. Acesso em: 16 ago. 2019.

FERRIE, G. M. et al. Nutrition and Health in Amphibian Husbandry. **Zoo Biology**, v. 33, n. 6, p. 485–501, 2014.

FRANCO-BELUSSI, L.; DE OLIVEIRA, C. The spleen of *Physalaemus nattereri* (Amphibia: Anura): morphology, melanomacrophage pigment compounds and responses to α -melanocyte stimulating hormone. **Italian Journal of Zoology**, v. 83, n. 3, p. 298–305, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/11250003.2016.1194488> .

FRANCO-BELUSSI, L. et al. Idiosyncratic liver pigment alterations of five frog species in response to contrasting land use patterns in the Brazilian Cerrado. **PeerJ**, v. 8, p. e9751, 26 ago. 2020. Disponível em: <https://peerj.com/articles/9751> .

FREITAS, B. M. C.; BOMBARDI, L. M. A política nacional de irrigação e o uso de agrotóxicos no Brasil: contaminação e intoxicações no Ceará. **GEOgraphia**, v. 20, n. 43, p. 86, 16 out. 2018. Disponível em: <http://periodicos.uff.br/geographia/article/view/27213>. Acesso em: 26 out.2019.

FRIZZO, S. J. **Elementos químicos (metais pesados) em águas de abastecimento público no Estado do Ceará**. CPRM. Serviço Geológico do Brasil, 2006. Disponível em <https://rigeo.cprm.gov.br/xmlui/handle/doc/10014> .

FROST, D. Amphibian Species of the World. **American Museum of Natural History**. Available: <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/>. Accessed: 12 Out.2020.

FRY, M.M.; McGAVIN, M.D. Bone marrow, blood cells and lymphatic system. In: ZACCHARY, J.; McGAVIN, M.D. Eds., **Pathology basis of veterinary medicine**, 5th, Elsevier Mosby, Saint Louis, 2012, p. 698 – 770.

GALBIATI, V. et al. Immune and Nervous Systems Interaction in Endocrine Disruptors Toxicity: The Case of Atrazine. **Frontiers in Toxicology**, v. 3, 10 mar. 2021. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/ftox.2021.649024/full> .

GALTON, V. A. The role of thyroid hormone in amphibian metamorphosis. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 3, n. 3, p. 96–100, abr. 1992. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/1043276092900202> .

GAMA, A. F.; OLIVEIRA, A. H. B.; CAVALCANTE, R. M. Inventário de agrotóxicos e risco de contaminação química dos recursos hídricos no semiárido cearense. **Química Nova**, v. 36, n. 3, p. 462–467, 2013.

GANESH, B. *et al.* Epidemiology and pathobiology of SARS-CoV-2 (COVID-19) in comparison with SARS, MERS: An updated overview of current knowledge and future perspectives. **Clinical Epidemiology and Global Health**, v. 10, p. 100694, abr. 2021. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213398420302645> .

GANNON, A. L. et al. Androgen receptor signalling in the male adrenal facilitates X-zone regression, cell turnover and protects against adrenal degeneration during ageing. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–16, 2019.

GATTO, L. C. S. **DIAGNÓSTICO AMBIENTAL DA BACIA DO RIO JAGUARIBE**. Salvador: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 1999. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv95788.pdf> .

GAY, F. et al. Chronic exposure to cadmium disrupts the adrenal gland activity of the newt *Triturus carnifex* (Amphibia, Urodela). **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

GENCHI, G. et al. Mercury Exposure and Heart Diseases. **International journal of environmental research and public health**, v. 14, n. 1, 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28085104> .

GILOR, C. et al. Loss of sympathetic innervation to islets of Langerhans in canine diabetes and pancreatitis is not associated with insulinitis. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–9, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76091-5> .

GIMENO-GARCÍA, E.; ANDREU, V.; BOLUDA, R. Heavy metals incidence in the application of inorganic fertilizers and pesticides to rice farming soils. **Environmental Pollution**, v. 92, n. 1, p. 19–25, 1996. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0269749195000909> .

GONDIM, P. M.; RODRIGUES, J. F. M.; CASCON, P. Fluctuating asymmetry and organosomatic indices in anuran populations in agricultural environments in semi-arid Brazil. **Herpetological Conservation and Biology**, v. 15, n. 2, p. 354–366, 2020.

GONDIM, P.M. **Indicadores de estresse ambiental em populações de *Leptodactylus macrosternum* (Leptodactylidae) e *Scinax x-signatus* (Hylidae) em ambientes agrícolas no semi-árido brasileiro**. 2021. 109 f. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2021. Disponível em <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/64380> .

GOULET, B. N.; HONTELA, A. Toxicity of cadmium, endosulfan, and atrazine in adrenal steroidogenic cells of two amphibian species, *Xenopus laevis* and *Rana catesbeiana*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 22, n. 9, p. 2106, 2003. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1897/02-255> .

GRECO, D. S.; STABENFELDT, G. H. Endocrine glands and their function. In: KLEIN, B. G. (Ed.). **Cunningham's Textbook of Veterinary Physiology**. 5th. ed. Saint Louis: Saunders Elsevier, 2013. p. 374-407.

GUILMETTE, J.; SADOW, P. M. Parathyroid Pathology. **Surgical Pathology Clinics**, v. 12, n. 4, p. 1007–1019, dez. 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1875918119300625> .

GUPTA, R.C. **Veterinary Toxicology – Basic and clinical principles**. 1st. ed. Academic Press, 2007. 1201p.

HARVEY, P. W. Adrenocortical endocrine disruption. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 155, p. 199–206, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.10.009> .

HAYES, T. B. et al. (2002). Feminization of male frogs in the wild. *Nature*, 419, 895-900.

HEGDE, G.; KRISHNAMURTHY, S. V. Analysis of health status of the frog *Fejervarya limnocharis* (Anura: Ranidae) living in rice paddy fields of Western Ghats, using body condition factor and AChE content. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 9, n. 1, p. 69–76, 2014. Disponível em: <http://ecotoxbrasil.org.br/upload/d66a21b34f482ba724275b1fcdd4c314-009-eec-5203-69-76.pdf> .

HERNROTH, B.; TASSIDIS, H.; BADEN, S. P. Immunosuppression of aquatic organisms exposed to elevated levels of manganese: From global to molecular perspective. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 104, p. 103536, mar. 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0145305X19304859>

HEYER, R. et al. 2008. *Leptodactylus ocellatus*. **IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2010.2.: IUCN 2010. < www.iucnredlist.org>.

HINSON, J. P.; RAVEN, P. W. Effects of endocrine-disrupting chemicals on adrenal function. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 20, n. 1, p. 111–120, mar. 2006. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1521690X05000734> .

HOFFMAN, D. J. Wildlife Toxicity Testing. In: HOFFMAN, D. J. et al. (Ed.). **Handbook of Ecotoxicology**. 2nd Ed ed. Boca Raton: Lewis Publishers, 2003. p. 75-110.

HOLMES, S. J. Internal secretion and the ductless glands. In: **The biology of the frog**. 3rd. ed. New York: The MacMillan Company, 1924. p. 219–228.

HOLT, E.; MILLER, S. Bioindicators: Using Organisms to Measure Environmental Impacts. **Nature Education Knowledge**, v. 3, n. 10, p. 8, 2010. Disponível em: <https://www.nature.com/scitable/knowledge/library/bioindicators-using-organisms-to-measure-environmental-impacts-16821310/> .

HOOSE, S. B. Cadmium. In: GUPTA, R. C. (Ed.). **Veterinary Toxicology. Basic and Clinical Principles**. New: Academic Press, 2007. p. 421–426.

IBRAHIM, K. S. et al. Effect of Occupational Cadmium Exposure on Parathyroid Gland. **Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences**, v. 4, n. 2, p. 302–306, 21

mar. 2016. Disponível em: <https://www.id-press.eu/mjms/article/view/oamjms.2016.042> .

IDOWU, E. T. et al. Heavy metal bioaccumulation and biomarkers of oxidative stress in the wild African tiger frog, *Hoplobatrachus occipitalis*. **African Journal of Environmental Science and Technology**, v. 8, n. 1, p. 6–15, 2014.

ILYUSHINA, N. et al. Maximum tolerated doses and erythropoiesis effects in the mouse bone marrow by 79 pesticides' technical materials assessed with the micronucleus assay. **Toxicology reports**, v. 6, p. 105–110, 2019. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30622904> .

INMETRO. **Guidance in validation of analytical methods (in Portuguese)**Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. [s.l.: s.n.]. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_05.pdf .

JOBLING, S.; TYLER, C. R. Endocrine disruption, parasites and pollutants in wild freshwater fish. **Parasitology**, v. 126, n. SUPPL., p. 2–7, 2003.

JOFRÉ, M. B.; ANTÓN, R. I.; CAVIEDES-VIDAL, E. Lead and cadmium accumulation in anuran amphibians of a permanent water body in arid Midwestern Argentina. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, n. 7, p. 2889–2897, 17 ago. 2012. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s11356-012-0795-2> .

JOHNSON, V. J.; TSUNODA, M.; SHARMA, R. P. Increased Production of Proinflammatory Cytokines by Murine Macrophages Following Oral Exposure to Sodium Selenite But Not to Seleno-L-Methionine. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 39, n. 2, p. 243–250, 1 ago. 2000. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s002440010101> .

JOHNSSON, R. M. F.; KEMPER, K. **Institutional and policy analysis of river basin management: the Jaguaribe river basin, Ceara, Brazil**. The World Bank, 2005. Disponível em: <http://elibrary.worldbank.org/doi/book/10.1596/1813-9450-3649>. Acesso em: 21 set. 2019.

JONES, H. B.; NUGENT, D.; JENKINS, R. Variation in characteristics of islets of Langerhans in insulin-resistant, diabetic and non-diabetic-rat strains. **International**

Journal of Experimental Pathology, v. 91, n. 3, p. 288–301, 1 abr. 2010. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2613.2010.00713.x> .

JOSENDE, M. E. et al. Genotoxic evaluation in two amphibian species from Brazilian subtropical wetlands. **Ecological Indicators**, v. 49, p. 83–87, fev. 2015. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1470160X14004877> .

KATAOKA, C.; KASHIWADA, S. Ecological Risks Due to Immunotoxicological Effects on Aquatic Organisms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 15, p. 8305, 2 ago. 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/15/8305> .

KUIWA, T. S. et al. Determination of Heavy Metals in *Hoplobatrachus occipitalis* (Crowned Bullfrogs) and Water from Some Reservoirs in Kadawa Irrigation Project Kano, Nigeria. **Journal of Applied Sciences and Environmental Management**, v. 23, n. 12, p. 2131, 2020.

LA PERLE, K.M.D. Endocrine System. In: ZACHARY, J.F.; MCGAVIN, M.D. (Eds) **Pathological Basis of Veterinary Diseases**, 5th Edit, Elsevier Mosby, p. 660-697.

LACERDA, L. D. et al. Mercury Emission Factors from Intensive Shrimp Aquaculture and Their Relative Importance to the Jaguaribe River Estuary, NE Brazil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 87, n. 6, p. 657–661, 16 dez. 2011. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00128-011-0399-4> .

LACERDA, L. D. et al. Mercury in Indigenous, Introduced and Farmed Fish from the Semiarid Region of the Jaguaribe River Basin, NE Brazil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 93, n. 1, p. 31–35, 12 jul. 2014. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00128-014-1263-0> .

LACERDA, L. D. et al. Pluriannual Watershed Discharges of Hg into a Tropical Semi-Arid Estuary of the Jaguaribe River, NE Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2013. Disponível em: <http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/0103-5053.20130216> .

LACERDA, L. et al. **Contaminação por metais pesados e pesticidas nas bacias inferiores dos Rios Curimataú e Açu (RN) e Rio Jaguaribe (CE)**. Associação Brasileira dos Criadores de Camarão (ABCC), editors. Sociedade Internacional para Ecossistemas de Manguezal do Brasil (ISME/BR); Instituto de Ciências do Mar

(LABOMAR-UFC); Associação Brasileira dos Criadores de Camarão (ABCC). Fortaleza; 2004. 1–59 p. Disponível em: https://abccam.com.br/wp-content/uploads/2011/02/Metais_Pesados_ABCC.pdf

LACERDA, L.D.; MARINS, R.V.; CAVALCANTE, M.S. Mercury mobilization due to global climate and regional land use changes in the Jaguaribe River Estuary, NE Brazil. 2017, p. 349-360. In: BOTELLO AV, VILLANUEVA S, GUTIÉRREZ J, ROJAS GALAVIZ, JL (eds.). **Vulnerabilidad de las zonas costeras de Latinoamérica al cambio climático**. UJAT, UNAM, UAC. 476 p. Disponível em: <https://www.redicomar.com/wp-content/uploads/2018/10/Vulnerabilidad-de-las-Zonas-Costeras-de-Latinoame%CC%81rica-al-Cambio-Clima%CC%81tico.pdf> .

LATINI, G. et al. Endocrine Disruptors and Human Health. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 9, p. 846–855, 1 ago. 2010. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-5575&volume=10&issue=9&spage=846>>.

LAURENSEN, M. P. et al. Concurrent Diseases and Conditions in Dogs with Splenic Vein Thrombosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 24, n. 6, p. 1298–1304, nov. 2010. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.2010.0593.x> .

LEAL, I. R. et al. Mudando o curso da conservação da biodiversidade na Caatinga do Nordeste do Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 139–146, 2005.

LEATHERLAND, J. F. et al. Thyroid Hormone Content of Eggs and Early Developmental Stages of Three Stocks of Goitred Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*) from the Great Lakes of North America, and a Comparison with a Stock from British Columbia. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 46, n. 12, p. 2146–2152, 1 dez. 1989. Disponível em: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/f89-265> .

LEATHERLAND, J. F. Field Observations on Reproductive and Developmental Dysfunction in Introduced and Native Salmonids from the Great Lakes. **Journal of Great Lakes Research**, v. 19, n. 4, p. 737–751, jan. 1993. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0380133093712629> .

LEATHERLAND, J. F.; SONSTEGARD, R. A. Bioaccumulation of organochlorines by yearling coho salmon (*Oncorhynchus kisutch* Walbaum) fed diets containing great lakes' coho salmon, and the pathophysiological responses of the recipients. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology**, v. 72, n. 1, p. 91–99, jan. 1982. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/030644928290209X> .

LEE, J. S.; WHITE, K. L. A review of the health effects of cadmium. **American journal of industrial medicine**, v. 1, n. 3–4, p. 307–17, 1980. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7044111> .

LEEMANS, M. et al. Pesticides With Potential Thyroid Hormone-Disrupting Effects: A Review of Recent Data. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, 9 dez. 2019. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2019.00743/full> .

LEGADO BRASIL. **Lei das Águas assegura a disponibilidade do recurso no País**. 20 out. 2010. Disponível em: <http://legado.brasil.gov.br/noticias/meioambiente/2010/10/lei-das-aguas-assegura-a-disponibilidade-do-recurso-no-pais>. Acesso em: 25 Out. 2019.

LIM, K.-M. et al. Low-Level Mercury Can Enhance Procoagulant Activity of Erythrocytes: A New Contributing Factor for Mercury-Related Thrombotic Disease. **Environmental Health Perspectives**, v. 118, n. 7, p. 928–935, jul. 2010. Disponível em: <https://ehp.niehs.nih.gov/doi/10.1289/ehp.0901473> .

LIMA, A. O. Polo de Inovação terá foco no Baixo Jaguaribe. **Diário do Nordeste**, 2013. Disponível em: <https://diariodonordeste.verdesmares.com.br/negocios/polo-de-inovacao-tera-foco-no-baixo-jaguaribe-1.478867> . Acesso em 23 set. 2021.

LIN, J. et al. A novel mechanism underlies atrazine toxicity in quails (*Coturnix Coturnix coturnix*): triggering ionic disorder via disruption of ATPases. **Oncotarget**, v. 7, n. 51, p. 83880–83892, 20 dez. 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27924060>.

LINZEY, D. et al. Role of environmental pollutants on immune functions, parasitic infections and limb malformations in marine toads and whistling frogs from Bermuda. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 13, n. 2, p. 125–148,

jun. 2003. Disponível em:
<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/0960312031000098053> .

LIU, L.S. et al. Research proceedings on amphibian model organisms. **Dongwuxue Yanjiu**, 37, 4, 2016, pp. 237-245.

LOPES, D.V. **Acúmulo de metais traço cobre (Cu) e zinco (Zn) em viveiros de cultivo de camarão (Litopenaeus vannamei)**. 2006. 86 f. Fortaleza. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) – Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, 2006. Disponível em <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/1364>

LOUMBOURDIS, N. S.; WRAY, D. Heavy-metal concentration in the frog *Rana ridibunda* from a small river of Macedonia, Northern Greece. **Environment International**, v. 24, n. 4, p. 427–431, 1998.

MAGALHÃES, F. M. et al. Taxonomic Review of South American Butter Frogs: Phylogeny, Geographic Patterns, and Species Delimitation in the *Leptodactylus latrans* Species Group (Anura: Leptodactylidae). **Herpetological Monographs**, v. 34, n. 1, 11 dez. 2020. Disponível em: <https://bioone.org/journals/herpetological-monographs/volume-34/issue-1/0733-1347-31.4.131/Taxonomic-Review-of-South-American-Butter-Frogs--Phylogeny-Geographic/10.1655/0733-1347-31.4.131.full> .

MARQUES, S. M. et al. Antioxidant response and metal accumulation in tissues of Iberian green frogs (*Pelophylax perezi*) inhabiting a deactivated uranium mine. **Ecotoxicology**, v. 20, n. 6, p. 1315–1327, 2011.

McBIRNEY, M. et al. Atrazine induced epigenetic transgenerational inheritance of disease, lean phenotype and sperm epimutation pathology biomarkers. **PloS one**, v. 12, n. 9, p. e0184306, 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28931070> .

McDANIEL, T. V. et al. Potential endocrine disruption of sexual development in free ranging male northern leopard frogs (*Rana pipiens*) and green frogs (*Rana clamitans*) from areas of intensive row crop agriculture. **Aquatic Toxicology**, v. 88, n. 4, p. 230–242, jul. 2008. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166445X08001495> .

MELANCON, M. J. Bioindicators of Contaminant Exposure and Effect in Aquatic and Terrestrial Monitoring. In: HOFFMAN, D. J. et al. (Ed.). **Handbook of Ecotoxicology**. 2nd Ed ed. Boca Raton: Lewis Publishers, 2003. p. 257-278.

MERHI, M. et al. Occupational exposure to pesticides and risk of hematopoietic cancers: Meta-analysis of case-control studies. **Cancer Causes and Control**, v. 18, n. 10, p. 1209–1226, 2007.

MILES, J. C. et al. Effects of clothianidin on aquatic communities: Evaluating the impacts of lethal and sublethal exposure to neonicotinoids. **PloS one**, v. 12, n. 3, p. e0174171, 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28334022> .

MILHOME, M. A. L. et al. Avaliação do potencial de contaminação de águas superficiais e subterrâneas por pesticidas aplicados na agricultura do Baixo Jaguaribe, CE. **Eng Sanit Ambient**, v. 14, n. 3, p. 363–372, 2009.

MILHOME, M. A. L. et al. Influence the use of pesticides in the quality of surface and groundwater located in irrigated areas. **International Journal of Environment Research**, v. 9, n. 1, p. 255–262, 2015.

MIRANDA, M. et al. Metal accumulation in cattle raised in a serpentine-soil area: Relationship between metal concentrations in soil, forage and animal tissues. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 23, n. 3, p. 231–238, jul. 2009. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0946672X09000327> .

MONTALVÃO, M. F. et al. Impacts of tannery effluent on development and morphological characters in a neotropical tadpole. **Science of The Total Environment**, v. 610–611, p. 1595–1606, jan. 2018. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969717315383> .

MORESCO, R. M.; MARGARIDO, V. P.; DE OLIVEIRA, C. A persistent organic pollutant related with unusual high frequency of hermaphroditism in the neotropical anuran *Physalaemus cuvieri* Fitzinger, 1826. **Environmental Research**, v. 132, p. 6–11, jul. 2014. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0013935114000759> .

MOURA, V. L.; COSTA, B. G. B.; LACERDA, L. D. Distribuição de mercúrio na fauna estuarina do Rio Jaguaribe - CE. **Arquivos de Ciências do Mar**, v. 51, n. 1, p. 49, 11

set. 2018. Disponível em: <http://www.periodicos.ufc.br/arquivosdecienciadomar/article/view/32972> .

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). **PubChem Element Summary for Metals**. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/#query=metals>. Accessed Sept. 12, 2021.

NATIONAL POLLUTANT DISCHARGE ELIMINATION SYSTEM (NPDES). United States Environmental Protection Agency. Disponível em: <https://www.epa.gov/npdes>. Acesso em 5 Fev. 2022.

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM (NTP). US. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. **Nonneoplastic Lesion Atlas**. 2018. Disponível em: <https://ntp.niehs.nih.gov/nnl/index.htm> . Acesso em: 10 mar. 2018.

NAVARATNE, A.; JAYAWARDENA, U.; RAJAKARUNA, R. Toxicity of Propanil , Glyphosate , Chlopyrifos and Dimethoate on Asian Common Toad (*Duttaphrynus melanostictus*) and Common Hourglass Tree Frog (*Polypedates cruciger*) Empirical evide ... Toxicity of Propanil , Glyphosate , Chlopyrifos and Dimethoate on. In: SETAC Asia Pacific Conference, September, Adelaide. **Anais...** Adelaide: 2014.

NG, T. B.; W. K. LIU. Toxic Effect of Heavy Metals on Cells Isolated from the Rat Adrenal and Testis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v.26, n. 1, Society for In Vitro Biology, 1990, pp. 24–28. Disponível em: <http://www.jstor.org/stable/4296385> .

NOBRE, M. E. da S. et al. Hydrochemical-environmental study of the low Jaguaribe alluvial aquifer, itaiçaba - Ceará. **Revista do Instituto Geológico**, v. 39, n. 3, p. 77–92, 2018.

NORRIS, D. O.; CARR, J. **Vertebrate Endocrinology**. 5th. ed. London: Academic Press, 2013.

O'DELL, B. L. The concept of trace element antagonism: the Cu-Mo-S triangle (Dick, 1952-1954). **The Journal of nutrition**, v. 127, n. 5 Suppl, p. 1045S-1047S, maio 1997. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9164304> .

O'NEAL, S. L.; ZHENG, W. Manganese Toxicity Upon Overexposure: a Decade in Review. **Current environmental health reports**, v. 2, n. 3, p. 315–328, 2015.

OLIVEIRA, A. H. B. et al. The legacy of organochlorine pesticide usage in a tropical semi-arid region (Jaguaribe River, Ceará, Brazil): Implications of the influence of sediment parameters on occurrence, distribution and fate. **Science of the Total Environment**, v. 542, p. 254–263, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.10.058> .

OLIVEIRA, C. et al. Use of Melanin-pigmented Cells as a New Tool to Evaluate Effects of Agrochemicals and Other Emerging Contaminants in Brazilian Anurans. In: LARRAMENDY, M. (Ed.). **Ecotoxicology and Genotoxicology: Non-traditional Terrestrial Models**. Section II: Terrestrial Vertebrates as Experimental Models Chapter 6. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2017. p. 123–142.

OLIVEIRA, F. É. R.; UCHÔA, H.S. Gestão da sub-bacia hidrográfica do Alto Jaguaribe, no gerenciamento do comitê de 2006 a 2010. **Revista Verde de Agroecologia e ...**, n. 2010, 2013. Disponível em: <http://gvaa.com.br/revista/index.php/RVADS/article/view/1871> .

OLSSON, A. C. et al. Occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and lung cancer risk: a multicenter study in Europe. **Occupational and environmental medicine**, v. 67, n. 2, p. 98–103, fev. 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19773276> .

OSHIRO, J. **Why save amphibians?** Disponível em: <<https://amphibiaweb.org/declines/conservation.html#whysave>>. Acesso em: 20 jul. 2021.

PANTALENA, A. F.; MAIA, L. P. Marcas da ação antrópica na história ambiental do Rio Jaguaribe, Ceará, Brasil. **Revista de Gestão Costeira Integrada**, v. 14, n. 3, p. 459–468, 2014.

PARKER, V. G. et al. Toxins and Diabetes Mellitus: An Environmental Connection? **Diabetes Spectrum**, v. 15, n. 2, p. 109–112, 1 abr. 2002. Disponível em: <http://spectrum.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/diaspect.15.2.109> .

PAULA, C. D. **Patologia comparada de infecções selecionadas de anfíbios anuros de vida livre do bioma da Mata Atlântica**: estudo prospectivo. 2011. Tese (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011. doi:10.11606/T.10.2011.tde-19102012-154735. Acesso em: 2022-02-05.

PEREIRA, G. R.; CUELLAR, M. D. Z. Conflitos pela água em tempos de seca no Baixo Jaguaribe, Estado do Ceará. **Estudos Avançados**, v. 29, n. 84, p. 115–137, ago. 2015. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010340142015000200115&lng=pt&tlng=pt. Acesso em: 26 out.2019.

PERES, T.F. **Influência da biota na acumulação de metais pesados nos sedimentos superficiais do estuário do rio Jaguaribe, praia de Ponta Grossa e praia de Arpoeira, Ceará**. 2012. 87 f. Fortaleza. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) – Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, 2012. Disponível em <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/11468>

PICCOLI, C. et al. Occupational exposure to pesticides and hematological alterations: A survey of farm residents in the South of Brazil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 24, n. 6, p. 2325–2340, 2019.

PINHEIRO, A. I. et al. Theoretical estimate and multiresidue analyze using spme-gc-it/ms/ms for management of pesticides in water of the rural zone of Ceará, Brazil. **Revista Aidis**, v. 9, n. 3, p. 386–398, 2016. Disponível em: <http://www.revistas.unam.mx/index.php/aidis/article/view/53653> .

PIUBELLI, M. L. M.; CLEMENTE, L. C.; DUARTE, A. N. Gamna-Gandy bodies of the spleen in sickle cell disease. **Autopsy and Case Reports**, v. 9, n. 2, 2019. Disponível em: <http://www.autopsyandcasereports.org/article/doi/10.4322/acr.2018.076> .

PLUM, L. M.; RINK, L.; HAASE, H. The essential toxin: impact of zinc on human health. **International journal of environmental research and public health**, v. 7, n. 4, p. 1342–65, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20617034> .

POURRET, O.; HURSTHOUSE, A. It's time to replace the term "heavy metals" with "potentially toxic elements" when reporting environmental research. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 22, 2019.

PROKIĆ, M. D. et al. Bioaccumulation and effects of metals on oxidative stress and neurotoxicity parameters in the frogs from the Pelophylax esculentus complex. **Ecotoxicology**, v. 25, n. 8, p. 1531–1542, 15 out. 2016. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10646-016-1707-x> .

PULSFORD, S. A.; LINDENMAYER, D. B.; DRISCOLL, D. A. Reptiles and frogs conform to multiple conceptual landscape models in an agricultural landscape. **Diversity and Distributions**, v. 23, n. 12, p. 1408–1422, 2017.

QURESHI, I. Z. et al. Assessment of heavy metals and metalloids in tissues of two frog species: *Rana tigrina* and *Euphlyctis cyanophlyctis* from industrial city Sialkot, Pakistan. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 18, p. 14157–14168, 2015. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s11356-015-4454-2> .

R CORE TEAM (2021). R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>

RELYEA, R. A. Growth and survival of five amphibian species exposed to combinations of pesticides. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, n. 7, p. 1737–1742, 2004.

REQUENA, M. et al. Environmental exposure to pesticides and risk of thyroid diseases. **Toxicology Letters**, v. 315, p. 55–63, out. 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378427419302310> .

REZAZADEH, S. et al. Mineral chemistry and phase relations of Co–Ni arsenides and sulfarsenides from the Baycheh-Bagh deposit, Zanjan province, Iran. **Ore Geology Reviews**, v. 127, p. 103836, dez. 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169136820310210> .

RICHARDSON, J. R. et al. Elevated serum pesticide levels and risk of Parkinson disease. **Archives of neurology**, v. 66, n. 7, p. 870–5, jul. 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19597089> .

RIGOTTO, R. M. et al. Trends of chronic health effects associated to pesticide use in fruit farming regions in the state of Ceará, Brazil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 16, n. 3, p. 763–773, 2013.

RIGOTTO, R.; PESSOA, V.M. Epidemiological study of the lower Jaguaribe Region population exposed to environmental contamination in the area of pesticides. **Actas em Saúde Coletiva**, v. 4, n. 4, p. 142–143, 2009.

ROHR, J.R. et al. Exposure, postexposure, and density-mediated effects of atrazine on amphibians: breaking down net effects into their parts. **Environmental Health Perspectives**, v.114, n.1, 2006, p. 46-50. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1332655/> .

ROJAS-HUCKS, S. et al. *Xenopus laevis* as a bioindicator of endocrine disruptors in the region of central Chile. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 77, n. 3, p. 390–408, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00244-019-00661-6> .

ROLLINS-SMITH, L.; SMITS, J. Amphibian models and approaches to immunotoxicology. In: TRYPHONAS, H. et al. (Ed.). **Investigative Immunotoxicology**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2005. p. 89–105.

ROONEY, A. A.; BERMUDEZ, D. S.; GUILLETTE, L. J. Altered histology of the thymus and spleen in contaminant-exposed juvenile American alligators. **Journal of Morphology**, v. 256, n. 3, p. 349–359, jun. 2003. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jmor.10090> .

RYSEFF, J. K. et al. Gamna-Gandy bodies: a case of mistaken identity in the spleen of a cat. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 43, n. 1, p. 94–100, mar. 2014. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/vcp.12114> .

SANTANA, D. J. et al. Anurans from the Middle Jaguaribe River Region, Ceará State, Northeastern Brazil. **Biota Neotropica**, v. 15, n. 3, jul. 2015. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-06032015000300201&lng=en&tlng=en .

SANTANA, V. P. et al. Long-term effects of perinatal exposure to low doses of cadmium on the prostate of adult male rats. **International Journal of Experimental**

Pathology, v. 97, n. 4, p. 310–316, 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27469444> .

SCHAEFFER, M. et al. Endocrine cells and blood vessels work in tandem to generate hormone pulses. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 47, n. 2, p. R59–R66, out. 2011. Disponível em: <https://jme.bioscientifica.com/view/journals/jme/47/2/R59.xml> .

SCHEELE, B. C. et al. Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity. **Science**, v. 363, n. 6434, p. 1459–1463, 29 mar. 2019. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aav0379> .

SEMENZA, J. C. et al. Reproductive toxins and alligator abnormalities at Lake Apopka, Florida. **Environmental Health Perspectives**, v. 105, n. 10, p. 1030–1032, out. 1997. Disponível em: <<https://ehp.niehs.nih.gov/doi/10.1289/ehp.971051030>>.

SHAJI, E. et al. Arsenic contamination of groundwater: A global synopsis with focus on the Indian Peninsula. **Geoscience Frontiers**, v. 12, n. 3, p. 101079, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.gsf.2020.08.015> .

SHARMA, B.; SINGH, S.; SIDDIQI, N. J. Biomedical Implications of Heavy Metals Induced Imbalances in Redox Systems. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–26, 2014. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/640754/> .

SILVA, P. C. G. et al. Caracterização do Semiárido brasileiro: fatores naturais e humanos. **Semiárido brasileiro: pesquisa, desenvolvimento e inovação. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2010.**, p. 18–48, 2010. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/861906>. Acesso em: 19 set. 2019.

SIMON, E. et al. Frogs and toads as biological indicators in environmental assessment. In: MURRAY, J.L. (Ed.). **Frogs: Biology, Ecology and Uses**. New York: Nova Science Publishers, Inc., 2011, p. 1-10.

SINGH, P.; DEY, M.; NARAYANA, S. A Study on Bioaccumulation of Heavy Metals in two Anuran Tadpoles: *Clinotarsus alticola* and *Leptobrachium smithi* from Rosekandy Tea Estate, Cachar, Assam. **Current World Environment**, v. 11, n. 1, p. 325–332, 2016.

SOARES, A. P.; WEBER, O. L. S.; ESPÍRITO SANTO, O. Metais pesados em calcários do estado de Mato Grosso. **Geociencias**, v. 34, n. 3, p. 465–474, 2015.

SOARES, T.C.M. **Variação sazonal, transporte e partição de hg no gradiente fluviomarinho do Rio Jaguaribe – CE**. 2011. 102 f. Fortaleza. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) – Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, 2011. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/14929>

SOUSA, A. S. et al. Estimated Levels of Environmental Contamination and Health Risk Assessment for Herbicides and Insecticides in Surface Water of Ceará, Brazil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 96, n. 1, p. 90–95, 2016.

SOUZA, R. M. et al. Occurrence, impacts and general aspects of pesticides in surface water: A review. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 135, p. 22–37, mar. 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0957582019318683> .

SPARLING, D.W. et al. Recent advancements in amphibian and reptile ecotoxicology. In: SPARLING, D.W. (Eds) **Ecotoxicology of amphibians and reptiles**, 2nd Ed. SETAC Press, Pensacola FL, 2010, p.1-12.

STEBBINS, R. C. E; COHEN, N. W. **A Natural history of amphibians**. Princeton University Press, New Jersey, 1997, 336p.

STUDART, R. S. **Valoração dos serviços ambientais associada à autodepuração da água do Rio Jaguaribe-CE em um cenário de mudanças climáticas**. 2013. 88f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil: Saneamento Ambiental)-Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/7975> .

SUN, Q. et al. Imidacloprid Promotes High Fat Diet-Induced Adiposity and Insulin Resistance in Male C57BL/6J Mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 49, p. 9293–9306, 14 dez. 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27960282> .

SUTTIE, A. W. Histopathology of the Spleen. **Toxicologic Pathology**, v. 34, n. 5, p. 466–503, 25 ago. 2006. Disponível em: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1080/01926230600867750> .

SWAMINATHAN, R. Magnesium metabolism and its disorders. **The Clinical biochemist. Reviews**, v. 24, n. 2, p. 47–66, maio 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18568054>>.

ŚWIETLICKA, I. et al. The effect of cadmium exposition on the structure and mechanical properties of rat incisors. **PLOS ONE**, v. 14, n. 4, p. e0215370, 12 abr. 2019. Disponível em: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0215370> .

TCHOUNWOU, P. B. et al. Heavy Metal Toxicity and the Environment. **EXS**, v. 101, p. 133–164, 2012. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-3-7643-8340-4_6

TELES, D. et al. *Leptodactylus macrosternum* (Rã-Caçote). Diet. **Herpetological Review**, v. 42, n. 2, p. 304, 2014.

TEIXEIRA FILHO, C. D. **Teores de metais pesados em alguns solos do estado do Ceará**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Solos e Nutrição de Plantas). Universidade Federal do Ceará, 2016, 75p. Disponível em: <https://repositorio.ufc.br/handle/riufc/21621>

THANOMSANGAD, P. et al. Heavy metal accumulation in frogs surrounding an e-waste dump site and human health risk assessment. **Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal**, v. 26, n. 5, p. 1313–1328, 27 maio 2020. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10807039.2019.1575181>

THOMPSON, L. J. Copper. In: GUPTA, R. C. (Ed.). **Veterinary Toxicology. Basic and Clinical Principles**. New York: Academic Press, 2007. p. 427–429.

THOMPSON, L. J. Lead. In: GUPTA, R. C. (Ed.). **Veterinary Toxicology. Basic and Clinical Principles**. New York: Academic Press, 2007. p. 438–441.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). Technical Support Document for Water Quality-Based Toxics Control. **Office of Water Regulation and Standards, Environmental Protection Agency**, Washington, D.C., EPA/505/2–90–001, 1991.

UNESCO. **The United Nations World Water Development Report 2019 - Leaving no one behind**. Paris: UNESCO, 2019. Disponível em

<https://www.unwater.org/publications/world-water-development-report-2019/>. Acesso em 25 Out. 2019.

UNIVERSITY OF CALIFORNIA. **Meet amphibians**. Disponível em: https://amphibiaweb.org/amphibian/amph_index.html . Acesso em: 20 jul. 2021.

UNWIN, J. et al. An assessment of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in the UK. **The Annals of occupational hygiene**, v. 50, n. 4, p. 395–403, jun. 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16551675> .

VALENTIM NETO, P.A. **Possíveis causas da mortalidade do Caranguejo-Uçá (*Ucides cordatus* LINNAEUS, 1763) no estuário do Rio Jaguaribe - Ceará**. 2004. 78 f. Fortaleza. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) – Instituto de Ciências do Mar – Universidade Federal do Ceará, 2004. Disponível em http://www.repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/17703/1/2004_dis_pavalentimneto.pdf

VAN DIJK, T. C.; VAN STAALDUINEN, M. A.; VAN DER SLUIJS, J. P. Macro-invertebrate decline in surface water polluted with imidacloprid. **PloS one**, v. 8, n. 5, p. e62374, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23650513> .

VENTURINO, A. et al. Biomarkers of effect in toads and frogs. **Biomarkers**, v. 8, n. 3–4, p. 167–186, 29 jan. 2003. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/1354700031000120116> .

VIANA, S.L. **Avaliação da toxicidade da água residuária da usina de beneficiamento da casca do coco verde em girinos de *Leptodactylus vastus* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae)**. 2010. 78 f. Dissertação (Mestrado em ecologia e recursos naturais)- Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2010. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/17162>

VICENTE-VILLARDON, J. L. **MultBiplotR: Multivariate Analysis Using Biplots in R**. R package version 1.3.30, 2021. Disponível em <<https://CRAN.R-project.org/package=MultBiplotR>>. Acesso em 1º jan. 2022.

WANG, Z. et al. Effects of Cadmium Exposure on the Immune System and Immunoregulation. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 20 jul. 2021. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.695484/full> .

WATER AID. **Beneath the Surface : The State of the World ' s Water 2019**. p. 24, 2019. Disponível em <https://washmatters.wateraid.org/publications/beneath-the-surface-the-state-of-the-worlds-water-2019>. Acesso em: 25 out. 2019.

WECKMAN, A. et al. Autophagy in the endocrine glands. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 52, p. R151–R163, 2014.

WEINAND, J.; KEMP, W. L. Pancreatic Islet Hyperplasia. **Academic Forensic Pathology**, v. 8, n. 3, p. 777–785, set. 2018. Disponível em: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1925362118797755> .

WOOD, L.; WELCH, A. M. Assessment of interactive effects of elevated salinity and three pesticides on life history and behavior of southern toad (*Anaxyrus terrestris*) tadpoles. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 34, n. 3, p. 667–676, mar. 2015. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/etc.2861> .

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Manganese. In: **Air Quality Guidelines**. 2nd. ed. Copenhagen: WHO, 2000. p. 154–156.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **What is One Health?** 2017. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/one-health> . Acesso em: 22 jul. 2021.

YEKTA, N.; BLACKBURN, D. G. Sexual dimorphism in mass and protein content of the forelimb muscles of the northern leopard frog, *Rana pipiens*. **Canadian Journal of Zoology**, v. 70, n. 4, p. 670–674, 1 abr. 1992. Disponível em: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/z92-100> .

ZAMORA-CAMACHO, F. J.; COMAS, M. Greater reproductive investment, but shorter lifespan, in agrosystem than in natural-habitat toads. **PeerJ**, v. 2017, n. 9, 2017. Disponível em: <https://peerj.com/articles/3791/> .

ZHELEV, Z. M. et al. In situ assessment of health status and heavy metal bioaccumulation of adult *Pelophylax ridibundus* (Anura: Ranidae) individuals inhabiting polluted area in southern Bulgaria. **Ecological Indicators**, v. 115, n. April, p. 106413, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106413> .

ZOCCHÉ, J. J. et al. Heavy-metal content and oxidative damage in *Hypsiboas faber*: The impact of coal-mining pollutants on amphibians. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 66, n. 1, p. 69–77, 2014.

ZUG, G. R.; VITT, L. J.; CALDWELL, J. P. **Herpetology an Introductory biology of Amphibians and Reptiles**. Academic Press, Florida, 2001, 644p.

9. ANEXOS

9.1. Anexo 1



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 58724-1	Data da Emissão: 29/06/2017 14:58	Data para Revalidação*: 29/07/2018
* De acordo com o art. 26 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Patrícia de Menezes Gondim	CPF: 866.734.833-34
Título do Projeto: Determinação de anuros bioindicadores de estresse ambiental em ecossistemas agrícolas em área de caatinga	
Nome da Instituição: UFC - UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ	CNPJ: 07.272.636/0001-31

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta	07/2017	08/2017

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para Importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/gen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	TABULEIRO DO NORTE	CE	zona rural	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Leptodactylus macrosternum ("Qtde: 30), Scinax x-signatus ("Qtde: 30)

* Quantidade de indivíduos por espécie, por localidade ou unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Método de captura/coleta (Anfíbios)	Captura manual
---	-------------------------------------	----------------

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UFC - UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ	colecção

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 28295464



Página 1/3



XXV SEMANA CIENTÍFICA BENJAMIN EURICO MALUCELLI JUBILEU DE RUBI

Certificamos que o resumo “ALTERAÇÕES MORFOFISIOLÓGICAS EM TECIDOS HEMATOPOIÉTICO, LINFOIDE E ENDÓCRINO EM DUAS ESPÉCIES DE ANUROS DE ÁREAS PRESERVADAS E CULTIVADAS NO ESTADO DO CEARÁ – PROJETO E RESULTADOS PRELIMINARES”, de autoria de “ROBERTA DA ROCHA BRAGA, PATRÍCIA MENEZES GONDIM, GISLAINE TAIMARA DALAZEN, ELIANA REIKO MATUSHIMA” foi apresentado na forma de pôster, na **XXV Semana Científica Benjamin Eurico Malucelli - Jubileu de Rubi**, realizada nos dias 8 a 10 de outubro de 2018, no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Prof. Dr. Frederico Azevedo da Costa Pinto
Coordenador do Evento

Prof. Dr. Paulo César Maiorka
Coordenador do Evento

9.2. Anexo 2









La Sección Latinoamericana de la Wildlife Disease Association otorga el siguiente certificado por su participación en la:
IV CONFERENCIA BIENAL de la Sección Latinoamérica – WDA

Con la ponencia tipo cartel:
Reproductive alterations in Scinax x-signatus (Anura: Hylidae) in agriculture ecosystems in northeastern Brazil

A los autores:
Roberta da Rocha Braga, Patricia Menezes Gondim, Daniel de Araujo Viana, Eliana Reiko Matushima

Celebrada del 16 al 18 de julio de 2019, San José, Costa Rica, duración 19 horas


 Gerardo Suzán
 Presidente de WDA-LA


 Andrea Chaves
 Coordinadora del Comité Organizador Local

9.4. Anexo 4

Disponível em <https://actascientific.com/ASVS/ASVS-03-0179.php>



ACTA SCIENTIFIC VETERINARY SCIENCES (ISSN: 2582-3183)

Volume 3 Issue 8 August 2021

Opinion

What can Amphibians Tell us about Environmental Health?

Roberta da Rocha Braga*

Comparative and Experimental Pathology Post-Graduation Program, University of São Paulo, São Paulo / Academic Laboratory of Wildlife Pathology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil

***Corresponding Author:** Roberta da Rocha Braga, Academic Laboratory of Wildlife Pathology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil

Received: June 22, 2021

Published: July 14, 2021

© All rights are reserved by **Roberta da Rocha Braga**.

Amphibians are a fascinating class of Vertebrate animals with a double life, relying on the water during their "infancy" to metamorphose into terrestrial adult ones. More than eight thousand species are reported worldwide, and the order Anura (frogs and toads) makes up ninety percent of the total [1].

Why must we worry about amphibians conservation?

In most people's daily lives, including the veterinarians, amphibians represent a distant and unfamiliar animal group of unknown or neglected importance. However, they are critical, both for the environment, within the ecological networks, as regulators of the food web; and for humans as producers of biomolecules, as cultural patrimony, as bioindicators, and recently as pets [2].

Bioindicators are any living organisms, which are used for assessing natural ecosystem health. Due to industrial waste, air pollution, contamination of the water and soils, poor agricultural practices, and forest degradation, many changes have reached the diversity, richness, and physical health of several animal species [3]. These parameters provide information about a global health situation, as the "One Health" concept has lately taught us [4]. Then, different taxa contribute with indications of good or bad fitness of their specific environment. Amphibians play a crucial role in this context, working as bioindicators equally for freshwater and terrestrial environments [5].

In the last three decades, scientists have worried about the decline of amphibian populations around the world. The first causal hypothesis was their habitat losses due to deforestation, but it was not enough to explain why amphibian populations declined even in remote places of the Earth. Some time later, researchers con-

cluded that *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd), a fungal organism considered benign to soil and plants, was causing lethal skin infection in many amphibian species. Bd is now designed as the most destructive pathogen for biodiversity ever documented, responsible for the decline or extinction of more than five hundred amphibian species [6].

Beyond the amphibian health strictly, Bd panzootic shows us a scenario somewhat similar to the currently Sars-Cov2 pandemic: 1) an organism which is worldwide distributed but whose pathogenic strains spread from Asia through global trade/travelling; 2) highly transmissible among multiple hosts and relatively stable; 3) well adapted to its hosts and able to spread from its tolerant/asymptomatic reservoirs. Moreover, like many other emergent diseases, it can have been triggered and supported by environmental and climate changes [6,7].

This situation configures a single perspective of many possibilities of health disasters involving wildlife, the natural environment, and emergent diseases.

For these reasons, we should observe, take care and preserve the amphibians. They are a very efficient mirror of the environmental health status, and their living or dying can help us drive essential decisions about public health. Wildlife and exotic pet veterinarians are welcome to join this cause and contribute to preserving the global One Health.

Bibliography

1. "Meet Amphibians". AmphibiaWeb. University of California, Berkeley, CA, USA (2021).

What can Amphibians Tell us about Environmental Health?

19

2. Oshiro J. "Why save amphibians?". AmphibiaWeb. University of California, Berkeley, CA, USA (2021).
3. Holt EA and Miller SW. "Bioindicators: Using Organisms to Measure Environmental Impacts". *Nature Education Knowledge* 3.10 (2010): 8.
4. WHO. "What is One Health?". World Health Organization (2017).
5. Venturino A., et al. "Biomarkers of effect in toads and frogs". *Biomarkers* 8.3-4 (2003): 167-186.
6. Scheele BC., et al. "Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity". *Science* 363.6434 (2019): 1459-1460.
7. Ganesh B., et al. "Epidemiology and pathobiology of SARS-CoV-2 (COVID-19) in comparison with SARS, MERS: An updated overview of current knowledge and future perspectives". *Clinical Epidemiology and Global Health* 10 (2021): 100694.

Volume 3 Issue 8 August 2021

© All rights are reserved by Roberta da Rocha Braga.

9.5. Anexo 6

Disponível em <https://periodicos.ufrn.br/revistadoregne/article/view/24607>

ISSN: 2447-3359

REVISTA DE GEOCIÊNCIAS DO NORDESTE

Northeast Geosciences Journal

v. 7, n° 2 (2021)

<https://doi.org/10.21680/2447-3359.2021v7n2ID24607>

VALE DO JAGUARIBE: UM OÁSIS EM PERIGO NO SEMIÁRIDO BRASILEIRO – REVISÃO SISTEMÁTICA SOBRE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL E POTENCIAIS DANOS À BACIA E SEUS USUÁRIOS

Roberta da Rocha Braga¹; Eliana Reiko Matushima²

¹Doutoranda em Patologia Experimental e Comparada, Departamento de Patologia Veterinária, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo/SP, Brasil.

Médica Veterinária, Laboratório de Patologia Silvestre/NUROF, Universidade Federal do Ceará(UFC), Fortaleza/CE, Brasil.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3646-7951>

Email: robertarocha@ufc.br

²Doutora em Patologia Experimental e Comparada, Departamento de Patologia Veterinária, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo/SP, Brasil.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2526-7601>

Email: ermatush@usp.br

Resumo

O Rio Jaguaribe é o maior curso d'água do Ceará, um dos estados do semiárido no qual os efeitos da seca são mais expressivos. Como solução para a escassez de água, o Governo tem atuado tentando perenizar suas bacias hidrográficas, dentre elas, a Bacia Hidrográfica do Rio Jaguaribe. A partir dos anos 1960, a construção de reservatórios e as políticas de incentivo ao desenvolvimento possibilitaram o início da agricultura irrigada no estado, trazendo grandes empresas multinacionais e a necessidade de intensa modernização para o incremento da produtividade agrícola. Nos últimos 15 anos, a preocupação com os efeitos da intensa atividade agrícola tradicional sobre o ambiente da Bacia Hidrográfica do Jaguaribe vem se mostrando em forma de artigos publicados sobre o acúmulo de agrotóxicos, metais pesados e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos nas águas, sedimentos e organismos vivos do rio, além do aumento na prevalência de intoxicações agudas e casos de câncer na população de municípios da Bacia. O objetivo desta revisão foi quantificar e qualificar os estudos toxicológicos realizados na bacia do Rio Jaguaribe, expondo as espécies afetadas e discutindo sua importância num contexto de saúde animal, ambiental e humana, alertando para prováveis negligências com um importante manancial no nordeste brasileiro.

Palavras-chave: Ceará; contaminantes ambientais; ecotoxicologia.

JAGUARIBE VALLEY: A THREATENED OASIS IN THE BRAZILIAN SEMIARID REGION – SYSTEMATIC REVIEW ON ENVIRONMENTAL CONTAMINATION AND POTENTIAL HAZARD TO THE BASIN AND ITS USERS

Abstract

The Jaguaribe River is the largest watercourse in Ceará, one of the semi-arid states of northeastern Brazil, in which the effects of seasonal droughts are most significant. To manage the water scarcity, the Government has tried to perpetuate hydrographic basins, including the Jaguaribe River Hydrographic Basin. Since the 1960s, the elaboration of policies and the construction of reservoirs has encouraged the beginning of irrigated agriculture in the state, bringing large multinational companies and the need for intense agribusiness modernization. Over the past 15 years, scientific papers have revealed the pesticides accumulation, heavy metals, and polycyclic aromatic hydrocarbons in the waters, sediments, and living organisms in the Jaguaribe Hydrographic Basin environment. Besides, the increase in the prevalence of acute intoxications and cancer concerns about severe harmful effects of the traditional agricultural activity in the population of municipalities within the Basin. The objective of the current work was to quantify and qualify the toxicological studies in the Jaguaribe River Basin, expose the affected species, and discuss their importance in a "One Health" context, alerting to neglectation issues involving this vital source in the northeast of Brazil.

Keywords: Ceará; environmental contaminants; ecotoxicology.

VALLE DE JAGUARIBE: UN OASIS EN PELIGRO EN EL SEMIÁRIDO BRASILEÑO - REVISIÓN SISTEMÁTICA DE CONTAMINACIÓN AMBIENTAL Y POTENCIAL DE DAÑOS A ESTA CUENCA Y A SUS USUÁRIOS

Resumen

El río Jaguaribe es el curso de agua más grande de Ceará, uno de los estados de Brasil donde los efectos de la sequía son más

fuertes. Como solución a la escasez de agua, el Gobierno ha estado tratando de perpetuar sus cuencas hidrográficas, incluso la Cuenca Hidrográfica del río Jaguaribe. Desde la década de 1960, la construcción de embalses y las políticas de fomento del desarrollo han permitido el inicio de la agricultura de regadío en el estado, trayendo grandes empresas multinacionales y la necesidad de una intensa modernización para incrementar la productividad agrícola. En los últimos 15 años, la preocupación por los efectos de la intensa actividad agrícola tradicional en el medio ambiente de la Cuenca Hidrográfica del Jaguaribe se ha manifestado a través de artículos publicados sobre la acumulación de plaguicidas, metales pesados e hidrocarburos aromáticos policíclicos en las aguas, sedimentos y organismos vivos del río. También ha ocurrido un aumento de la prevalencia de intoxicaciones agudas y casos de cáncer en la población de los municipios de la Cuenca. El objetivo del trabajo actual fue cuantificar y calificar los estudios toxicológicos en la Cuenca del Río Jaguaribe, exponer las especies afectadas y discutir su importancia en un contexto de "Una Salud", alertando sobre temas de negligencia que involucran esta fuente vital en el noreste de Brasil.

Palabras-clave: Ceará; contaminantes ambientales; ecotoxicología.

1. INTRODUÇÃO

A demanda mundial por água tem crescido 1% ao ano desde 1980, especialmente atribuída ao aumento da população e à mudança nos perfis de produção e consumo. A expectativa atual é de que haja um incremento de 20 a 30% nessa demanda até o ano de 2050, pressionando mais ainda bilhões de pessoas que vivem em áreas com restrição hídrica (UNESCO, 2019). Segundo a organização não governamental WaterAid (2019) e a FAO (2019), o Brasil e parte dos países da América do Sul são considerados sob baixo risco de crise de escassez de água potável, porque concentram o maior manancial do mundo, com mais de 28% das fontes renováveis.

No Brasil, entretanto, a dívida de conter a maior fonte de água potável do mundo entra em conflito com a gestão do uso das bacias hidrográficas. Embora abundante, a água não é distribuída uniformemente entre as diferentes regiões do país, devido a diferenças geográficas, climáticas e ao uso indiscriminado. No início dos anos 90, as novas legislações estaduais para regulação do uso racional da água entraram em vigor progressivamente nos diferentes estados brasileiros, culminando com a Lei das Águas (Lei nº 9.433/1997), que, baseada no protocolo de Dublin (1992), descentralizou a gestão da água e estabeleceu a Política Nacional de Recursos Hídricos (JOHNSON & KEMPER, 2005; LEGADO BRASIL, 2010).

O atualmente denominado "semiárido brasileiro" ocupa todo o centro da região Nordeste e norte da região Sudeste, apresentando forte insolação, temperaturas relativamente altas, irregularidade e escassez de chuvas, concentradas em períodos de três a quatro meses por ano, considerados insuficientes para suprir os mananciais locais. Os indicadores socioeconômicos são os piores do país, ainda atrelados a uma estrutura agrária arcaica, concentração de renda e má distribuição de terras (SILVA et al., 2010). Nesse contexto, o Ceará é um dos estados do semiárido no

qual os efeitos da seca são mais expressivos. Dentre as medidas de combate à seca, o Governo tem atuado tentando perenizar suas bacias hidrográficas, dentre elas, a bacia do Rio Jaguaribe (BRASIL, 2010).

O Rio Jaguaribe localiza-se cartograficamente entre 4°30' e 7°45' de latitude sul e 37°30' e 41°00' de longitude oeste. Nasce no município de Tauá, sudoeste do estado, e deságua no Oceano Atlântico, no litoral leste do Ceará, entre os municípios de Aracati e Fortim. Percorre 610 km de extensão e sua bacia ocupa quase 76 mil km², o que representa mais de 50% da área total cearense. É dividida em cinco sub-bacias (do Alto / Médio / Baixo Jaguaribe, do Rio Salgado e do Rio Banabuiú), e atende a 80 municípios. Está inserido no bioma Caatinga, de relevo composto por planícies fluviais, Depressão Sertaneja e maciços residuais, com formações vegetais tipo savana-estepe e florestas estacionais. O clima, em maioria, se apresenta semiárido, com temperatura média anual de 27°C e índice pluviométrico por volta de 740mm por ano. Devido à ampla extensão, compreende várias áreas de transição climática e florística, ambientes mais úmidos e estratos herbáceos estacionais (GATTO, 1999; CEARÁ, 2009). A região do estuário é caracterizada como uma planície flúvio-marinha, onde predominam as florestas de manguezal, falésias e dunas, com clima tropical subúmido, classificado como parte do "litoral setentrional do Brasil" (AB'SABER, 2001).

Ao longo de muitas décadas, o gerenciamento das águas na região semiárida vem sendo desafiador para os governos e órgãos de gestão hídrica, pois as condições climáticas originais e o crescimento da densidade populacional aumentam a vulnerabilidade da região aos eventos de secas. Dentre as intervenções de caráter permanente que têm sido realizadas para atenuar os impactos econômicos, sociais e ambientais das secas, estão a construção de "açudes", reservatórios artificiais que modificaram a paisagem e permanecem sustentando a vida e as atividades produtivas do semiárido (BRASIL, 2017). A perenização do Rio Jaguaribe se deu pela construção de mais de quatro mil açudes, dentre os quais Orós, Banabuiú e Castanhão que comportam juntos cerca de 10 bilhões de m³ de água, quase 80% de todo o volume da bacia (JOHNSON & KEMPER, 2004).

A partir dos anos 1960, a construção de reservatórios e as políticas de incentivo ao desenvolvimento possibilitaram o início da agricultura irrigada no estado. A implantação dos perímetros irrigados, nas décadas seguintes, trouxe grandes empresas multinacionais e necessidade de intensa modernização para o incremento da produtividade agrícola (PEREIRA & CUELLAR, 2015). O conceito capitalista da "Revolução Verde" influenciou os governos a criarem legislações específicas para liberação de crédito agrícola destinado à aquisição de equipamentos e insumos, dentre os quais os "agrotóxicos" (FREITAS & BOMBARDI, 2019).

Os agrotóxicos são compostos químicos utilizados para o controle de pragas (ou organismos indesejáveis) na agricultura, aumentando sua produtividade. Compreendem inseticidas, fungicidas, herbicidas, rodenticidas, moluscicidas, nematocidas dentre outros. Teoricamente, os agrotóxicos devem ser letais apenas para espécies-alvo; porém, na realidade do uso indiscriminado, acabam sendo tóxicos também para humanos, animais e meio ambiente em geral, fato que justifica a necessidade de controle rigoroso de seu uso (AKTAR et al., 2009). Metais pesados podem estar contidos em agrotóxicos, fertilizantes ou em

outros insumos, e podem causar danos ambientais. Dentre os efeitos à saúde humana e animal estão a disrupção endócrina e suas consequências metabólicas, alterações neurológicas, desajustes reprodutivos e carcinogênese (GUPTA, 2007c).

Há pelo menos quinze anos, pesquisas vêm apontando para contaminação das áreas de agronegócio associadas aos perímetros irrigados do Jaguaribe, e impacto antrópico sobre o seu leito fluvial e marinho. Herbicidas, inseticidas e metais pesados já foram detectados em águas superficiais, profundas e em sedimentos, no organismo de peixes e de algumas espécies de invertebrados. Também foram realizados estudos epidemiológicos sobre intoxicação em seres humanos.

O objetivo desta revisão foi quantificar e qualificar os estudos toxicológicos realizados na bacia do Rio Jaguaribe, expondo as espécies afetadas e discutindo sua importância num contexto de saúde animal, ambiental e humana.

2. METODOLOGIA

Foi realizado um levantamento bibliográfico no Google Scholar, utilizando os descritores "Jaguaribe", "contaminação", "agrotóxicos", "metais", no período de setembro de 2019, com atualização em janeiro de 2020. Os resultados foram organizados em planilha e classificados de acordo com o tipo, ano de publicação, tema principal e secundário. Foi feita uma triagem das publicações relacionadas ao assunto, sendo incluídas todas aquelas que continham informações toxicológicas de interesse sobre a região da Bacia do Rio Jaguaribe. Foram excluídas as citações, as publicações sem relação direta com o tema e as dissertações ou teses que geraram artigos publicados em revistas indexadas, cujos conteúdos eram repetidos. Foi realizada estatística descritiva dos resultados e eventuais metanálises de dados publicados, incluindo teste do qui-quadrado, correlação e regressão linear, executados no software R v.3.6.1.

3. RESULTADOS

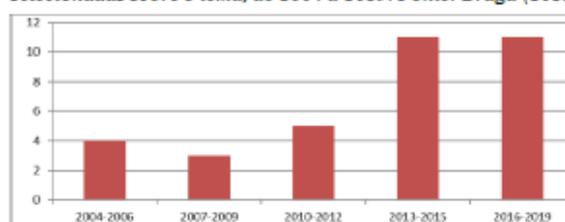
Foram retornados 183 títulos, entre artigos científicos, dissertações ou teses, e citações. Após a avaliação de conteúdo, foram incluídos 34 títulos, publicados entre 2003 e 2019, sendo 21 artigos de pesquisa, 6 dissertações de mestrado, 2 artigos de revisão, 1 resumo de evento científico, 1 projeto de pesquisa, 1 livro na íntegra, 1 capítulo de livro, e 1 relatório técnico. Os temas principais foram classificados como "agrotóxicos", "metais", "PAHs" (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos) e "descritivos" (referindo-se a trabalhos de descrição geográfica, política, social ou econômica). Os temas secundários se referiram ao tipo de amostra estudada ou método, incluindo as águas, sedimentos, saúde humana, biomarcadores e análise de risco epidemiológico. Outros temas secundários incluíram relatórios e dossiês de gestão política e econômica (Tabela 1).

Tabela 1 - Classificação e distribuição das publicações selecionadas, por temas. Fonte: Braga (2019).

Tema	Primário				TOTAL	%
	AGROTÓXICOS	METAIS	PAHS	DESCRITIVO		
Secundário						
Águas	3	8	-	-	11	32,3
Sedimentos	2	1	1	-	4	11,7
Saúde Humana	7	-	-	-	7	20,5
Biomarcadores	-	4	-	-	4	11,7
Análise de Risco	3	-	-	-	3	8,8
Outros	-	-	-	5	5	14,7
TOTAL	15	13	1	5	34	100,0
%	44,1	38,2	2,9	14,7		100,0

O Gráfico 1 apresenta a frequência de publicações sobre o tema no período. O ano com maior número de publicações foi 2013 (n=7), especialmente estudos sobre acúmulo e distribuição de agrotóxicos e metais nas águas.

Gráfico 1 - Frequência de distribuição de publicações selecionadas sobre o tema, de 2004 a 2019. Fonte: Braga (2019).



3.1. Relatórios e publicações descritivas

Johnsson e Kemper (2004) coordenaram um projeto de pesquisa do Banco Mundial, do qual rendeu um dossiê sobre a situação (à época) da Bacia do Rio Jaguaribe, seus usuários, gestores, políticas públicas e estratégias de uso sustentável. Houve revisão de documentos primários e entrevistas com usuários. As principais questões da gestão eram a escassez de água da região semiárida e as secas recorrentes; o crescimento urbano e a construção de desvios do leito do rio para alimentar outras regiões; a qualidade da água e a contaminação ambiental; as enchentes periódicas, devido à irregularidade das precipitações, e a operação/manutenção inadequada da infraestrutura. Após análise da rede complexa de informações, concluíram que ainda existiam problemas na participação equilibrada dos usuários e na transparência das tomadas de decisões. Julgaram que os anos 80 e início dos anos 90 foram mais favoráveis a mudanças no modelo de gestão altamente ultrapassado, porque a época pós-ditadura tinha maior predisposição para a redemocratização e a descentralização. Apesar de haver ainda muito por fazer, a partir daquele ponto e mesmo que lentamente os autores concluíram que o processo estava em andamento e precisaria de mais integração para atingir melhores resultados.

Entre 2007 e 2010, a Assembleia Legislativa do Estado do Ceará coordenou a articulação de mais de 80 instituições de abrangência estadual ou regional a fim de discutirem a garantia de fornecimento de água de qualidade para as futuras gerações

cearenses. Esse movimento, conhecido como “Pacto das Águas”, gerou 6 livros-relatórios, contemplando a situação dos recursos hídricos e a criação de um plano estratégico de implementação de políticas públicas (CEARÁ, 2010). Dentre as publicações, destacou-se o Caderno Regional da Sub-Bacia do Médio Jaguaribe (CEARÁ, 2009), que foi apresentada como “o resultado de um grande esforço (...) que reuniu, de forma resumida, as informações essenciais para orientar o planejamento das ações necessárias nesta bacia”. Contemplou as informações gerais de cunho geográfico e geopolítico; oferta, qualidade, demanda e balanço hídrico; aspectos socioeconômicos, além das ações de desenvolvimento e gestão das águas. Trata-se de uma publicação ricamente ilustrada com mapas, gráficos e tabelas, e que traz, em suas páginas finais, quadros-resumos da pactuação regional, com a aplicação de toda a teoria que foi levantada e discutida em referência à bacia do Médio Jaguaribe no Pacto das Águas. A aplicação prática mostra: uma questão a ser resolvida; o que fazer/como/quem/quando; as parcerias; os instrumentos de execução/formalização, e o comitê fiscalizador.

Sobre o Comitê Gestor da Sub-Bacia do Alto Jaguaribe, Oliveira e Uchôa (2013) compilaram e publicaram as ações realizadas. O Comitê realizou 16 reuniões ordinárias (trimestrais) e 7 extraordinárias, entre 2006 e 2010. O conteúdo das reuniões foi a descentralização do uso dos recursos hídricos oriundos da sub-bacia, conflitos entre usuários, cobrança de uso, fiscalização e campanhas educativas quanto a conservação da água e demais recursos naturais. Dentro das campanhas educativas, o tema “efeitos do uso de produtos químicos” também esteve presente. Os autores ressaltaram também a importância da gestão participativa neste comitê, no qual a maioria dos membros (60%) era da sociedade civil, incluindo usuários moradores dos entornos da sub-bacia, e 40% eram representantes técnicos de instituições públicas municipais e estaduais.

Pantaleña e Maia (2014) fizeram um levantamento histórico da ocupação da região da Bacia do Jaguaribe e relacionaram os potenciais impactos ambientais aos diferentes ciclos econômicos que vêm ocorrendo desde o século XVII. O ciclo agropastoril é o mais longo e vem contribuindo com desmatamento da Caatinga; erosão do solo e das margens do rio; diminuição da vazão; desgaste dos recursos superficiais e profundos; redução da qualidade da água por poluentes, e aumento de salinidade. A exploração mineral, o turismo, a produção de energia eólica e a aquicultura são processos mais recentes, mas também contribuem com desmatamento, erosão e poluição do manancial.

3.2. Análise de contaminação ambiental por agrotóxicos

Antes do que foi registrado mediante análises químicas de amostras de água e sedimento, autores realizaram análise de risco para contaminação por agrotóxicos no Vale do Jaguaribe através de modelos matemáticos. Milhome et al. (2009) levantaram informações sobre o perímetro irrigado Jaguaribe-Apodi, no Baixo Jaguaribe, onde há mais de 200 pequenos produtores e 20 empresas dedicadas à fruticultura irrigada de algodão, ata, banana, feijão, goiaba, graviola, mamão, manga, milho, soja e uva, e são utilizados mais de 30 tipos de agrotóxicos, com destaque para inseticidas (organofosforados, seguidos por piretroides e carbamatos). Segundo levantamentos de análise de risco pelos critérios de triagem da Agência de Proteção Ambiental dos

Estados Unidos (EPA), 36 a 60% dos princípios avaliados foram considerados contaminantes em potencial de águas superficiais e/ou subterrâneas, baseando-se em características físico-químicas dos compostos (solubilidade em água, coeficiente de adsorção à matéria orgânica, solubilidade de gás-líquido, meia-vida na água e no solo), nas regiões do Alto e Médio Jaguaribe, sendo determinada uma lista de compostos prioritários para monitoramento ambiental na região (MILHOME et al., 2009; GAMA et al., 2013; PINHEIRO et al., 2016).

Foi avaliada a ocorrência de agrotóxicos em amostras de águas superficiais e profundas no perímetro irrigado Jaguaribe-Apodi, municípios de Quixeré e Limoeiro do Norte, na região do Baixo Jaguaribe. Avelino et al. (2013) detectaram 14,2% de amostras contaminadas, sendo as maiores frequências dos inseticidas Imidacloprida e Clotianidina, e do herbicida Atrazina. Milhome et al. (2015) detectaram 100% de contaminação em amostras de águas superficiais e 62% em águas profundas, em concentrações globais de 1.1-17.3 µg/L e n.d.-8.9 µg/L, respectivamente. Os fungicidas Propiconazol e Difenconazol foram os mais frequentes e com maiores concentrações em águas superficiais, seguidos pelo inseticida organofosforado Clorpirifós e pela Atrazina. Sousa et al. (2016), avaliaram amostras de água de 10 reservatórios ao longo do estado do Ceará, e detectaram em 60% deles nível de Atrazina 5-6 vezes superior ao limite convencionado pelo Ministério da Saúde, incluindo 7.0-8.0 µg/L de Atrazina em amostras dos reservatórios do Vale do Jaguaribe. Oliveira et al. (2016) investigaram o destino de inseticidas organoclorados utilizados nos perímetros irrigados da Bacia do Jaguaribe. Foram detectadas concentrações preocupantes de Heptacloro e Lindano em amostras de sedimentos de zona fluvial e estuarina, que foram considerados particularmente alarmantes no domínio estuarino, pelo risco ecológico à microbiota local.

Não foi recuperado nenhum artigo sobre concentrações de agrotóxicos nos tecidos de biomarcadores (vertebrados ou invertebrados) no Vale do Jaguaribe.

3.3. Efeitos dos agrotóxicos sobre a saúde humana

No ano de 2009, um grupo de pesquisadores do Departamento de Saúde Comunitária da Universidade Federal do Ceará (DSC-UFC), coordenado por Rigotto, iniciou um projeto de levantamento epidemiológico na população do Baixo Jaguaribe exposta a agrotóxicos. O município de Limoeiro do Norte, no Baixo Jaguaribe, ganhou notoriedade nos anos 2000 devido ao aumento do número de intoxicações agudas humanas registradas pela Secretaria Estadual de Saúde. Em Limoeiro, está instalada truma grande empresa de fruticultura, que explora a cultura do abacaxi em larga escala para consumo interno e exportação, com uso de maquinário agrícola, mão de obra barata e amplo emprego de agrotóxicos (RIGOTTO & MATOS, 2009). Alexandre (2009) entrevistou 75 trabalhadores agrícolas da região, levantando características socioeconômicas e profissionais, hábitos de vida, histórico familiar, conhecimentos sobre exposição aos compostos químicos em agricultura, e submetendo-os a exames clínico-laboratoriais. Todos os entrevistados reconheceram o uso de agrotóxicos na rotina profissional e 94% deles admitiram ter tido contato direto, numa frequência de exposição de mais de 8 horas diárias; 60% referiram já ter passado mal no trabalho, e 53% correlacionaram tais episódios à exposição aos agrotóxicos

(ALEXANDRE, 2009). Os achados clínicos apontaram para 63% de sintomas neurológicos (cefaleia, confusão mental, tremores, lapso de memória) e 45% irritação ocular, que, segundo nossa metanálise foram significativamente maiores que o esperado ($\chi^2 = 13.782$, $p=0.001017$). Os exames laboratoriais mostraram que 48% tiveram alterações nas enzimas hepáticas. Embora tenha realizado o perfil dos trabalhadores, o autor não correlacionou estatisticamente os achados com a exposição aos agrotóxicos. Executamos um teste de correlação e uma regressão linear para tentar investigar o aumento da relação TGO/TGP ao longo dos meses de exposição. Segundo nossa metanálise, apesar de haver uma tendência de aumento linear temporal, o modelo não foi suficiente para tentar explicar a relação, visto que existem vários outros fatores que podem concorrer para a alteração das enzimas hepáticas ($R^2=14,62\%$, $p=0,0872$). Em estudo de caso-controle, Rigotto et al. (2013) detectaram tendência crescente e significativa de mortalidade por neoplasias e mortalidade fetal no grupo-caso (Russas, Limoeiro do Norte e Quixeré), com uma taxa 1.76 maior de hospitalizações e 1.38 maior de mortalidade por neoplasias do que no grupo-controle. Diógenes (2017) observou que a clientela rural da Previdência Social cearense tem 5 vezes mais risco de receber benefícios por neoplasias que a clientela urbana, sendo 57% de trabalhadores do sexo masculino, destacando-se os municípios de Icó, Limoeiro do Norte e Russas com as maiores taxas de benefícios. As mais prevalentes são neoplasias de pele, seguidas por neoplasias hematológicas. Barbosa et al. (2019) avaliaram possível associação de câncer infantojuvenil com populações dos perímetros irrigados, através de dados do Registro Hospitalar de Câncer (RHC) do estado do Ceará. Foi observado um aumento de 16% na tendência temporal das taxas de mortalidade por neoplasias na região do Baixo Jaguaribe, considerada a mais alta entre as regiões não metropolitanas avaliadas.

Freitas e Bombardi (2017) revisaram a literatura relacionada a contaminações e intoxicações nos perímetros irrigados do Ceará, especificamente no Baixo Jaguaribe, elaborando mapas epidemiológicos, através de dados do Sistema de Notificação de Agravos (SINAN) e do Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS). Os resultados mostraram que, nos perímetros de Morada Nova, Jaguaruana, Tabuleiro de Russas e Jaguaribe-Apodi, as intoxicações agudas por agrotóxicos podem chegar a 26 casos/100 mil habitantes. Essa casuística é 10-30 vezes maior se comparada às zonas urbanas, e se repete em outros perímetros irrigados do estado, podendo chegar até 75 casos/100 mil habitantes. O Projeto de Lei estadual nº 18/2015 (aprovado em dezembro/2018) propôs uma série de novas normas de aquisição, uso, armazenamento e transporte de agrotóxicos no estado, além de proibir a pulverização aérea nas áreas cultivadas. Este projeto veio para substituir a antiga Lei nº1478/2009, conhecida como Lei Zé Maria Tomé, referência ao ativista que denunciava o abuso de agrotóxicos pelas empresas do agronegócio, e grilagem de terras no perímetro Jaguaribe-Apodi; lei esta que foi revogada pela Câmara Municipal de Limoeiro do Norte em 2010, logo após o assassinato do ativista (FREITAS & BOMBARDI, 2017).

Não apenas as grandes empresas fazem uso de agrotóxicos em sua produção. Em assentamentos de reforma agrária no município de Russas, 37% dos agricultores de subsistência confirmaram utilizar um ou mais princípios químicos em suas pequenas lavouras policultoras temporárias. Desses, mais de 20%

informaram já ter sofrido intoxicação aguda por compostos organofosforados, referindo tonturas, dores de cabeça, mal estar generalizado, fraqueza, prurido na pele e falta de apetite. Nenhum deles buscou serviço de saúde, aguardando melhora espontânea da intoxicação (CASTRO, 2008).

3.4. Detecção de metais pesados na Bacia do Rio Jaguaribe

Lacerda et al. (2004) estimaram as emissões anuais dos metais pesados de maior impacto ambiental: Zinco (Zn), Cobre (Cu), Chumbo (Pb) e Cádmiio (Cd). Concluíram que as emissões antrópicas de Cu são as mais preocupantes, compreendendo mais de 9 toneladas/ano despejadas na Bacia do Jaguaribe, presumindo que 95% sejam provenientes de atividades agropecuárias.

Nobre et al. (2018) investigaram metais em água e sedimentos de um aquífero aluvionar no município de Itaíba, no Baixo Jaguaribe. O município possui fazendas de carcinicultura e ausência de esgotamento sanitário para a população, que ainda utilizava (por ocasião do estudo) fossas sépticas. Encontraram altos teores de Al (0.7 e 1.8 mg/L) e Pb (11-68 µg/L) em um dos poços amostrados, acima dos permitidos pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente.

As demais publicações sobre metais pesados no Baixo Jaguaribe compreenderam estudos sobre o leito fluvial final e zonas de estuário do grupo de pesquisa do Instituto de Ciências do Mar (Labomar-UFC). Esses estudos incluíram os impactos antropogênicos da erosão, despejo de efluentes e carcinicultura praticada na região. Lopes (2006) comparou as concentrações de Cu e Zn em água e sedimentos de viveiros de camarão com diferentes idades e observou um concentrações de até 8mg/g de Cu e até 68.5mg/g de Zn, sem diferença significativa em relação ao tempo de uso dos viveiros. O excesso de metais nos viveiros poderia afetar o metabolismo dos camarões, além de torná-los potenciais fontes de contaminação alimentar. Concluiu que o enriquecimento de Zn nos viveiros era majoritariamente proveniente de fontes antrópicas. Soares (2011) estudou os teores de mercúrio (Hg) dissolvido (~5.4ng/L), particulado (~0.6ng/L) e total (~11.9ng/L) no gradiente fluviomarinho do estuário do Rio Jaguaribe. Os achados sugeriram que o Hg provinha principalmente do continente, e, nos intervalos entre as marés, grande quantidade estava ficando retida na zona de estuário. Apesar dos valores encontrados não classificarem o Jaguaribe como rio impactado pelo Hg, estimou-se que sua fração biodisponível fosse representativa o suficiente para causar impacto na cadeia trófica, e que a concentração de Hg total poderia causar efeitos crônicos para a biota aquática local. Lacerda et al. (2011; 2013) concluíram que era esperada uma maior exportação de Hg particulado (1.8-12.6 mg/s) do rio para o estuário durante as chuvas. Além disso, rações para aquicultura, fertilizantes e cal conteriam impurezas que contribuiriam para a carga total de Hg nos viveiros, podendo chegar a 230mg Hg Total/hectare/ciclo. Apesar das preocupações citadas, Lacerda et al. (2017) calcularam que apenas 0.15% do Hg que é despejado no estuário anualmente corresponde a resíduos da carcinicultura. Da-Silva-Dias et al. (2013) compararam a influência das estações seca e chuvosa nos teores de Cu, Zn, Fe (Ferro) e Al (Alumínio) em matéria particulada suspensa na zona estuarina. Concluíram que Cu, Fe e Al eram de origem litogênica, devido à maior erosão que ocorre nessa época; e que seus teores médios tiveram

correlação positiva com as chuvas. Já o Zn mostrou teores mais altos na estação seca, e mostrou-se correlacionado com fontes antropogênicas.

3.5. Avaliação de toxicidade em biomarcadores

Valentim Neto (2004) demonstrou preocupação com a saúde do Caranguejo-Uçá (*Ucides cordatus*) natural do estuário do Jaguaribe, uma vez que, no período seco do ano 2000, pescadores relataram relevante aumento de sua mortalidade dentre de várias outras espécies de organismos estuarinos. Ciente da potencial influência dos resíduos tóxicos sobre a saúde da fauna aquática do Baixo Jaguaribe, o autor investigou a histologia dos órgãos principais e os parâmetros da água, e fez um bioensaio observando a influência dos efluentes de carcinicultura sobre amostra de indivíduos vivos durante 30 dias. Os achados não apontaram para alterações morfológicas orgânicas nos caranguejos, portanto não foi possível evidenciar impacto sobre a espécie nesse experimento. Também não foi possível sugerir uma causa para o aumento da mortalidade de anos anteriores, pois possíveis aumentos de toxicidade podem ter sido pontuais e dissipados pelos fluxos flúvio-marinhos e pluviosidade posterior.

Peres (2012) investigou biomarcadores invertebrados e suas diferentes influências no acúmulo de metais nos sedimentos de três estuários cearenses. No estuário do Jaguaribe, observou que a colonização por moluscos bivalves *Mytella* spp. favoreceu o acúmulo de Fe, Al e Mn (Manganês) nos perfis sedimentares até 15cm de profundidade. Já em áreas colonizadas pelos caranguejos *Uca* spp., os teores de Fe e Al se mostraram menores nos sedimentos, principalmente até 10cm de profundidade, o que possivelmente se dá pelo fenômeno da “bioturbação”, capacidade que tem os caranguejos de oxidar sedimentos devido a seus hábitos alimentares. Foram observadas influências semelhantes para os teores de Cu, Zn e Pb, por bivalves e caranguejos. A origem dos metais foi estimada com quantificação das áreas não colonizadas e uso de matrizes de correlação. A conclusão foi que Fe, Cu, Zn e Pb mostraram-se altamente correlacionados entre si, portanto sua origem e/ou mecanismo de deposição deveriam ser as mesmas, diferentes de Al e Mn.

Costa e Lacerda (2014) investigaram os teores de Hg em peixes consumidos em várias vilas ao longo do Baixo Jaguaribe. Foram detectados teores de Hg em amostras de músculo de 13 espécies, variando entre 0.1 – 107.5 ng/g, considerados abaixo do limite estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). As maiores concentrações foram detectadas na musculatura de peixes carnívoros, demonstrando assim a “biomagnificação” através da cadeia trófica. Através de entrevistas, estimaram a exposição humana ao Hg através do consumo de peixe. Concluíram que, para as quantidades estimadas de consumo de peixe (mesmo estando acima do consumo em outras regiões), os teores de Hg encontrados naquele momento não ofereciam risco de toxicose à população ribeirinha do Baixo Jaguaribe. O mesmo grupo de pesquisa comparou os teores de Hg em músculos de espécies nativas livres e de espécies introduzidas, mantidas em fazendas de piscicultura no açude Castanhão, na região do Médio Jaguaribe. Os teores em peixes nativos foram estatisticamente maiores que em peixes cultivados, mas ainda considerados abaixo do limite preconizado pela ANVISA. Em um estudo prospectivo, Moura et al. (2018)

também avaliou acumulação de Hg na fauna estuarina, de 2007 a 2015. Foi observada uma diferença significativa nas concentrações de Hg em invertebrados com diferentes hábitos alimentares, sendo mais altas em crustáceos carnívoros; porém, em peixes, não foi observada diferença estatística entre diferentes hábitos alimentares. Novamente, os valores encontrados estavam abaixo do limite oficial, mas os pesquisadores acreditaram que as características hidroquímicas e hidrodinâmicas do ecossistema em questão, estariam contribuindo para crescente biodisponibilidade de Hg, que, a longo prazo, e com o maior consumo regional, poderiam causar distúrbios crônicos na fauna e na população humana consumidora.

3.6. Detecção de hidrocarbonetos aromáticos

Andrade et al. (2019) avaliaram 18 tipos de PAHs ao longo do curso do Baixo Jaguaribe. A concentração total variou de 0.6 – 3752.0 ng/g, mostrando padrão de distribuição espacial distinto entre as áreas, com as maiores concentrações em pontos de coleta no estuário. Esses achados classificaram o estuário do Jaguaribe como moderado a altamente contaminado (1000 – 5000 ng/g), segundo a EPA. Houve predomínio de compostos de alto peso molecular (com quatro ou mais anéis), incluindo pireno e fluoranteno. O Benzopireno, hidrocarboneto de alto peso molecular conhecido por seu efeito carcinogênico em animais de laboratório, foi detectado em baixas concentrações na zona estuarina. As combustões de biomassa doméstica e de carvão em olarias contribuíram mais na zona fluvial, enquanto possíveis vazamentos de combustível náutico contribuíram mais na zona estuarina.

Apesar de um empenho relativamente grande em medir o impacto ambiental e a qualidade da água da Bacia do Jaguaribe durante o período dessas publicações, nenhum trabalho ainda contemplou estudo de efeitos de contaminação ambiental sobre vertebrados terrestres da grande área do Jaguaribe.

4. DISCUSSÃO

A contaminação ambiental por agrotóxicos e PAHs (compostos químicos orgânicos) e metais pesados (elementos inorgânicos) causam uma complexa rede de efeitos indesejados, sendo necessário portanto ser abordada dentro do conceito interdisciplinar da “Saúde Única” (saúde humana – animal – ambiental). Os resíduos tóxicos da agricultura contaminam o solo e as águas, atingindo a microbiota e a macrofauna. Assim, viajam pelos organismos dentro da cadeia trófica, afetando a saúde de plantas, de invertebrados, animais vertebrados, até chegar aos humanos através da alimentação e da absorção orgânica por via tópica. Diante disso, não é possível tratar apenas uma das vertentes da saúde.

Os compostos químicos denominados agrotóxicos começaram a ser produzidos nos anos 1950 na Índia, contribuindo amplamente para a expansão da agricultura, e tendo se expandido para todos os continentes nas décadas seguintes. Dentre os benefícios de seu uso estão o aumento da produtividade, a redução das perdas, o controle de vetores de doenças e aumento da qualidade alimentar. Entretanto, mesmo os mais modernos agrotóxicos, com espectro mais específico, podem ainda ser perigosamente tóxicos para humanos e animais, contaminando

alimentos e produtos alimentares, ar, águas superficiais e profundas, solos e vegetação. Ser perigoso para o ecossistema significa afetar os indivíduos da base da cadeia alimentar, como plantas e invertebrados, acumulando-se e causando danos para o sistema como um todo (AKTAR et al., 2009).

Sobre os agrotóxicos detectados em maior concentração no Vale do Jaguaribe, aqueles podem afetar humanos e animais, causando principalmente alterações no fígado, nos sistemas reprodutivo e nervoso. Os fungicidas triazóis podem causar hepatotoxicidade aguda e carcinogênese hepática. Além disso, Ilyushina et al. (2019) observaram inibição da eritropoiese em medula óssea de camundongos expostos a fungicidas triazóis.

A Atrazina e o Lindano funcionam como disruptores endócrinos, podendo causar feminização de indivíduos machos (pela expressão da aromatase) e toxicidade testicular. O Clorpirifós, dentre outros organofosforados, interfere na condutividade nervosa e na atividade da acetilcolinesterase, assim como estresse oxidativo no sistema nervoso central, podendo resultar em alterações neurocomportamentais. O Imidacloprida e a Clotianidina também podem alterar as reações colinérgicas, porém são considerados de alta margem de segurança por serem extremamente seletivos (GUPTA, 2007c). Além dos previamente listados, pesquisas mais recentes levantaram outros efeitos em humanos e animais. O Lindano e seus isômeros (α , β , δ -hexaclorobenzeno) foram detectados no soro de 96% de pacientes com Doenças de Parkinson, sendo o β -hexaclorobenzeno o componente estatisticamente mais associado (RICHARDSON et al., 2009). Navaratne et al. (2014) observaram mortalidade aguda em girinos expostos a 0.1 ppm de Clorpirifós. Outras pesquisas relataram que a Atrazina causou degeneração miocárdica e desorganização sinusoidal hepática, por via direta e através de disfunção iônica (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+}) em codornas, bem como falhas de desenvolvimento transgeracionais em ratos (LIN et al., 2016; McBIRNEY et al., 2017). Sun et al. (2016) observaram que o imidacloprida induziu adipogênese e resistência à insulina em camundongos, enquanto outros autores observaram efeitos crônicos subletais em comunidades de invertebrados, dentre as quais abelhas polinizadoras, afetando comportamento, alimentação e funções ecológicas (VAN DIJK et al., 2013; DIVELY et al., 2015; SUN et al., 2016; MILES et al., 2017).

A exposição ocupacional a agrotóxicos está relacionada com o risco aumentado de neoplasias hematológicas (linfoma não-Hodgkin, Leucemias e Mieloma Múltiplo); inclusive, níveis séricos de agrotóxicos não persistentes já foram significativamente correlacionados com contagens anômalas de células linfóides e mielóides em trabalhadores rurais no sul do Brasil (MERHI et al., 2007; PICCOLI et al., 2019). Mesmo a exposição a inseticidas ou herbicidas residenciais, os quais são utilizados em menores concentrações ou frequência, pode aumentar o risco de neoplasias infantojuvenis de 1.23-1.47 vezes, incluindo neuroblastomas, nefroblastomas e leucemias (CHEN et al., 2015).

Considerando a detecção de metais pesados no Rio Jaguaribe e em seu estuário, os efeitos sobre humanos e animais também causam inquietações. Os metais pesados em geral produzem toxicidade quando formam complexos com compostos celulares contendo S (enxofre), N (nitrogênio) e O (oxigênio), os quais inativam sistemas enzimáticos e modificam estruturas proteicas,

afetando o metabolismo em nível celular, podendo causar a morte das células. Os sistemas mais afetados são sistema nervoso central, gastrointestinal, cardiovascular, hematopoiético, renal e sistema nervoso periférico (SHARMA et al., 2014).

O Cu foi um dos metais cuja detecção causou maiores preocupações. As doses tóxicas são variáveis entre as diferentes espécies animais. Em intoxicações agudas, lesões hepáticas e renais graves costumam se manifestar em até 48 horas, geralmente letais (THOMPSON, 2007a). Os principais relatos de intoxicação crônica em animais envolvem as espécies bovina e ovina, quando se alimentam em solos, água e pastos contaminados por calda bordalesa (mistura de CuSO_4 com ação fungicida), suplementos à base de Cu e esterco de aves e suínos (O'DELL, 1997).

Foram detectadas altas concentrações de Cu e Zn em viveiros de camarões na região do estuário do Rio Jaguaribe. Levantou-se que neste caso, esses camarões poderiam ser fonte de contaminação alimentar, uma vez que ocorre o acúmulo dos metais nos tecidos e a depuração via exoesqueleto. A intoxicação pelo Zn em humanos é considerada um evento raro, mais relacionado com ingestão acidental de grandes quantidades de suplementos; contudo, tem bastante gravidade, uma vez que promove estresse oxidativo metabólico e dispara a morte celular programada em diferentes tecidos, incluindo o sistema nervoso (PLUM et al., 2010). O Cd, cujos níveis foram considerados abaixo do limite legal estabelecido, nem por isso deve ser excluído dos monitoramentos, uma vez que a exposição crônica de ratos ao Cd, mesmo em baixos níveis, causou carcinogênese (LEE & WHITE, 1980), osteoporose e defeito de vascularização em ossos compactos (DURANOVA et al., 2014), distrofia do esmalte dentário (ŚWIETLIČKA et al., 2019) e alterações inflamatórias na próstata (SANTANA et al., 2016). Em humanos, a exposição ocupacional tem sido relacionada a nefropatias e osteomalacia com osteoporose (HOOSE, 2007).

Segundo a Food and Drug American Agency (FDA), a acumulação de Hg em peixes para consumo não deve ultrapassar 1 ppm (GUPTA, 2007b), o que é considerado pela ANVISA (BRASIL, 2013) como 1.0mg/kg (peixes carnívoros) e 0.5mg/kg (peixes não-carnívoros). Mesmo em concentrações mínimas de 50 $\mu\text{g/g}$, Amorim et al. (2000) encontraram correlação direta entre contaminação por metilmercúrio (metabólito do Hg inorgânico acumulado em peixes) e danos citogenéticos aos linfócitos periféricos em moradores de ilhas fluviais ao longo do Rio Amazonas. Em animais de laboratório, exposição crônica a metilmercúrio e fenilmercúrio, mesmo em níveis considerados baixos, pode causar danos aos rins, estômago e intestino grosso, alterações de pressão arterial e frequência cardíaca, anomalias de desenvolvimento e abortos, alterações espermáticas e espermatogênicas; em animais pecuários, além de alterações nos órgãos já citados, os sinais neurológicos mostraram-se mais evidentes (GUPTA, 2007b; BRASIL, 2013; GENCHI et al., 2017).

Os metais Al e Pb foram detectados em altas concentrações na água de um poço profundo na região do Baixo Jaguaribe. Ambos estão relacionados ao estresse oxidativo geral e anemia hipocrômica, e danos orgânicos dependem de em qual tecido eles se depositam em maior concentração; o Pb causa neurotoxicidade por disfunção da barreira hematoencefálica e alteração de neurotransmissores, em animais e humanos (THOMPSON,

2007b), enquanto o Al tem sido implicado como participante de doenças neurodegenerativas (GUPTA, 2007a).

Pireno e fluoranteno estão entre os PAHs detectados em maiores concentrações no Baixo Jaguaribe. Os PAHs em geral causam toxicidade aguda metabólica para organismos aquáticos e aves silvestres, exacerbada na presença de luz ultravioleta. Toxicidade crônica pode incluir carcinogênese e alterações de imunidade, reprodução e desenvolvimento (ABDEL-SHAFY & MANSOUR, 2016). Em humanos, a exposição aguda a altos níveis de PAHs, dependendo da via de exposição, pode causar irritação ocular, náusea, vômito, diarreia e confusão mental (UNWIN et al., 2006). Efeitos crônicos compreendem catarata, insuficiências hepática e renal, disfunções respiratórias tipo asma, além de carcinogênese respiratória e digestória (OLSSON et al., 2010; DIGGS et al., 2011). O benzopireno, que também foi detectado no Baixo Jaguaribe, mas em níveis mais baixos, foi o primeiro dos PAHs com atividade carcinogênica a ser descoberto. Em animais experimentais, o benzopireno produziu câncer de pulmão, quando inalado; câncer de estômago, quando administrado na água de beber; e câncer de pele, através de administração tópica (ABDEL-SHAFY & MANSOUR, 2016).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através de toda a literatura revista foi possível perceber a importância do Rio Jaguaribe para o Ceará e para o Brasil, em termos de abastecimento de água, para consumo doméstico e industrial, para irrigação e para transporte, e para a manutenção ecossistêmica. Em síntese, para o progresso regional. Os contaminantes detectados foram discutidos à luz da “Saúde Única” (humana, animal e ambiental). Apesar de a maioria dos estudos concluir que os níveis de contaminação ainda são baixos (comparados a outros rios), agrotóxicos, metais e hidrocarbonetos podem causar danos irreparáveis à saúde humana, animal e ambiental a longo prazo, mesmo em baixas concentrações ou doses.

O monitoramento é imprescindível, o controle e as fiscalizações são inadiáveis e punições aos infratores devem ser postas em verdadeira prática. A conscientização e a educação ambiental dos usuários e população beneficiada devem ser contínuas. O uso indiscriminado de compostos químicos na agricultura deve ser combatido pelas autoridades e fiscalizada por todos.

6. REFERÊNCIAS

- AB'SABER, A.N. *Litoral do Brasil*. São Paulo: Metalivros; 2001. 286 p.
- ABDEL-SHAFY, H. I.; MANSOUR, M. S. M. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum*, v. 25, n. 1, p. 107–123, mar. 2016.
- AKTAR, W.; SENGUPTA, D.; CHOWDHURY, A. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology*, v. 2, n. 1, p. 1–12, 1 mar. 2009.
- ALEXANDRE, S.F. *Exposição a agrotóxicos e fertilizantes químicos: agravos à saúde dos trabalhadores no agronegócio do abacaxi em Limoeiro Do Norte-Ce*. 2009. 154 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2009.
- AMORIM, M. I. M. et al. Cytogenetic damage related to low levels of methyl mercury contamination in the Brazilian Amazon. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 72, n. 4, p. 496–507, 2000.
- ANDRADE, M. V. F. et al. Influence of sediment parameters on the distribution and fate of PAHs in an estuarine tropical region located in the Brazilian semi-arid (Jaguaribe River, Ceará coast). *Marine Pollution Bulletin*, v. 146, n. July, p. 703–710, 2019.
- AVELINO, F. F.; TEIXEIRA, Z. A.; PEREIRA, D. M. Análise de agrotóxicos em águas da chapada do apodi, ceará, brasil. In: *Revista Águas Subterrâneas, Supl*, São Paulo. Anais... São Paulo: 2013.
- BARBOSA, I. M. et al. Cancer among children and adolescents: Relationship with the poles of agricultural irrigation in the state of ceará, Brazil. *Ciencia e Saude Coletiva*, v. 24, n. 4, p. 1563–1570, 2019.
- BRASIL. Ministério da Educação. *Indicadores socioeconômicos do Ceará 2010*. Disponível em: http://portal.mec.gov.br/setec/arquivos/pdf/indicad_ce.pdf. Acesso em: 26 out. 2019.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Agência Nacional das Águas. *Reservatórios do Semiárido Brasileiro. Hidrologia, balanço hídrico e operação. Anexo C – Jaguaribe*. Brasília: ANA, 2017. Disponível em <https://www.ana.gov.br/noticias/estudo-reservatorios/anexo-c-jaguaribe.pdf>. Acesso em: 08 nov. 2019.
- BRASIL. RDC nº 42 de 29 de Agosto de 2013. Dispõe sobre o Regulamento Técnico MERCOSUL sobre Limites Máximos de Contaminantes Inorgânicos em Alimentos. Brasília: Ministério da Saúde, Agência Nacional de Saúde, 2013. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/rdc0042_29_08_2013.pdf/c5a17d2d-a415-4330-90db-66b3f35d9fbd. Acesso em 28 Nov. 2019.
- CASTRO, M.G.G.M. *Avaliação do Uso de Agrotóxicos e da Qualidade dos Recursos Hídricos nos Assentamentos de Reforma Agrária Bernardo Marim II e Mundo Novo, Município de Russas (CE): um estudo de caso*. 2008, 80 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Saúde Pública) – Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro-RJ, 2008.
- CEARÁ. Assembleia Legislativa. *Caderno regional da sub-bacia do Médio Jaguaribe*. Santana, E.W. (editor). Fortaleza: INESP; 2009. 102 p. Disponível em: <http://portal.cogerh.com.br/wp-content/uploads/2018/09/Bacia-do-Medio-Jaguaribe.pdf>. Acesso em: 19 set. 2019.

- CEARÁ. Assembleia Legislativa. Pacto das Águas (2010). Disponível em: <https://www.al.ce.gov.br/index.php/pacto-das-aguas>. Acesso em: 03 dez, 2019.
- CHEN, M. et al. Residential exposure to pesticide during childhood and childhood cancers: A meta-analysis. *Pediatrics*, v. 136, n. 4, p. 719–729, 2015.
- COSTA, B. G. B.; LACERDA, L. D. Mercury (Hg) in fish consumed by the local population of the Jaguaribe River lower basin, Northeast Brazil. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 21, n. 23, p. 13335–13341, 15 dez. 2014.
- DA SILVA DIAS, F. J.; MARINS, R. V.; MAIA, L. P. Impact of Drainage Basin Changes on Suspended Matter and Particulate Copper and Zinc Discharges to the Ocean from the Jaguaribe River in the Semiarid NE Brazilian Coast. *Journal of Coastal Research*, v. 290, p. 1137–1145, 30 set. 2013.
- DEFARGE, N.; SPIROUX DE VENDÔMOIS, J.; SÉRALINI, G. E. Toxicity of formulants and heavy metals in glyphosate-based herbicides and other pesticides. *Toxicology Reports*, v. 5, p. 156–163, 2018.
- DIGGS, D. L. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons and digestive tract cancers: a perspective. *Journal of environmental science and health. Part C, Environmental carcinogenesis & ecotoxicology reviews*, v. 29, n. 4, p. 324–57, out. 2011.
- DIÓGENES, S.S. (In)Visibilização das causas de câncer na zona rural de Limoeiro do norte, a vulnerabilização e os riscos do uso dos agrotóxicos. 2017, 173 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2017.
- DIVELY, G. P. et al. Assessment of chronic sublethal effects of imidacloprid on honey bee colony health. *PloS one*, v. 10, n. 3, p. e0118748, 2015.
- DURANOVA, H. et al. Changes in compact bone microstructure of rats subchronically exposed to cadmium. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 56, n. 1, p. 64, 24 dez. 2014.
- FAO. AQUASTAT - FAO's Global Information System on Water and Agriculture. Disponível em: <http://www.fao.org/aquastat/en/geospatial-information/global-maps-irrigated-areas/irrigation-by-country/country/BRA>. Acesso em: 16 ago. 2019.
- FREITAS, B. M. C.; BOMBARDI, L. M. A política nacional de irrigação e o uso de agrotóxicos no Brasil: contaminação e intoxicações no Ceará. *GEOgraphia*, v. 20, n. 43, p. 86, 16 out. 2018.
- GAMA, A. F.; DE OLIVEIRA, A. H. B.; CAVALCANTE, R. M. Inventário de agrotóxicos e risco de contaminação química dos recursos hídricos no semiárido cearense. *Química Nova*, v. 36, n. 3, p. 462–467, 2013.
- GATTO, L.C.S. Diagnóstico ambiental da bacia do rio Jaguaribe. Salvador: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; 1999. 77 p. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv95788.pdf>. Acesso em: 26 out.2019.
- GENCHI, G. et al. Mercury Exposure and Heart Diseases. *International journal of environmental research and public health*, v. 14, n. 1, 2017.
- GUPTA, R. C. Aluminium. In: GUPTA, R. C. (Ed.). *Veterinary Toxicology. Basic and Clinical Principles*. New York: Academic Press, 2007. p. 411–417.
- GUPTA, R. C. Mercury. In: GUPTA, R. C. (Ed.). *Veterinary Toxicology. Basic and Clinical Principles*. 1st. ed. New York: Academic Press, 2007. p. 442–447.
- GUPTA, R. C. *Veterinary Toxicology – Basic and clinical principles*. 1st. ed. Academic Press, 2007. 1201p.
- HOOSE, S. B. Cadmium. In: GUPTA, R. C. (Ed.). *Veterinary Toxicology. Basic and Clinical Principles*. New: Academic Press, 2007. p. 421–426.
- ILYUSHINA, N. et al. Maximum tolerated doses and erythropoiesis effects in the mouse bone marrow by 79 pesticides' technical materials assessed with the micronucleus assay. *Toxicology reports*, v. 6, p. 105–110, 2019.
- JOHNSON, R. M. F.; KEMPER, K. Institutional and policy analysis of river basin management: the Jaguaribe river basin, Ceara, Brazil. The World Bank, 2005. Disponível em: <http://elibrary.worldbank.org/doi/book/10.1596/1813-9450-3649>. Acesso em: 21 set. 2019.
- LACERDA, L. D. et al. Mercury Emission Factors from Intensive Shrimp Aquaculture and Their Relative Importance to the Jaguaribe River Estuary, NE Brazil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 87, n. 6, p. 657–661, 16 dez. 2011.
- LACERDA, L. D. et al. Mercury in Indigenous, Introduced and Farmed Fish from the Semiarid Region of the Jaguaribe River Basin, NE Brazil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 93, n. 1, p. 31–35, 12 jul. 2014.
- LACERDA, L. D. et al. Pluriannual Watershed Discharges of Hg into a Tropical Semi-Arid Estuary of the Jaguaribe River, NE Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2013.
- LACERDA, L. et al. Contaminação por metais pesados e pesticidas nas bacias inferiores dos Rios Curimataú e Açú (RN) e Rio Jaguaribe (CE). Associação Brasileira dos Criadores de Camarão (ABCC), editors. Sociedade Internacional para Ecossistemas de Manguezal do Brasil (ISME/BR); Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR-UFC); Associação Brasileira dos Criadores de Camarão (ABCC). Fortaleza; 2004. 1–59 p. Disponível em:

- https://abccam.com.br/wp-content/uploads/2011/02/Metais_Pesados_ABCC.pdf. Acesso em 21 Set. 2019.
- LACERDA, L.D.; MARINS, R.V.; CAVALCANTE, M.S. Mercury mobilization due to global climate and regional land use changes in the Jaguaribe River Estuary, ne Brazil. 2017, p. 349-360. In: Botello AV, Villanueva S, Gutiérrez J, Rojas Galaviz, JL (eds.). Vulnerabilidad de las zonas costeras de Latinoamérica al cambio climático. UJAT, UNAM, UAC. 476 p. Disponível em: <https://www.redicomar.com/wp-content/uploads/2018/10/Vulnerabilidad-de-las-Zonas-Costeras-de-Latinoame%CC%81rica-al-Cambio-Clima%CC%81tico.pdf>. Acesso em 21 Set. 2019.
- LEE, J. S.; WHITE, K. L. A review of the health effects of cadmium. *American journal of industrial medicine*, v. 1, n. 3-4, p. 307-17, 1980.
- LEGADO BRASIL. Lei das Águas assegura a disponibilidade do recurso no País. 20 out. 2010. Disponível em <http://legado.brasil.gov.br/noticias/meioambiente/2010/10/ei-das-aguas-assegura-a-disponibilidade-do-recurso-no-pais>. Acesso em: 25 Out. 2019.
- LIN, J. et al. A novel mechanism underlies atrazine toxicity in quails (*Coturnix Coturnix coturnix*): triggering ionic disorder via disruption of ATPases. *Oncotarget*, v. 7, n. 51, p. 83880-83892, 20 dez. 2016.
- LOPES, D.V. Acúmulo de metais traço cobre (Cu) e zinco (Zn) em viveiros de cultivo de camarão (*Litopenaeus vannamei*). 2006. 86 f. Fortaleza. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) – Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2006.
- MCBIRNEY, M. et al. Atrazine induced epigenetic transgenerational inheritance of disease, lean phenotype and sperm epimutation pathology biomarkers. *PloS one*, v. 12, n. 9, p. e0184306, 2017.
- MERHI, M. et al. Occupational exposure to pesticides and risk of hematopoietic cancers: Meta-analysis of case-control studies. *Cancer Causes and Control*, v. 18, n. 10, p. 1209-1226, 2007.
- MILES, J. C. et al. Effects of clothianidin on aquatic communities: Evaluating the impacts of lethal and sublethal exposure to neonicotinoids. *PloS one*, v. 12, n. 3, p. e0174171, 2017.
- MILHOME, M. A. L. et al. Avaliação do potencial de contaminação de águas superficiais e subterrâneas por pesticidas aplicados na agricultura do Baixo Jaguaribe, CE. *Eng Sanit Ambient*, v. 14, n. 3, p. 363-372, 2009.
- MILHOME, M. A. L. et al. Influence the use of pesticides in the quality of surface and groundwater located in irrigated areas. *International Journal of Environment Research*, v. 9, n. 1, p. 255-262, 2015.
- MOURA, V. L.; COSTA, B. G. B.; LACERDA, L. D. Distribuição de mercúrio na fauna estuarina do Rio Jaguaribe - CE. *Arquivos de Ciências do Mar*, v. 51, n. 1, p. 49, 11 set. 2018.
- NAVARATNE, A.; JAYAWARDENA, U.; RAJAKARUNA, R. Toxicity of Propanil , Glyphosate , Chlopyrifos and Dimethoate on Asian Common Toad *Duttaphrynus melanostictus*) and Common Hourglass Tree Frog (*Polypedates cruciger*) Empirical evide ... Toxicity of Propanil , Glyphosate , Chlopyrifos and Dimethoate on. In: SETAC Asia Pacific Conference, September, Adelaide. Anais... Adelaide: 2014.
- NOBRE, M. E. da S. et al. Hydrochemical-environmental study of the low Jaguaribe alluvial aquifer, itaíba - Ceará. *Revista do Instituto Geológico*, v. 39, n. 3, p. 77-92, 2018.
- O'DELL, B. L. The concept of trace element antagonism: the Cu-Mo-S triangle (Dick, 1952-1954). *The Journal of nutrition*, v. 127, n. 5 Suppl, p. 1045S-1047S, maio 1997.
- OLIVEIRA, A. H. B. et al. The legacy of organochlorine pesticide usage in a tropical semi-arid region (Jaguaribe River, Ceará, Brazil): Implications of the influence of sediment parameters on occurrence, distribution and fate. *Science of the Total Environment*, v. 542, p. 254-263, 2016.
- OLIVEIRA, F. É. R. de; UCHÔA, H. de S. Gestão da sub-bacia hidrográfica do Alto Jaguaribe, no gerenciamento do comitê de 2006 a 2010. *Revista Verde de Agroecologia e ...*, n. 2010, 2013.
- OLSSON, A. C. et al. Occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and lung cancer risk: a multicenter study in Europe. *Occupational and environmental medicine*, v. 67, n. 2, p. 98-103, fev. 2010.
- PANTALENA, A. F.; MAIA, L. P. Marcas da ação antrópica na história ambiental do Rio Jaguaribe, Ceará, Brasil. *Revista de Gestão Costeira Integrada*, v. 14, n. 3, p. 459-468, 2014.
- PEREIRA, G. R.; CUELLAR, M. D. Z. Conflitos pela água em tempos de seca no Baixo Jaguaribe, Estado do Ceará. *Estudos Avançados*, v. 29, n. 84, p. 115-137, ago. 2015.
- PERES, T.F. Influência da biota na acumulação de metais pesados nos sedimentos superficiais do estuário do rio Jaguaribe, praia de Ponta Grossa e praia de Arpoeira, Ceará. 2012. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) – Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2012.
- PICCOLI, C. et al. Occupational exposure to pesticides and hematological alterations: A survey of farm residents in the South of Brazil. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 24, n. 6, p. 2325-2340, 2019.
- PINHEIRO, A. I. et al. Theoretical estimate and multiresidue analyze using spme-gc-it/ms/ms for management of pesticides in water of the rural zone of Ceará, Brazil. *Revista Aidis*, v. 9, n. 3, p. 386-398, 2016.

- PLUM, L. M.; RINK, L.; HAASE, H. The essential toxin: impact of zinc on human health. *International journal of environmental research and public health*, v. 7, n. 4, p. 1342–65, 2010.
- RICHARDSON, J. R. et al. Elevated serum pesticide levels and risk of Parkinson disease. *Archives of neurology*, v. 66, n. 7, p. 870–5, jul. 2009.
- RIGOTTO, R. M. et al. Trends of chronic health effects associated to pesticide use in fruit farming regions in the state of Ceará, Brazil. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 16, n. 3, p. 763–773, 2013.
- RIGOTTO, R.; PESSOA VANIRA MATOS. Epidemiological study of the lower Jaguaribe Region population exposed to environmental contamination in the area of pesticides. *Actas em Saúde Coletiva*, v. 4, n. 4, p. 142–143, 2009.
- SANTANA, V. P. et al. Long-term effects of perinatal exposure to low doses of cadmium on the prostate of adult male rats. *International journal of experimental pathology*, v. 97, n. 4, p. 310–316, 2016.
- SHARMA, B.; SINGH, S.; SIDDIQI, N. J. Biomedical Implications of Heavy Metals Induced Imbalances in Redox Systems. *BioMed Research International*, v. 2014, p. 1–26, 2014.
- SILVA, P. C. G. et al. Caracterização do Semiárido brasileiro: fatores naturais e humanos. *Semiárido brasileiro: pesquisa, desenvolvimento e inovação*. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2010., p. 18–48, 2010. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/861906>. Acesso em: 19 set. 2019.
- SOARES, T.C.M. Variação sazonal, transporte e partição de hg no gradiente fluviomarinho do Rio Jaguaribe – CE. 2011. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) – Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2011.
- SOUSA, A. S. et al. Estimated Levels of Environmental Contamination and Health Risk Assessment for Herbicides and Insecticides in Surface Water of Ceará, Brazil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 96, n. 1, p. 90–95, 2016.
- SUN, Q. et al. Imidacloprid Promotes High Fat Diet-Induced Adiposity and Insulin Resistance in Male C57BL/6J Mice. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 64, n. 49, p. 9293–9306, 14 dez. 2016.
- ŚWIETLIĆKA, I. et al. The effect of cadmium exposition on the structure and mechanical properties of rat incisors. *PLOS ONE*, v. 14, n. 4, p. e0215370, 12 abr. 2019.
- THOMPSON, L. J. Copper. In: GUPTA, R. C. (Ed.). *Veterinary Toxicology. Basic and Clinical Principles*. New York: Academic Press, 2007. p. 427–429.
- THOMPSON, L. J. Lead. In: GUPTA, R. C. (Ed.). *Veterinary Toxicology. Basic and Clinical Principles*. New York: Academic Press, 2007. p. 438–441.
- UNESCO. The United Nations World Water Development Report 2019 - Leaving no one behind. Paris: UNESCO, 2019. Disponível em <https://www.unwater.org/publications/world-water-development-report-2019/>. Acesso em 25 Out. 2019.
- UNWIN, J. et al. An assessment of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in the UK. *The Annals of occupational hygiene*, v. 50, n. 4, p. 395–403, jun. 2006.
- VALENTIM NETO, P.A. Possíveis causas da mortalidade do Caranguejo-Uçá (*Ucides cordatus* (LINNAEUS, 1763) no estuário do Rio Jaguaribe - Ceará. 2004. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) – Instituto de Ciências do Mar – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2004.
- VAN DIJK, T. C.; VAN STAALDUINEN, M. A.; VAN DER SLUIJS, J. P. Macro-invertebrate decline in surface water polluted with imidacloprid. *PloS one*, v. 8, n. 5, p. e62374, 2013.
- WATER AID. *Beneath the Surface: The State of the World's Water 2019*. p. 24, 2019. Disponível em <https://washmatters.wateraid.org/publications/beneath-the-surface-the-state-of-the-worlds-water-2019>. Acesso em: 25 out. 2019.

Recebido em: 30/03/2021

Aceito para publicação em: 23/05/2021

9.6. Anexo 7



9.7. Anexo 8

Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021997521002929?dgcid=author>

J. Comp. Path. 2022, Vol. 192, 1–10

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

www.elsevier.com/locate/jcp

SPONTANEOUSLY ARISING DISEASE

Histopathology of Endocrine Organs of Miranda's White-Lipped Frogs (*Leptodactylus macrosternum*) from Cultivated and Non-Cultivated Regions in Semi-Arid Northeastern Brazil

Roberta da Rocha Braga^{*,†}, Patricia de Menezes Gondim[‡]
and Eliana Reiko Matushima^{*}

^{*} Graduate Course of Comparative and Experimental Pathology, School of Veterinary Medicine and Zootechnics, University of São Paulo, São Paulo, [†] Academic Laboratory of Wildlife Pathology and [‡] Graduate Course of Ecology and Natural Resources, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil

Summary

Endocrine disruption defines the influence of environmental contaminants on the control of behaviour, growth and reproduction of free-living species. Amphibians are considered as bioindicators of environmental balance in aquatic and terrestrial systems and of physiological and immunological sensitivity to environmental stressors. In the Caatinga Domain of northeastern Brazil, the Lower Jaguaribe River (LJR) region is outstanding for the conservation of anurans and has considerable species diversity. However, the use of pesticides and chemical fertilisers is of increasing concern because of consequent risks to environmental, human and animal health. Miranda's white-lipped frogs (*Leptodactylus macrosternum*) are abundant and well-adapted in this region and, therefore, are considered to be a suitable bioindicator. The objective of this work was to evaluate the morphology of endocrine organs of this species for evidence of potential impacts of agrosystems. We found significantly smaller females and parathyroid cytolysis in frogs collected from cultivated areas, compared with those from non-cultivated regions. Interrenal degeneration was found in both sample populations. Chemical analysis detected pesticides and potentially toxic elements in tissues of Miranda's white-lipped frog tissues from the LJR region (data not shown). These findings suggest that the parathyroid gland acts as a biomarker of environmental toxicity in cultivated areas in the LJR region. In this study, the other examined endocrine organs did not show significant potential for use in biomonitoring the impact of toxic chemicals.

© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: amphibians; bioindicators; ecotoxicology; endocrine disruption

Introduction

The endocrine system controls physiological functions, including metabolism, growth and reproduction (Greco and Stabenfeldt, 2013). Environmental endocrinology is the study of how natural factors (eg, photoperiod, temperature and pheromones) influence the functioning of the endocrine system and

its effects on target organs and homeostasis. In the context of increasing global deforestation and anthropization of natural environments, endocrine disruption is a potential marker of the influence of environmental contaminants on the control of behaviour, growth and reproduction of free-living species (Norris and Carr, 2013).

Amphibians are considered bioindicators of environmental balance in aquatic and terrestrial systems and of physiological and immunological sensitivity

Correspondence to: R. da Rocha Braga (e-mail: robertarocha@ufc.br).

0021-9975/\$ - see front matter
<https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2021.12.002>

© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.

to environmental stressors (Sparling *et al.*, 2010). Most investigations have involved the African clawed frog (*Xenopus laevis*) but toads (*Bufo* spp) and true frogs (*Lithobates* spp) have been used for physiological, ecological, toxicological and environmental monitoring studies (Burggren and Warburton, 2007; Simon *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2016; Pulsford *et al.*, 2017). In recent years, several environmental models have used southern or tropical frogs (family Leptodactylidae) as bioindicators (Viana, 2010; Correia *et al.*, 2014).

The Caatinga Domain is a huge ecoregion characterized by subtropical vegetation in northeastern Brazil, and was previously considered to have low biodiversity. However, it is now considered to have a rich diversity of fauna and flora (Leal *et al.*, 2005). Within the Caatinga Domain, the Lower Jaguaribe River region (LJR) is outstanding for the conservation of anurans and has considerable species biodiversity (Santana *et al.*, 2015). Despite its importance, the Caatinga has received little public environmental research funding and is seriously threatened by habitat fragmentation and intensive agriculture (Antongiovanni *et al.*, 2020). In the farming context, the use of pesticides and chemical fertilisers in the irrigated perimeter of the LJR is of increasing concern with consequent risks to environmental, human and animal health (Braga and Matushima, 2021).

Amongst the LJR native anuran species, Miranda's white-lipped frog (*Leptodactylus macrosternum*) (Supplementary Fig. 1) is considered to be abundant, with a stable conservation status (AmphibiaWeb, 2021), and is therefore suitable for use as a bioindicator of environmental toxicity. Adults have a snout-vent length (SVL) of 6.0–8.0 cm, are nocturnal, generalist in eating habits and have adapted to the anthropized areas in the region (Dixon and Staton, 1976; Teles *et al.*, 2014).

There is almost no information on the evaluation of terrestrial animals as bioindicators of human, animal and environmental health in the LJR region (Braga and Matushima, 2021), and anurans are the most suitable candidate species for biomonitoring investigations. The current research project commenced with an exploration of fluctuating asymmetry and gonadosomatic indices as biomarkers of anthropogenic disturbance in anurans, and some results have been published (Gondim *et al.*, 2020). As a continuation of the project, the objective of the current study was to evaluate the morphology of endocrine organs in Miranda's white-lipped frogs in a municipality of the LJR for potential evidence of impacts of agrosystems on the health of this species.

Materials and Methods

Sampling and Study Area

Miranda's white-lipped frog specimens were collected from four different sites, each of 2–4 km², situated at least 8 km apart, in the municipality of Tabuleiro do Norte in the LJR, Ceará (5°13'04"S; 38°04'55"W) (Fig. 1).

The study region is within the Caatinga morphoclimatic domain, a semi-arid tropical climate with an average annual temperature and precipitation of 27°C and 794 mm, respectively (Ceará, 2016). Two sites (nos. 1 and 2) were defined as non-cultivated areas (2 km² naïve land areas), with herbaceous, shrubby vegetation and water bodies, and two (nos. 3 and 4) as cultivated areas (average 2–4 km²), which were at least 75% covered by commercial rice, beans, corn, bananas and pasture grasses.

Ethical Approval and Frog Collection

Frog collection was authorized by the Biodiversity Information System of the Brazilian Institute of Environment and Natural Resources (SisBio-IBAMA) (approval no. 58724-1). The Animal Ethics Committee of the University of São Paulo evaluated and approved the technical procedures (approval no. 4387250118). Approximately thirty specimens were manually collected from each site by active nocturnal searching from 18:00 to 22:00, and transported in air-filled plastic bags to a nearby field laboratory assembled for this purpose. The frogs were then immediately measured (digital caliper, precision 0.01 mm; digital scale, precision 0.01 g) and subsequently humanely euthanized with an intracardiac injection of lidocaine hydrochloride (30 mg/kg) (Brasil, 2013; Chatigny *et al.*, 2017).

Necropsy and Histological Processing

Immediately after euthanasia, samples of liver and gonads were collected for chemical analysis and histopathological examination, respectively, and the carcasses, containing the other organs, were fixed in 10% formaldehyde for 24–48 h and subsequently preserved in 70% ethanol until internal examination. At necropsy, the larynx was removed and cleaved sagittally to access the thyroid glands. The parathyroid glands and pancreas were examined grossly, whereas the thyroid and interrenal glands could only be microscopically evaluated. All tissue samples were processed routinely for histological examination and sections cut (5 µm) and stained with haematoxylin and eosin (HE). Selected sections containing

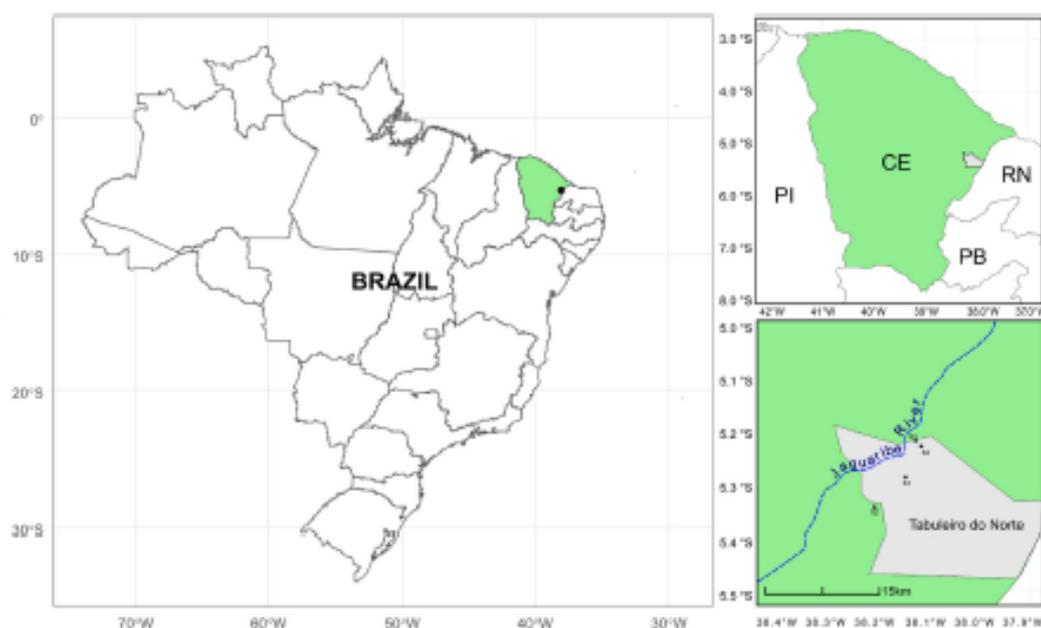


Fig. 1. Location of study sites (S1, S2, S3 and S4) in Tabuleiro do Norte municipality (grey) in Ceará State (CE, green), northeastern Brazil. The Jaguaribe River originates in the southwest state and flows through the west of Tabuleiro do Norte to the northeast coast of Brazil. PI, Piauí State; PB, Paraíba State; RN, Rio Grande do Norte State.

granulomas were stained with Ziehl–Neelsen. Due to the reduced size of the target organs in some frogs, some sections had insufficient quantity or quality of tissue to be analysed and were therefore excluded from the study. The histological alterations were classified categorically (ie, presence or absence, ranking and factors).

Statistical Analysis

The main findings were presented in a table with absolute and relative frequency data. The pathological alterations were tabulated together with demographic variables (specimen identification, area status [cultivated or non-cultivated], SVL and sex) for analysis by Pearson's chi-square test and generalized linear models (GLMs) in Software R, v.4.0.2 (R Core Team, 2020). Tissues of 100 frogs were included in the analysis (cultivated area: 29 females, 20 males; non-cultivated area: 36 females and 14 males). Alpha <math><0.05</math> was considered statistically significant.

Results

Snout–Vent Length

Mean SVL was significantly higher in frogs from the non-cultivated areas, compared with those from cultivated regions (Table 1).

Thyroid Gland

At necropsy, the thyroid glands could not be observed with the naked eye. Despite the use of topographical anatomy references (Holmes, 1924; Minkoff, 1975; Wiechman and Wirsig-Wiechman, 2003), it was not possible to visually locate them in their normal anatomical position within the ventral laryngeal muscle of the frogs. On histological examination, thyroid glands were identified in only seven frogs, all from non-cultivated areas, and did not exceed $0.8 \times 0.8 \times 0.4$ mm. Nodular goitre was detected in 3/7 (42.8%) of these frogs (Table 2; Fig. 2A). All affected frogs were female, from

Table 1
Mean snout–vent length (SVL) of Miranda's white-lipped frogs from cultivated and non-cultivated areas from Tabuleiro do Norte

Sex	Mean SVL \pm SE (n)				P value
	Number	Non-cultivated area	Number	Cultivated area	
Female	36	6.98 \pm 1.09	29	6.00 \pm 1.03	0.0001***
Male	14	7.13 \pm 1.23	20	6.68 \pm 1.04	0.2631
Mean SVL	50	7.02 \pm 1.12	49	6.25 \pm 1.08	0.0007***

Significance code: *** 0.001, using Pearson's chi-square test.

Table 2
Endocrine alterations in Miranda's white-lipped frogs (n = 100) from cultivated and non-cultivated areas in Tabuleiro do Norte

<i>Organ/tissue</i>	<i>Lesion</i>	<i>No. with lesion</i>	<i>% from cultivated areas</i>	<i>% from non-cultivated areas</i>
Thyroid gland	Colloid nodular goitre	3*	42.8	—
Parathyroid gland	Granulocytic infiltration	9	20.0	9.6
	Congestion	4	8.3	2.9
	Granulomas	5	5.5	8.8
	Interstitial fibrosis	2	—	5.8
	Coccidia infection (suspected)	2	2.7	2.9
	Focal microcysts	2	—	5.8
Islets of Langerhans	Hyperplasia	19	32.3	20.0
	Vacuolar degeneration	4	—	8.3
Interrenal glands	Adrenocortical vacuolar degeneration	37	34.1	60.5
	Chromaffin cell vacuolar degeneration	34	31.7	55.2
	Congestion	24	26.8	34.2
	Adrenocortical hyperplasia	21	31.7	21.0
	Mononuclear cell infiltration	21	24.3	28.9
	Angiectasis	14	19.5	15.8
	Focal microcysts	5	9.8	2.6
	Adrenocortical necrosis	4	4.9	5.2
	Residual bodies	3	2.4	5.2
	Periarteriolar fibrosis	2	—	5.2

*; thyroid gland tissue was identified in only 7 frogs.

—; not observed.

collection site no. 3 (cultivated area) and had a mean SVL of 6.09 cm. The small sample size precluded statistical analysis.

Parathyroid Gland

Despite their small size, the parathyroid glands were readily identified on the cranioventral aspect of the ascending curve of both branches of the external jugular vein in all examined frogs. They were ovoid ($0.21 \times 0.17 \times 0.09$ cm on average), whitish and had an elastic consistency and a smooth capsule. No macroscopic alterations were identified on the external or cut surfaces. The most frequent histopathological alteration was mild diffuse subcapsular granulocytic (heterophilic) infiltration (Table 2; Figs. 2B–D). The GLM indicated a significant effect of the area from which the frogs had been collected (cultivated versus non-cultivated), size and age on this lesion (Table 3). The granulocytic infiltrate was negatively correlated with parenchymal organization ($\alpha = -2.085$, $P = 0.037$).

Granulomas and congestion of the parathyroid parenchyma were slightly more frequent in frogs from cultivated areas than from non-cultivated, especially in females, but with no statistical significance. The other findings in the parathyroid glands (Table 2) were considered as incidental with no significant differences between cultivated and non-cultivated areas.

Islets of Langerhans

The pancreas was the most accessible organ for macroscopic and microscopic evaluation, and was present in 93/100 (93%) of histological samples suitable for examination. The islets of Langerhans were identified microscopically as clusters of elongated cells with mildly acidophilic cytoplasm located in the acinar parenchyma. Isolated, elongated or polygonal endocrine cells were also distributed in multiple foci among the acini. Islet hyperplasia was detected with moderate frequency, and more frequently in females from the cultivated areas, compared with all other frogs. There was no significant influence of sampling site or body size on islet hyperplasia. Islet hyperplasia (Fig. 2E) was considered relative because the number of cells in most samples of pancreas did not exceed 10 per islet. (A maximum of one or two islets per sample of were seen in the examined pancreas samples). Islet degeneration (Fig. 2F) was also occasionally observed. The exocrine pancreas showed more frequent changes than the endocrine region, including focal and extensive acinar degeneration, parenchymal necrosis and mild to moderate inflammation of the choledochal duct.

Interrenal Glands

The interrenal glands were evaluated in 79/99 (79.8%) of the suitable histological sections. They

were characterized by groups of polyhedral adrenocortical cells with scant cytoplasm and polyhedral chromaffin cells with reddish-brown cytoplasm, embedded in the ventromedial aspect of the kidneys. Normal appearing interrenal glands occupied 9–10% of the cross-sectional kidney area.

Several alterations were observed in the interrenal glands at moderate frequency. Adrenocortical cell degeneration was the most frequent change, followed by adrenocortical hyperplasia and vacuolar degeneration of chromaffin cells. In the collection sites + sex model, GLM indicated that adrenocortical vacuolar degeneration was directly influenced by sex (a significantly higher prevalence in males) and inversely by cultivated collection sites (significantly for S3, Table 4). The model suggests these alterations and chromaffin cell degeneration were associated mainly with the non-cultivated areas. GLM did not confirm an effect of area status but demonstrated that animal size and age directly influenced degeneration and inversely hyperplasia (Table 5). There were no significant differences in the frequency of other alterations (Table 2) between cultivated and non-cultivated areas and no effect of frog size or age (Figs. 2G and H).

Discussion

The overall size of adult frogs from cultivated areas was significantly smaller than those from non-cultivated areas. Ecological studies have demonstrated that agrosystem environments can have deleterious effects on the health of amphibians, including a reduction in the growth rates of both larvae and adults (Hedge and Krishnamurthy, 2014; Wood and Welch, 2015). In recent decades, laboratory trials and field research have demonstrated an adverse effect of pesticides on the development, metamorphosis and growth of amphibians (Boone *et al.*, 2001; Relyea, 2004; Rohr *et al.*, 2006; Bókony *et al.*, 2018; Adelizzi *et al.*, 2019). Zamora-Camacho and Comas (2017) concluded that individuals from a cultivated area had faster growth and a shorter lifespan and, for this reason, increased their energy investment in reproduction. Thyroid hormones are the main factors regulating amphibian metamorphosis (Galton, 1992). We observed colloid nodular goitre in frogs from one of the cultivated sites. Requena *et al.* (2019) found an increased prevalence of thyroid diseases, including nodular goitre, in individuals exposed to pesticides in agricultural areas. Colloid nodular goitre is the morphological representation of hypothyroidism and is characterized by multiple follicles of irregular size and shape, which are distended by colloid and surrounded by cubic, columnar or flattened follicular cells at various stages

of metabolic activity (La Perle, 2012). Although such thyroid changes could explain the delayed growth or reduced size of adults from the cultivated areas, the sample size in this study was too small to confirm this hypothesis.

The parathyroid glands of the frogs examined in this study had several alterations, including peripheral granulocytic infiltrates, which were significantly most frequent in the largest individuals from the cultivated areas. A significant correlation was found between the granulocytic infiltrates and the reduction in parathyroid gland parenchyma. According to Weckman *et al.* (2014), endocrine glands recycle hormones and specialized cellular components by autophagy after periods of significant demand. Neutrophils (similar to 'heterophils' from ectothermic species) are professional phagocytic granulocytes that act in autophagy pathways and can be activated by phagocytosis of pathogens or toxins (Weckman *et al.*, 2014). Amphibian parathyroids undergo seasonal parenchymal cytolysis during winter in the northern hemisphere, regenerating with the arrival of spring. However, as this cyclic feedback had not occurred in anurans held in captivity, it was believed that suppressing stimuli from natural habitats led to changes in the parathyroid cycle (Boschwitz, 1967). In this study, all sampling was completed within 30 days in the same season, which excludes seasonal cytolysis as a cause of this change. The presence of peripheral granulocytes and sparse parenchymal cells may indicate autophagy to limit pathogenic processes, hypercalcaemic suppression of parathyroid hormone or removal of cellular components due to starvation.

Hyperplasia of islets of Langerhans is usually observed in obese mammals (Jones *et al.*, 2010) and has been associated with environmental contamination by androgenic or xenoandrogen steroids (Evans, 2007; Weinand and Kemp, 2018). Selective degeneration of the islets is reported in diabetic dogs, either as spontaneous change or secondary to pancreatitis (La Perle, 2012). Environmental causes related to diabetes include arsenic and dioxin hydrocarbons (Parker *et al.*, 2002). Lesions in the exocrine pancreas were also detected in the frogs in this study, which may indirectly affect the integrity of the islets, depending on the degrees of parenchymal inflammation (Gilor *et al.*, 2020).

Preliminary chemical analysis has detected at least one class of pesticide in the liver (45.0%) and fat bodies (61.2%) of the sampled frogs and potentially toxic concentrations of chromium, manganese, iron, cobalt, nickel, copper, zinc, arsenic, cadmium and lead in all carcasses (data not shown). The organochlorinated insecticide endosulfan was the most commonly detected pesticide in the examined tissues.

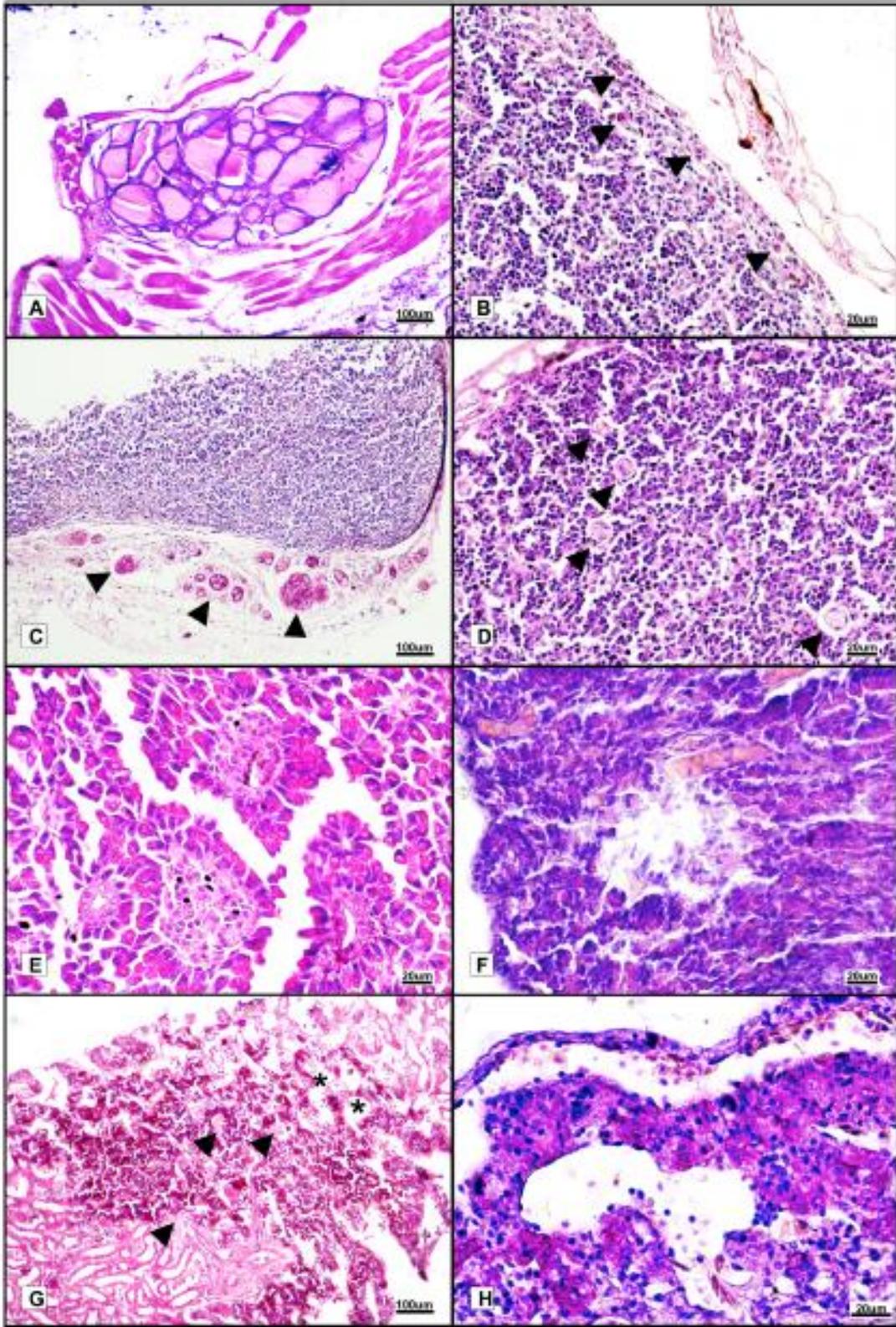


Table 3
Generalized linear model output showing alpha < 0.05 in parathyroid glands with granulocytic inflammation of adult Miranda's white-lipped frogs from cultivated areas of Tabuleiro do Norte

	Estimate	SE	z-value	Pr(> z)
(Intercept)	-173.744	57.338	-3.030	0.00244**
Area status	21.841	0.9604	2.274	0.02296*
SVL	19.586	0.7174	2.730	0.00633**

Null deviance: 53.713 on 69 degrees of freedom. Residual deviance: 39.401 on 67 degrees of freedom. (30 observations excluded due to unsuitable tissue samples).

Akaike information criterion: 45.401.

Area status: non-cultivated (0) and cultivated (1) areas.

SE, standard error; SVL, snout-vent length; Significance codes: * 0.05; ** 0.01.

Table 4
Generalized linear model output showing alpha < 0.05 in adrenocortical and chromaffin cell degeneration in adult Miranda's white-lipped frogs from Tabuleiro do Norte (CE), according to sampling site and sex

Adrenocortical cells	Estimate	SE	z-value	Pr(> z)
(Intercept)	0.13875	0.55167	0.252	0.8014
S2	0	0.69494	0	0.8968
S3	-173.208	0.82094	-2.110	0.0349*
S4	-106.502	0.71691	-1.486	0.1374
Sex	112.554	0.55188	2.039	0.0414*

Chromaffin cells	Estimate	SE	z-value	Pr(> z)
(Intercept)	12619	0.6573	1.920	0.05487
S2	-18.224	0.7776	-2.344	0.0191*
S3	-25.742	0.879	-2.929	0.0041**
S4	-20.449	0.7946	-2.573	0.01007*
Sex	0.3269	0.5379	1	0.32728

Null deviance: 107.93 on 77 degrees of freedom.

Residual deviance: 97.12 on 73 degrees of freedom; Akaike information criterion: 107.12.

Null deviance: 106.845 on 77 degrees of freedom.

Residual deviance: 94.582 on 73 degrees of freedom; Akaike information criterion: 104.58.

SE, standard error; S2, S3, S4, sampling sites; Significance codes: *, 0.05; **, 0.01.

Table 5
Generalized linear model output showing alpha < 0.05 in adult Miranda's white-lipped frogs with adrenocortical cell hyperplasia from Tabuleiro do Norte (CE) regardless of area status

	Estimate	SE	z-value	Pr(> z)
(Intercept)	299.513	180.078	1.663	0.096
Area status	0.08591	0.57685	0.149	0.882
SVL	-0.61974	0.25646	-2.417	0.016*

Null deviance: 91.491 on 78 degrees of freedom. Residual deviance: 83.957 on 76 degrees of freedom (21 observations excluded due to unsuitable tissue samples). Akaike information criterion: 89.957.

Area status: non-cultivated (0) and cultivated (1) areas. SVL, snout-vent length.

SE, standard error; Significance code: *, 0.05.

Its toxicity comprises gonadal, thyroid and adrenocortical cell disruption (Goulet and Hontela, 2003; Da Cunha *et al.*, 2016; Leemans *et al.*, 2019). The adrenal gland is extremely sensitive to toxic injuries and, among agrochemicals, 2-chloro-s-triazine herbicides and organochlorine insecticides have been reported to affect adrenal steroidogenesis and cause selective necrosis of the adrenal cortex (Hinson and Raven, 2006; Gupta, 2007). In the current study, diffuse multifocal adrenocortical vacuolar degeneration was mainly found in males from non-cultivated areas.

Although when planning the study, we classified the IJR study sites as 'cultivated' or 'non-cultivated' and assumed that agriculture was only practised in cultivated areas, this assumption is not entirely correct. Pesticides can be transported long distances. After breakdown, they volatilize, condense in the atmosphere and precipitate in rain, potentially contaminating vast areas of land and water bodies (Souza *et al.*, 2020). The Tabuleiro do Norte municipality is under high hydric vulnerability to agrochemical contamination due to its susceptibility to flooding and the consequent dispersion of chemicals through leaching and soil infiltration (Soares *et al.*, 2020). Furthermore, our preliminary chemical analyses

Fig. 2. Histological alterations in endocrine organs of Miranda's white-lipped frogs from cultivated areas of Tabuleiro do Norte. (A) Colloid nodular goitre, thyroid gland. Macro- and micro-follicles, predominantly lined by flattened follicular epithelium. Larger follicles filled by dense eosinophilic colloid with paler colloid in smaller follicles. HE. (B) Peripheral mild granulocytic inflammation (arrowheads), parathyroid gland. Scarce parenchyma composed of glandular arrangement of dark chief cells, with granulocytes (predominantly neutrophils) in peripheral sinuses. HE. (C) Granulomatous inflammation, parathyroid gland. Multilocular granulomas in adjacent connective tissue (arrowheads). Granulomatous nodules (30–100 µm diameter) have smooth acidophilic capsule, multiple vacuoles with granular lamelated content, epithelioid macrophages and fibroblasts. HE. (D) Parathyroid gland. Spherical structures (13 µm diameter) in vacuoles without significant inflammatory reaction, suggestive of coccidial schizonts (arrowheads). HE. (E) Hyperplasia, islets of Langerhans. Largest islet contains more than 40 cells with increased nuclear:cytoplasmic ratio. HE. (F) Endocrine cell degeneration (centre), islet of Langerhans. HE. (G) Adrenocortical and chromaffin cell degeneration, in terrenal gland. Adrenocortical vacuolation and shrunken chromaffin cells. Focal microcysts (arrowheads) and angiectasis (asterisks). HE. (H) Adrenocortical necrosis, in terrenal gland. HE.

indicate a statistically significant effect of cadmium on testicular activity of Miranda's white-lipped frogs (Braga *et al.*, 2021), which suggests endocrine disruption by potentially toxic elements in this sample. In addition to the potential impact of agrochemicals, several xenobiotics, aromatic hydrocarbons and potentially toxic metals may deposit in non-inhabited areas by urban sewage dump (Hoffman *et al.*, 2003). It is known that the most significant urban centres along the Jaguaribe River Valley may discharge 1.8–4 million litres of sewage/day into the Jaguaribe River (Stuart, 2013). Pesticides and a wide range of anthropic factors can induce interrenal gland alterations, including cadmium, exogenous glucocorticoids, industrial organochlorine solvents, ketoconazole, etomidate and mitotane, among many others (Hinson and Raven, 2006). Recently, it has been shown that androgens protect the adrenal gland from ageing changes in mice (Gannon *et al.*, 2019). Xenoandrogens may have affected normal androgen levels in frogs from non-cultivated areas of the IJR region, indirectly causing precocious degenerative lesions in the interrenal gland.

In summary, white-lipped frogs from cultivated areas of Tabuleiro do Norte, were smaller, especially the females. They also had scarce parathyroid parenchyma and significant granulocytic infiltrates, which may have been associated with primary clinical hypoparathyroidism, although we do not have associated data. Other endocrine morphological alterations, including hyperplasia of islets of Langerhans and nodular colloid goitre, were present at moderate frequencies and were suggestive of endocrine disruption in frogs from cultivated areas. The interrenal glands had significant alterations, mainly in males from non-cultivated areas. We do not know whether these changes were associated with other sources of contamination in areas believed to be free from agrochemical influences. The low frequency and mild degree of severity of the alterations may represent chronic processes, which may be associated with this species's level of adaptation to the anthropized environment. Our findings suggest that the parathyroid gland is a suitable biomarker of toxic insults in cultivated areas and that the other examined organs may be potential biomarkers, which should be evaluated collectively to produce relevant information for biomonitoring. We are currently performing statistical analysis of chemical analyses results in order to determine any relationship with the pathological changes found in this study.

Acknowledgments

The authors thank Mauro de Mattos of the Veterinary Pathology Department, School of Veterinary

Medicine and Animal Science, University of São Paulo, for the excellent histological sections, Dr Daniel Viana (Pathovet Laboratory, Fortaleza, Ceará) for additional slides and technical advice, and Dr Paulo Cascon for advice on the field work.

Funding

The authors acknowledge financial support from the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; grant no. 402241/2016-9) and the Veterinary Pathology Department, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo (AUX PE-PROEX 1024/2019).

CRedit Author Statement

PM Gondim: Conceived the idea with RR Braga, wrote draft project, secured financial resources and performed fieldwork including collection of specimens. **RR Braga:** Conceived the idea with PM Gondim, developed the theory, performed computations, carried out the experiment, performed statistical analysis and wrote the current manuscript. **Matshima ER:** Encouraged RR Braga to investigate subtle aspects of histopathology, advised her about available literature and acted as supervisor. All authors discussed the results and contributed to the final manuscript.

Conflict of Interest Statement

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship or publication of this article.

Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2021.12.002>.

References

- Adelizzi R, Portmann J, Van Meter R (2019) Effect of individual and combined treatments of pesticide, fertiliser, and salt on growth and corticosterone levels of larval southern leopard frogs (*Lithobates sphenocephala*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **77**, 29–39.
- AmphibiaWeb. (2021) *University of California, Berkeley, California, USA*. <https://amphibiaweb.org>. (1 July 2021).
- Antongiovanni M, Venticinque EM, Matsumoto M, Fonseca CR (2020) Chronic anthropogenic disturbance on Caatinga dry forest fragments. *Journal of Applied Ecology*, **57**, 2064–2074.
- Bókony V, Úveges B, Ujhegyi N, Verebelyi V, Nemesházi E *et al* (2018) Endocrine disruptors in breeding ponds and reproductive health of toads in

- agricultural, urban and natural landscapes. *The Science of the Total Environment*, **634**, 1335–1345.
- Boone MD, Bridges CM, Rothermel BB (2001) Growth and development of larval green frogs (*Rana clamitans*) exposed to multiple doses of an insecticide. *Oecologia*, **129**, 518–524.
- Boschwitz D (1967) On the problem of seasonal changes in anuran parathyroids: observations on *Bufo viridis* in Israel. *Israel Journal of Zoology*, **16**, 46–48.
- Braga RR, Matushima ER (2021) Jaguaribe Valley: a threatened oasis in the Brazilian semi-arid region – systematic review on environmental contamination and potential hazard to the basin and its users. *Revista de Geociências do Nordeste*, **7**, 24–34.
- Braga RR, Gondim PM, Martins AC, Pereira RM, Batista BL *et al* (2021) Influência do Cádmio sobre a atividade testicular em *Leptodactylus macrosternum* (Anura: Leptodactylidae) de agrossistemas no nordeste do Brasil. In: *Anais do VI Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária*. Brasil. (2013) Resolução Normativa nº 13 de 20 de setembro de 2013. Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA. In: *Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação*, Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, p 54.
- Burggren WW, Warburton S (2007) Amphibians as animal models for laboratory research in physiology. *The Institute for Laboratory Animal Research Journal*, **48**, 260–269.
- Ceará. (2016) *Tabuleiro do Norte - Perfil Básico Municipal*. Secretaria de Gestão e Planejamento, Fortaleza. https://www.ipece.ce.gov.br/wp-content/uploads/sites/45/2018/09/Tabuleiro_do_Norte_2016.pdf. (Accessed 24 May 2021).
- Chatigny F, Kamunde C, Creighton CM, Stevens ED (2017) Uses and doses of local anesthetics in fish, amphibians, and reptiles. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*, **56**, 244–253.
- Correia LO, Siqueira Júnior S, Carneiro PLS, Bezerra MA (2014) Evaluation of the use of *Leptodactylus ocellatus* (Anura: Leptodactylidae) frog tissues as bioindicator of metal contamination in Contas River, northeastern Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, **86**, 1549–1561.
- Da Cuña RH, Rey Vázquez G, Dorelle L, Rodriguez EM, Guimarães Moreira R *et al* (2016) Mechanism of action of endosulfan as disruptor of gonadal steroidogenesis in the cichlid fish *Cichlasoma dimerus*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology: CBP*, **187**, 74–80.
- Souza RM, Seibert D, Quesada HB, de Jesus Bassetti F, Fagundes-Klen MR *et al* (2020) Occurrence, impacts and general aspects of pesticides in surface water: a review. *Process Safety and Environmental Protection*, **135**, 22–37.
- Dixon J, Staton M (1976) Some aspects of the biology of *Leptodactylus macrosternum* Miranda-Ribeiro (Anura: Leptodactylidae) of the Venezuelan Llanos. *Herpetologica*, **32**, 227–232.
- Evans TJ (2007) Reproductive toxicity and endocrine disruption. In: *Veterinary Toxicology*, 1st Edit, RC Gupta, Ed, Academic Press, Cambridge, pp 206–244.
- Galton VA (1992) The role of thyroid hormone in amphibian metamorphosis. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, **3**, 96–100.
- Gannon AL, O'Hara L, Mason JI, Jørgensen A, Frederiksen H *et al* (2019) Androgen receptor signaling in the male adrenal facilitates X-zone regression, cell turnover and protects against adrenal degeneration during ageing. *Scientific Reports*, **9**, 1–16.
- Giloi C, Pires J, Greathouse R, Horn R, Huising MO *et al* (2020) Loss of sympathetic innervation to islets of Langerhans in canine diabetes and pancreatitis is not associated with insulinitis. *Scientific Reports*, **10**, 1–9.
- Gondim PM, Rodrigues JFM, Cascon P (2020) Fluctuating asymmetry and organosomatic indices in anuran populations in agricultural environments in semi-arid Brazil. *Herpetological Conservation and Biology*, **15**, 354–366.
- Goulet BN, Hontela A (2003) Toxicity of cadmium, endosulfan, and atrazine in adrenal steroidogenic cells of two amphibian species, *Xenopus laevis* and *Rana catesbeiana*. *Environmental Toxicology & Chemistry*, **22**, 2106.
- Greco DS, Stabenfeldt GH (2013) The endocrine system. In: *Cunningham's Textbook of Veterinary Physiology*, 5th Edit, BG Klein, Ed, Saunders Elsevier, St. Louis, pp 359–373.
- Gupta RC (2007). In: *Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles*, 1st Edit, RC Gupta, Ed, Academic Press, San Diego.
- Hegde G, Krishnamurthy SV (2014) Health status of common frog *Fejervarya limncharis* (Anura: Ranidae) in rice-paddy agroecosystems of Western Ghats, India. *American-eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, **14**, 1492–1497.
- Hinson JP, Raven PW (2006) Effects of endocrine-disrupting chemicals on adrenal function. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, **20**, 111–120.
- Hoffman DJ, Rattner BA, Burton GA Jr., Cairns J Jr. (2003) *Handbook of Ecotoxicology*, 2nd edition. Lewis Publishers, Danvers, p 191.
- Holmes SJ (1924) Internal secretion and the ductless glands. In: *The Biology of the Frog*, 3rd Edit, Macmillan, New York, pp 219–228.
- Jones HB, Nugent D, Jenkins R (2010) Variation in characteristics of islets of Langerhans in insulin-resistant, diabetic and non-diabetic-rat strains. *International Journal of Experimental Pathology*, **91**, 288–301.
- La Perle KMD (2012) Endocrine system. In: *Pathological Basis of Veterinary Diseases*, 5th Edit, JF Zachary, MD McGavin, Eds, Elsevier Mosby, St. Louis, p 1339.
- Leal IR, Silva J, Tabarelli M, Lacher T Jr. (2005) Mudando o curso da conservação da biodiversidade na Caatinga do Nordeste do Brasil. *Megadiversidade*, **1**, 139–146.
- Leemans M, Couderq S, Demeneix B, Fini J-B (2019) Pesticides with potential thyroid hormone-disrupting effect: a review of recent data. *Frontiers in Endocrinology*, **10**.
- Liu LS, Zhao LY, Wang SH, Jiang JP (2016) Research proceedings on amphibian model organisms. *Dongxue Yanjiu*, **37**, 237–245.

- Minkoff ECA (1975) *A Laboratory Guide to Frog Anatomy*. Pergamon Press, Elmsford, p 101.
- Norris DO, Carr J (2013). In: *Vertebrate Endocrinology*, DO Norris, J Carr, Eds, 5th Edit. Academic Press, London.
- Parker VG, Mayo RM, Logan BN, Holder BJ, Smart PT (2002) Toxins and diabetes mellitus: an environmental connection? *Diabetes Spectrum*, **15**, 109–112.
- Pulsford SA, Lindenmayer DB, Driscoll DA (2017) Reptiles and frogs conform to multiple conceptual landscape models in an agricultural landscape. *Diversity and Distribution*, **23**, 1408–1422.
- R Core Team (2020) *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.r-project.org>.
- Réyrea RA (2004) Growth and survival of five amphibian species exposed to combinations of pesticides. *Environmental Toxicology & Chemistry*, **23**, 1737–1742.
- Rohr JR, Sager T, Sesterhenn TM, Palmer BD (2006) Exposure, postexposure, and density-mediated effects of atrazine on amphibians: breaking down net effects into their parts. *Environmental Health Perspectives*, **114**, 46–50.
- Requena M, López-Villén A, Hernández AF, Parrón T, Navarro A et al (2019) Environmental exposure to pesticides and risk of thyroid diseases. *Toxicology Letters*, **315**, 55–63.
- Santana DJ, Mângia S, Silveira-Filho RR, Silva Barros LC, Andrade I et al (2015) Anurans from the Middle Jaguaribe River region, Ceará state, northeastern Brazil. *Biota Neotropica*, **15**, 1–8.
- Simon E, Puky M, Braun M, Tóthmérész B (2011) Frogs and toads as biological indicators in environmental assessment. In: *Frogs: Biology, Ecology and Uses*, JL Murray, Ed, Nova Science Publishers, Hauppauge, pp 141–150.
- Soares RB, Silva SMO, de Souza Filho de A, de Carvalho Studart TM, Frota RL (2020) Groundwater vulnerability to agrochemical contamination. *Revista Brasileira de Ciência Agrícola*, **55**, 440–455.
- Sparling D, Linder G, Bishop C, Krest S (2010). In: *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles*, 2nd ed., D Sparling, G Linder, C Bishop, S Krest, Eds, CRC Press, Boca Raton, p 916.
- Studart RS (2013) *Valoração dos serviços ambientais associada à autodepuração de água do Rio Jaguaribe—CE em um cenário de mudanças climáticas*. Master's dissertation. Federal University of Ceará, Ceará, Brazil.
- Teles D, Teixeira A, Araújo Filho J, Cabral M, Sales E et al (2014) *Leptodactylus macrosternum* (Rã-Caçote). *Diet. Herpetological Review*, **42**, 304.
- Viana SL (2010) *Evaluation of the Toxicity of the Wastewater Plant with the Bark of the Coconut in Tadpoles of Leptodactylus Vastus (Amphibia, Anura, Leptodactylidae)*. Master's Dissertation. Federal University of Ceará, Ceará, Brazil.
- Weckman A, Ieva ADI, Rotondo F, Syro LV, Ortiz LD et al (2014) Autophagy in the endocrine glands. *Journal of Molecular Endocrinology*, **52**, R151–R163.
- Wainand J, Kemp WL (2018) Pancreatic islet hyperplasia. *Academic Forensic Pathology*, **8**, 777–785, <https://doi.org/10.1177/1925362118797755>.Parker.
- Wiechman AF, Winiw-Wiechman CR (2003) *Color Atlas of Xenopus laevis Histology*. Springer, New York, p 133.
- Wood L, Welch AM (2015) Assessment of interactive effects of elevated salinity and three pesticides on life history and behavior of southern toad (*Anaxyrus terrestris*) tadpoles. *Environmental Toxicology*, **34**, 667–676.
- Zamora-Camacho FJ, Comas M (2017) Greater reproductive investment, but shorter lifespan, in a agrosystem than in natural-habitat toads. *PeerJ*, **5**, <https://doi.org/10.7717/peerj.3791>.

[Received, July 26th, 2021]
 [Accepted, December 31st, 2021]

9.8. Anexo 9

Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2590182622000066>

Environmental Chemistry and Ecotoxicology 4 (2022) 124–131



Contents lists available at ScienceDirect

Environmental Chemistry and Ecotoxicology

journal homepage: www.keaipublishing.com/en/journals/environmental-chemistry-and-ecotoxicology/

Leptodactylus macrosternum (Anura: Leptodactylidae) as a bioindicator of potentially toxic chemical elements in irrigated perimeters in northeastern Brazil

Roberta da Rocha Braga ^{a,b,*}, Patrícia de Menezes Gondim ^c, Rodrigo Mendes Pereira ^d, Bruno Lemos Batista ^d, Eliana Reiko Matushima ^a

^a Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brazil

^b Laboratório Acadêmico de Patologia de Animais Silvestres (LAPS), Universidade Federal do Ceará (UFC), Ceará, Brazil

^c Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal do Ceará (UFC), Ceará, Brazil

^d Departamento de Química Analítica, Universidade Federal do ABC Paulista (UFABC), Santo André, Brazil



ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 November 2021

Received in revised form 7 February 2022

Accepted 20 February 2022

Available online 22 February 2022

Keywords:

Amphibians

Bioindicators

Potentially toxic elements

Agriculture

Ceará

ABSTRACT

Bio-monitoring programs have developed in the last decades, including the toxicity evaluation of endemic organisms in populations from polluted areas. Environmental bioindicators respond to contaminants as predictors of future damage to their population, ecosystem and human. Amphibians are considered very sensitive contamination bioindicators. Researchers in several continents have conducted ecological studies on the accumulation of potentially toxic elements in anuran tissues, especially in mining and agriculture areas. The Jaguaribe River is an important water source in northeastern Brazil, home of agriculture irrigated perimeters; but it also concerns users for increasing the risks of environmental contamination. The objective of this work was to quantify potentially toxic elements in *Leptodactylus macrosternum* carcasses, evaluating its potential as a contamination bioindicator of agrosystem areas in the Lower Jaguaribe River basin, Ceará, northeastern Brazil. The elements As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb and Zn were detected in the *L. macrosternum* carcasses' samples. There was no significant difference in the concentrations of detected metals by area status; however, analysis of variance suggested that individuals had more constant exposure to Cu, Ni, Cd and Pb in cultivated area status. The cluster analysis of chemicals indicated two optimal element groups, which proposed different compounds from diverse origins. Body index significantly influenced Mn and Pb, while sex influenced Fe and Pb accumulation. The results suggested that the *L. macrosternum* species is a conceivable local bioindicator for environmental potentially toxic elements. However, other tissues will be tested to improve their sensitivity and validate their capacity to be employed as a bio-monitoring tool.

1. Introduction

In the last century, the advance of industrialization has resulted in environmental contamination by organic, inorganic, radioactive, gaseous and nanoparticulate chemical components. Among the inorganic chemical components stand out potentially toxic elements (formerly inaccurately referred to as "heavy metals"), whose current name refers mainly to metals and metalloids contaminants that pose a toxicological risk to the environment, animals and humans [1–3].

As part of the National Pollution Discharge Elimination System, bio-monitoring programs have been developed, including the toxicity evaluation of endemic organisms in populations from affected areas [4]. Environmental bioindicators respond to contaminants as predictors of future damage to their population, ecosystem and humans [5]. The contaminants' concentration in the bioindicator tissues informs geographic and temporal distribution and their gradients and contamination circumstances [6].

In ecotoxicological monitoring, fish, birds and mammals were used as general bioindicators for years. However, after amphibian populations started to decline in the Americas, Europe and Australia, parameters of

* Corresponding author at: LAPS – NUROF – UFC, Av. Mister Hull S/N, Campus do Pici, Bloco 905, Fortaleza, Brazil.

E-mail address: robertarocha@ufc.br (R. da Rocha Braga).



Production and hosting by Elsevier on behalf of KeAi

<https://dx.doi.org/10.1016/j.eneco.2022.02.003>

2590-1826/© 2022 The Authors. Publishing services by Elsevier B.V. on behalf of KeAi Communications Co. Ltd. This is an open access article under the CCBY-NC-ND license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

those general bioindicators did not seem reliable to extrapolate to ectothermic species. Thus, species from amphibian families Ambystomatidae, Microhylidae, Hylidae, Ranidae and Bufonidae were evaluated as bioindicators, and these results were compared with those previously found in fish species. A wide sensitivity variation to organic and inorganic contaminants was observed among amphibian species, revealing higher lethal concentrations than in fish in most experiments [7].

In the last decade, researchers in several continents conducted ecological studies on the accumulation of potentially toxic elements in anuran tissues, especially in mining and agriculture areas [8–14]. In Brazil, some studies on the accumulation and effect of potentially toxic elements in wild anurans have been produced; however, only a few of them have been published in peer-reviewed journals [15,16]. Liver, kidneys, and skeletal muscle were most frequently tested, followed by long bones, skin and intestine. In most studies, those organs were analyzed separately; the entire carcass was rarely tested [17].

The Jaguaribe River is an important water source in northeastern Brazil, with 610 km long and a basin with 76,000 km² of area. It currently serves more than 2 million users [18,19]. The Jaguaribe River basin is home to the irrigated perimeters that boost the agricultural economy in the region, but it also concerns users for increasing the risks of environmental contamination. Pesticides, hydrocarbons, and potentially toxic elements have already been investigated and detected in the Jaguaribe Basin soils, sediments, water and fishes [20]. In the Middle Jaguaribe River basin, a recent survey revealed a relatively rich and diverse anuran fauna, with species that may represent adequate regional bioindicators [21]. *Leptodactylus macrosternum* is a medium-sized anuran, popularly known as “Miranda’s lipped frog”, abundant and widely distributed throughout Brazil and South America, which has already been tested as a Lower Jaguaribe River bioindicator [22].

The objective of this work was to quantify potentially toxic elements in *L. macrosternum* carcasses, evaluating its potential as a contamination

bioindicator of agrosystem areas in the Lower Jaguaribe River basin, Ceará, northeastern Brazil.

2. Material and methods

2.1. Study area

Tabuleiro do Norte (5°13'44"S 38°07'25"W) is a municipality located in Chapada do Apodi plate hill, in the Lower Jaguaribe River (LJR), Ceará, Brazil (Fig. 1). It is an important irrigated agriculture hub on the borderline between Ceará and Rio Grande do Norte states. The study area belongs to the Caatinga, a semi-arid tropical morphoclimatic domain with an annual average temperature and precipitation of 27 °C and 794 mm, respectively [23]. Different sampling sites were aggregated and classified as “A0” (non-cultivated areas; herbaceous and shrubby vegetation around water bodies; S1 and S2 sampling sites) and “A1” (cultivated areas; commercial cultures of rice, beans, corn, and banana; S3 and S4 sampling sites).

2.2. Sampling, collection and measurement

After a pilot expedition, *Leptodactylus macrosternum* species (Fig. S1 – 1) was selected as the object of study due to its size and abundance, wide distribution throughout South America, and adaptation to anthropized environments [24,25]. The specimens were manually collected at the end of the rainy season in 2017 (May–June) and immediately transported in air-filled plastic bags to a field laboratory assembled for this purpose. In the laboratory, snout-vent length (SVL) and body mass were measured.

2.3. Euthanasia and conservation

The specimens were euthanized by 30 mg/kg lidocaine hydrochloride (diluted in Ringer Solution) intracardiac injection [26,27]. After dissection,

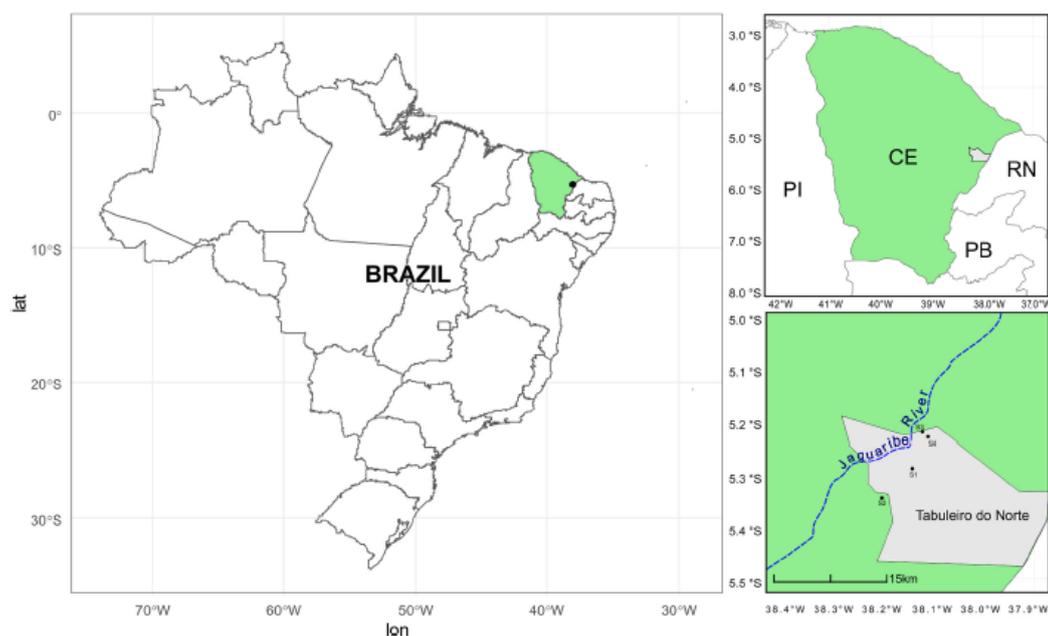


Fig. 1. Brazil, Ceará, Tabuleiro do Norte municipality. Location of the study area.

organs of interest were collected for parallel studies. The carcasses were fixed in 10% formaldehyde for 48-72 h and stored in 70% ethanol until the preparation procedures for chemical analysis. Both formaldehyde and ethanol were diluted in deionized water.

2.4. Carcasses preparation

In Academic Laboratory of Wildlife Pathology (LAPS-UFC), the carcasses were removed from 70 ethanol, air-dried for 24-48 h, followed for kiln drying at $60 \pm 5^\circ\text{C}$ for 48-72 h, until constant weight. Each dry carcass was crushed in a domestic blender (acrylic cup and stainless-steel blade) and homogenized throughout a nylon sieve (1mm² mesh).

2.5. Sample preparation

Approximately 0.2 g of dry sample were transferred to 50 mL polypropylene centrifuge tubes, and 3.0 mL of HNO₃ concentrate, previously purified in a distillation system below boiling point (DST-1000, Saville, USA), were added. The mixture rested for 48 h for the pre-digestion. After that, the samples were heated in a water bath at $95 \pm 5^\circ\text{C}$ for 4 h. Finally, the tubes were filled until the marking of 35 mL with ultrapure water (resistivity equal to 18.2 MΩ cm), obtained from a water purification system (Master System All, Gehaka, Brazil). The resulting solutions were stored under refrigeration to determine As, Ca, Co, Cr, Cu, Cd, Fe, Mg, Mn, Ni, P, Pb, S and Zn by mass spectrometry with inductively coupled plasma (ICP-MS). The essential elements Ca, Mg, P and S were correlated with potentially toxic elements to investigate what tissues these had a higher affinity for.

2.6. Analytical blank, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ)

The analytical blanks were prepared and submitted to the same steps of the sample preparation to control possible contamination from reagents or handling. The concentrations of the analytical blanks were used to obtain the LODs and LOQs, calculated according to the National Institute of Metrology, Quality and Technology recommendations [28].

2.7. Accuracy evaluation

Two certified reference materials (CRMs) were analyzed to evaluate the accuracy of the analytical method. The CRM RB-1 (bovine kidney) of the Institute of Energy and Nuclear Research (IPEN) and the CRM TORT-3 (lobster hepatopancreas) of the National Research Council - Canada (NRC) were submitted to the same procedures of the samples. In short, the results obtained from CRMs analysis did not present significant differences (Student's *t*-test, 90% confidence level) of the certified reference concentrations.

2.8. Elemental determination by ICP-MS

The samples were analyzed in triplicate in a mass spectrometer with inductively coupled plasma (ICP-MS 7900, Agilent, Hachioji, Japan) equipped with a collision cell to minimize spectral interference. The collision gas used was Helium in the following modes of analysis: [He], in which He's flow was 5 mL/min, and [HHe], in which He's flow rate was 10 mL/min. The working ranges of the calibration curves ranged from 1 to 200 µg/L for Al, As, Cd, Co, Cu, Cr, Mn, Ni, Pb and Zn, and from 100 to 5000 µg/L for Ca, Fe, Mg, P and S. In addition to the calibration curve, an internal standard (Y solution, 10 µg/L) was used to compensate matrix effects and instrument drift. It is expected that the internal standard response to be the same throughout the analysis. So, a mathematical correction factor is applied by dividing the analytical response of the calibration standards or samples by the analytical response of the internal standard for analytical signal correction. In this sense, the internal standard was pumped in from a separate bottle during the analysis and mixed with the samples using a "T" sample mixing, positioned after the peristaltic pump

and before the nebulization system. Table SI-1 shows the main operating conditions used.

2.9. Inclusion criteria

Adult individuals of both sexes, whose body mass ranged from 14 to 65 g, were included. Individuals smaller than 14 g were excluded because they would not reach the minimum mass for the analysis after being dried and crushed. Out of the total number of collected individuals, 39.8% (41/103) did not reach the final minimum mass for the ICP-MS, more than half (27/41) coming from A1.

2.10. Data analysis

Biometrics, gender, origin, and ICP-MS results data were organized in a spreadsheet. The response variables were SVL, sex, and body index, while area status and collection sites were explanatory variables. The ratio between SVL and mass defined body index. Analyte concentrations were expressed in means \pm standard deviation. The concentrations in the different area statuses were compared for the medians and variances by the Wilcoxon and F tests. Principal component analysis (PCA) explored which potential toxic elements were responsible for the higher concentration's variability in the studied individuals. To perform PCA, analyte concentrations were submitted to logarithmic transformation. Cluster analysis grouped individuals into different categories, according to the PCA. Generalized linear models (GLM) evaluated possible influences of the categories on the concentrations of the analytes in the carcasses. Statistical significance was considered $p \leq 0.05$. Statistical analyses were performed on software R version 4.1.0 [29].

2.11. Ethical aspects

The specimens were collected by SisBio/IBAMA License No. 58724-1. Handling, transport, and euthanasia were evaluated and authorized by CEUA-USP No. 4387250118.

3. Results

The final sample consisted of 63 individuals. Fig. SI-2 shows a significant difference in sizes (SVL) ($W = 637.5$, $p\text{-value} = 0.006014$) of the sampled individuals between different area statuses.

The elements As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb and Zn were detected in the *L. macrostomum* carcass samples, as shown in Fig. 2.

Cr, Fe, Cu, Co, Ni, As, Cd and Pb presented significantly different variances by area status (Table SI-2). Lower variance values suggest samples with more homogeneous and constant exposure. A higher variance may be due to younger individuals (lower SVL/lower weights) and therefore lower exposure until the time of collection. F values higher than 1 show a higher variance in A0.

Fe, Co and As showed more homogeneity of concentrations (lower variances) in A0, suggesting constant exposure and homogeneous population in size and age group.

Cu, Ni, Cd and Pb showed lower variances and slightly higher medians in A1.

One sample revealed the highest concentrations of Cr (138,152.484 mg/kg), Mn (24,439.499 mg/kg), Fe (558,616.896 mg/kg), Co (1411.087667 mg/kg) and As (80.385 mg/kg). These outlier values represented twice to 60 times the detected chemicals concentration average.

The correlations between analyses were classified as strong (≥ 0.66), moderate (0.34-0.65) and weak (≤ 0.33) (Table SI-3). Significant correlations were observed between Ca, P and Mg, which was expected since it was the predominant analysis of bone tissues and skeletal muscle. The strongest significant correlations of Zn were with Mg, Ca and P; significant correlations of lower strength were observed between Cr, Ni, Cu, As and Pb.

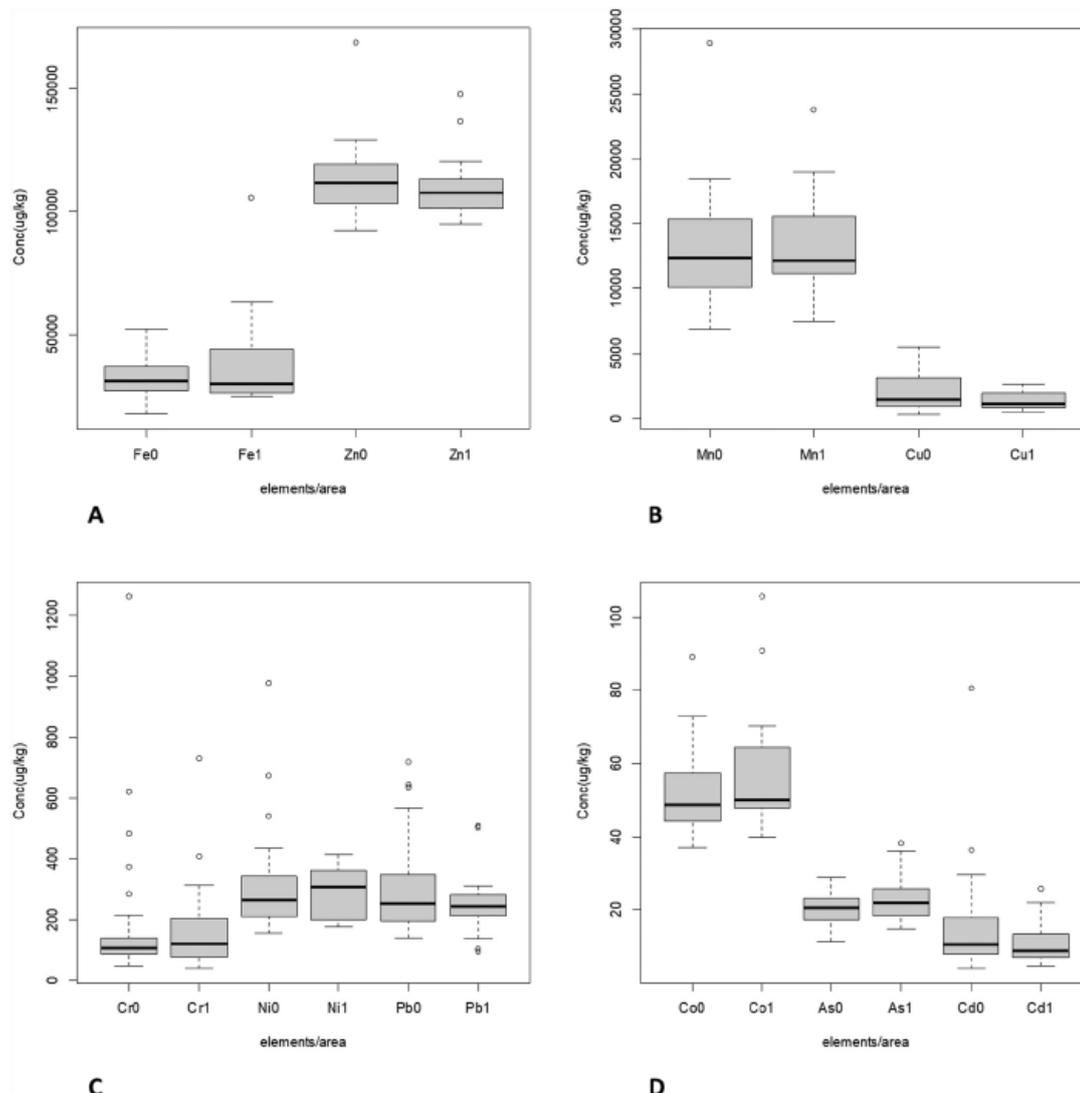


Fig. 2. Concentrations of chemical elements of toxicological importance detected in carcasses of *Leptodactylus macrosternum*, in different area statuses (0/1) (Tabuleiro do Norte, LJR, Ceará, Brazil). a) Fe and Zn; b) Mn and Cu; c) Cr, Ni and Pb; and d) Co, As and Cd.

The PCA (Fig. 3a) revealed that PC1 and PC2 accounted for 60.2% of the data set's variability. Among the metals of the principal axes: Cr and Ni had the highest correlations with PC1 (43.0%), followed by Co, Fe and As (42.9 to 36.1%); Pb had the highest correlation with PC2 (61.5%), followed by Zn and Mn (50.7 to 43.3%). Ellipses represent area statuses, confirming more dispersed data in A0 than A1.

The cluster analysis (Fig. 3b) indicated four optimal groups (clusters) of individuals, according to the chemical element concentrations in tested tissues, which would produce the maximum distance with the lowest intra-group variance (Average Silhouette Width = 0.13). Most individuals accumulated in cluster #2 ($n = 31$), followed by cluster #3 ($n = 26$), cluster #4 ($n = 5$), while an outlier individual was considered as cluster #1. The

results showed no perfect coincidence of affected individuals with area statuses; however, clusters #2, 3 and 4 were predominantly influenced by PC1 (Cr, Ni, Co, Fe and As), at the same time that the cluster #1 was essentially influenced by PC2 (Pb, Zn and Mn).

The Cluster analysis of the principal axes PC1 and PC2 is represented in Fig. 4. The dendrogram revealed the correlations between the most influential elements in each principal axis, clustering them into their probable origins.

Regarding factors influence, the GLM revealed that the body index (BI) of the individuals inversely influenced Mn and Pb concentrations; sex inversely influenced Fe concentrations, and A0 directly influenced As concentrations (Table 1). In addition, Body Calcium (BCa) concentration negatively influenced Pb concentrations.

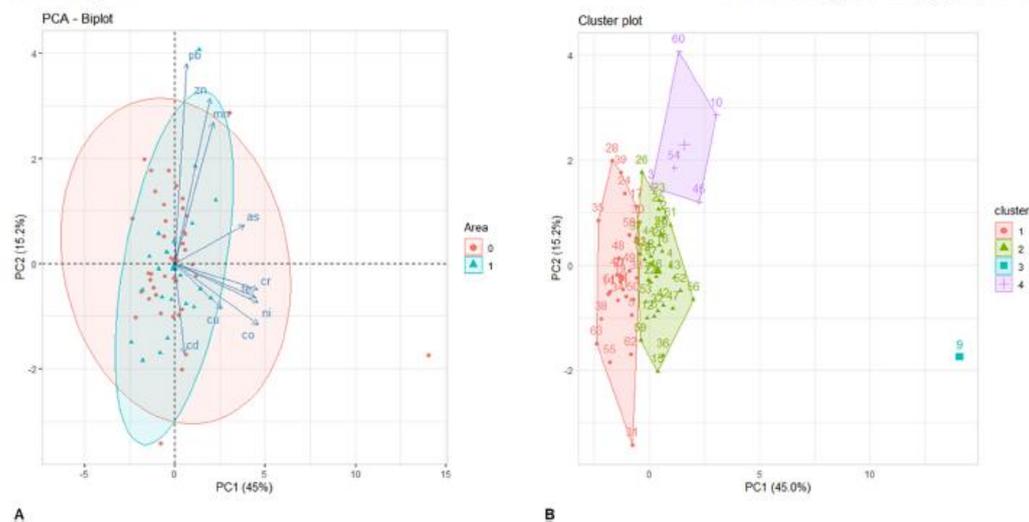


Fig. 3. Multivariate analyses of *Leptodactylus macrosternum* by detected potentially toxic chemical elements (Tabuleiro do Norte, LJR, Ceará, Brazil). a) PCA Biplot with sampled individuals distribution, variables correlation vectors to the principal axes and area status elliptical representation. b) Cluster analysis of sampled individuals regarding the concentrations of quantified elements.

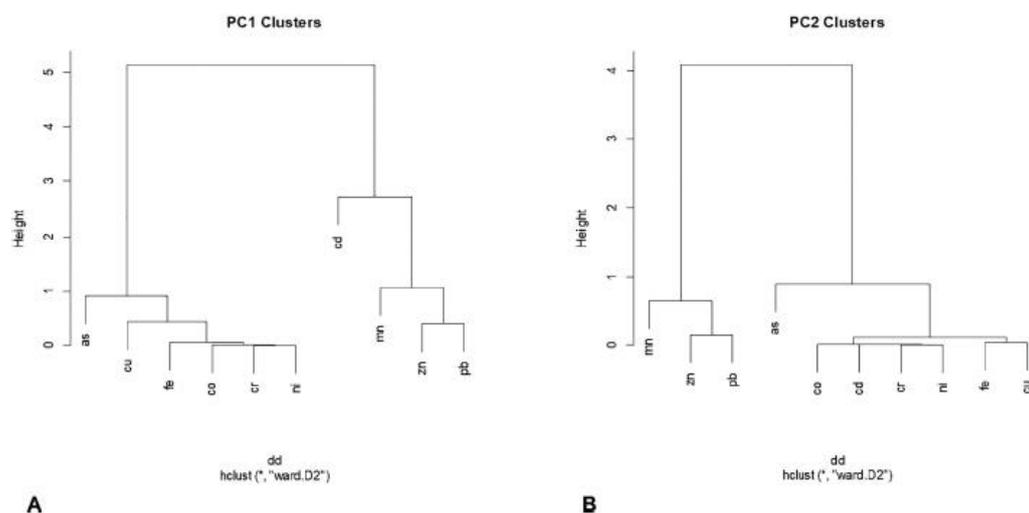


Fig. 4. Multivariate analyses of potentially toxic chemical elements detected in *Leptodactylus macrosternum* carcasses samples (Tabuleiro do Norte, LJR, Ceará, Brazil). Cluster analysis of chemical elements correlated to principal axes a) PC1 and b) PC2.

4. Discussion

According to the comparative data available in indexed journals (Table SI-4), amphibians as biomarkers of potentially toxic elements have been popularized in the last ten years. It was noticed that the concentrations

obtained in the current work are equivalent to most of the values for different species of anurans reported in the literature [14–16,30–33].

Loumbourdis and Wray (1998) compared concentrations of Al, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Rb, Sr, Mo, Cd, Cs, Ba and Pb between livers and carcasses of *Rana ridibunda* from a river in an urban area in Macedonia. It was the only work performed with whole carcasses, and the concentrations exceeded

Table 1
GLM output showing alpha lower than 5% in the relationships between Mn, Pb, Fe and As and the influence factors in *Lepidactylus macrosternum* samples (Tabuleiro do Norte, LJR, Ceará, Brazil).

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)	
Mn					
(Intercept)	9.98E-02	9.70E-03	10.291	1.30E-14	***
BI	-1.03E-01	3.99E-02	-2.582	0.0124	*
Sex - Male	-1.40E-03	6.11E-03	-0.229	0.8198	
Area status	4.81E-04	6.19E-03	0.078	0.9383	
Pb					
(Intercept)	8.00E+00	1.25E+00	6.422	2.90E-08	***
BI	-5.11E+00	2.52E+00	-2.030	0.047	*
Sex - Male	1.01E+00	4.35E-01	2.322	0.02384	*
BCa	-7.02E-08	2.11E-08	-3.334	0.00151	**
Fe					
(Intercept)	3.69E-02	4.32E-03	8.549	7.42E-12	***
BI	-2.53E-02	1.78E-02	-1.422	0.161	
Sex - Male	-5.71E-03	2.54E-03	-2.254	0.028	*
As					
(Intercept)	0.049901	0.001982	25.172	<2e-16	***
Area status	-0.007573	0.002933	-2.582	0.0123	*

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

those of other publications mentioned, including those of the current study. They found significantly higher Al, Mn, Sr and Ba values in carcasses, and Cr, Co, Ni, Cu, Mo and Cd in livers. Zn, Rb, Cs and Pb showed no significant difference between the two tissues [17].

Cr, Mn, Cu, Fe, Co, Ni, Zn, Cd and Pb have already been detected and quantified in LJR soils and water (Table S1-5) [34,35].

Mn, Fe and Zn are microminerals essential to animal metabolism. However, overexposure to Mn causes systemic toxicosis at different stages of development. Its main accumulation sites are bones, liver, kidneys, pancreas, adrenals, and pituitary. Mn toxicity targets the brain, followed by the heart and liver [36]. The concentrations quantified in the current study may also concern the accumulation in nervous tissue since entire carcasses, including brain and spinal cord, were used in the analysis.

The highest Fe concentrations are found in the liver, spleen, and bone marrow; toxicity manifests in the digestive tract, liver and myocardium when Fe exceeds the ionic binding capacity of the target organs. Free Fe ions cause oxidative damage, including the development of neurodegenerative diseases. Influence factors of Fe absorption include age and health status of the individual, digestive tract conditions, amount and chemical form of Fe, and other diet components. [37,38].

Zn is one of the most frequent metals in the Earth's crust, present in water, soil and air. Its commercial uses include antioxidant solutions, dry batteries, brass and bronze production, paints, rubber, dyes, wood preservatives and ointments [37]. According to Gupta (2007), Zn is an essential microelement of vertebrate metabolism, participates in the composition of more than 200 enzymes. Clinical signs of Zn toxicosis include hypercalcemia, azotemia, hyperphosphataemia, and granular cylindruria. Pancreatitis, arthritis, and acute renal failure are also reported [38]. Pathological findings include hepatic necrosis, acute tubular necrosis, interstitial nephritis, coagulopathies, and, in cases of chronic ingestion, sideroblastic anemia and myelodysplastic syndrome [39]. Zn average concentrations of 22.20 ± 1.51 mg/kg in liver and 7.02 ± 0.24 mg/kg in muscle (significantly higher than the control area samples) were detected in adult *Pelophylax ridibundus anurans* in polluted rivers in Bulgaria, for a concentration of 58 µg/L of Zn *in situ* [40]. The concentrations found in *L. macrosternum* carcasses of the current study represented about five times the hepatic accumulation and fifteen times the muscle accumulation observed in the anurans of Bulgaria, suggesting a higher environmental concentration of Zn or longer exposure time of samples.

As is a ubiquitous metalloid, available in organic and inorganic forms. It is used to produce insecticides, herbicides, and fertilizers, and is toxic for humans and animals. It slowly accumulates in the liver, being distributed to the spleen, kidneys, and lungs afterwards. In chronic exposure, it can

be stored in bones and keratinized skin [38]. This information reveals that the As detected and quantified in *L. macrosternum* from LJR is likely a chronic contaminant in the region, since it was detected in carcasses, bones, muscle, connective tissue and skin.

Cr, Co, Ni, Cu, Cd and Pb accumulated in *L. macrosternum* samples were lower than all (or almost all) references in amphibians in the last decade. The current environmental concentrations were possibly inferior to those from other places mentioned in the literature; however, it is remarkable to remind that the present results were due to the analysis of mixed tissues (bones, muscles, skin) and were compared with concentrations in muscle only. Another relevant issue is the differential potentially toxic elements' accumulation in tissues by biochemical affinity. The correlation matrix showed that Zn, Cr, Ni, Cu, As and Pb had strong to moderate affinity for the structural Mg, P and Ca in carcasses. According to Swaminathan (2003), 60% of organic Mg are found in the bones and 20% in skeletal muscles [41]. Thus, the carcass would be suitable for studying elements with broad organic affinity, such as Pb, or with selective affinity for carcass tissues, such as Cr, Mn, Zn and As [38,42]. Bones and muscles do not accumulate high concentrations of Cd [38]. Ni has rapid metabolic clearance; therefore, it accumulates less in most tissues except the lungs [43].

The contamination by potentially toxic elements in the LJR irrigated perimeter may originate from fertilizer and pesticide formulations. According to Gimeno-García et al. (1996), Cd, Co, Cu and Zn were observed as impurities of phosphate fertilizers; Pb and Ni as impurities from Fe and Cu salts. In pesticides, Fe, Mn, Zn, Pb, Ni, Cd and Co were detected in benticarb (Saturn G®) and molinate (Ordram®), herbicides for rhizoculture, and propineb (Antracol®), an organic fungicide of broad-spectrum [44]. However, the Jaguaribe Valley has tremendous economic potential also in the industrial sector. Development processes led to the swelling of urban centers, disorderly occupation of urban soils, and excessive solid waste production, with consequent pollution of water resources by the domestic, hospital and industrial effluents without adequate treatment [23,45].

Concerning PCA, as PC1 and PC2 together accounted for 60.2% of quantified chemical elements concentrations variance. The other principal component axes were not considered in the discussion, as they accounted for smaller amounts of variance.

The PC1 axis dendrogram revealed metal clusters most likely from the same origin. The Fe-Co-Cr-Ni cluster was linked to the same origin as the previous one. It contained metals that are used in metallurgy, batteries, and industrial manufacture [46,47]. Farthest from the terminals already mentioned, the Zn-Pb-Mn-Cd cluster comprised common origin sources, such as metallurgical processes, metal alloys, batteries, sealants, and pigments [48]. These findings might be justified by several small and medium-size metallurgical and textile companies in the Jaguaribe Valley region, including the collection sites surroundings. Implementing the Jaguaribe Valley industrial metal mechanical pole will formalize and boost this sector [49,50], increasing environmental contamination potential. Low-tech techniques are used for clandestine mining and ceramics production in the region, especially in the Tabuleiro do Norte municipality. It contributes to the erosion and pollution of soils and groundwater [51]. Due to the high adsorptive capacity, limestone rocks contain varying levels of potentially toxic elements, according to the adjacent geological formation, which can generate environmental contamination through the distribution of extracted products, such as through the dredging for soil correction [52]. According to the Government of the State of Ceará, clandestine and predatory mining in the Jaguaribe Valley is a worrying environmental issue [23].

According to the GLM output, Mn and Pb accumulation influenced body index, showing highest weight carcasses had the highest accumulations. The finding was compatible with Lombourdis & Wray (1998) [17]. Mineral deficiency and a high-fat diet can increase Pb absorption by 7 to 20 times. Young individuals absorb high Mn and Pb amounts through the digestive route. Ca deficiency allows increased Pb absorption [36,38]. Mn and Pb had positive correlations of lower strength with the structural Mg, which GLM also showed. Early chronic exposure of young individuals may justify these correlations. Anurans absorb most Ca through the skin; therefore,

dermatopathies can alter this process [53]. Mn may come from natural sources such as soil erosion or anthropogenic sources such as metallurgical activities and dry batteries, glass, leather, textiles, and fertilizers manufacturing. Other anthropogenic sources are the Mn added fuels burning, road dust suspension, quarries, construction and agriculture. Metallurgy and steel are the primary sources of air pollution by Mn [54].

In LJR surface soils, the Mn concentrations ranged from 124.6 to 349.9 mg/kg [34]. Decomposing soils, rocks and plants are natural sources of environmental Mn deposition. However, potential sources of anthropic contamination include mining (MnO₂), dry batteries manufacturing, foundries, steel, contrast solutions for medical diagnosis, water purifiers and pesticide production [36]. Fe concentrations were higher in male than in female carcasses since males have higher muscle load [55]. Fe concentrations in subsurface LJR soils reached 25,000 mg/kg. In the present study, Fe concentrations in *L. macrosternum* carcasses reached a maximum of 48 mg/kg; however, liver, spleen and bone marrow analyses could reach values up to 200 times higher than these [30]. As concentrations were higher in noncultivated areas and may be related to its natural geochemical distribution in that region [56]. In a wide-ranging literature review, Shaji et al. (2020) showed the As importance as a groundwater contaminant, reported on all continents. Natural contamination sources include volcanic and sedimentary rocks, but anthropogenic mining, oil and coal exploration have contributed more [57]. The As spread in groundwater occurs through biogeochemical processes. Frizzo (2006) coordinated a metal contamination survey in public supply waters in Ceará (Brazil), finding a value of 0.01 mg/L of As in 44 groundwater samples in the state [58]. Teixeira Filho (2016) did not find As detectable values in LJR soils [34], which refers to a possible focal anthropogenic contamination at the collection sites of the current work.

5. Conclusions

Potentially toxic elements detection and quantification in native *L. macrosternum* carcasses from Tabuleiro do Norte, LJR, were satisfactory in the present study. Cr, Co, Ni, Cu, Cd and Pb detected concentrations were lower than almost those referenced in similar studies in the last ten years. Nevertheless, it should be considered that present mixed tissues analysis was compared with reported accumulation in muscle tissue only. Fe, Co and As concentrations showed more homogeneity in noncultivated areas, while Cu, Ni, Cd and Pb showed more homogeneous values in cultivated areas; it suggested constant exposure and/or homogeneous size/age group exposure and different contamination sources between the two area statuses. One sample revealed outlier concentrations of Cr, Mn, Fe, Co and As. The individual was from noncultivated areas. These values represented up to 60 times the detected chemicals concentration average. It was interpreted as a focal source of contamination, like batteries or metallurgy wastes. The element Zn presented the highest, while Cd and Co presented the lowest affinities for the structural carcasses elements. Most of the analyzed individuals were classified under the most significant influence of Co, Zn, Fe and Pb, likely from two distinct sources. Males with the lowest body indexes and Ca structural concentrations were more affected by the Pb accumulation. Despite these findings, no significant influence of commercial cultivation areas was observed on the accumulation of the potentially toxic elements in the analyzed specimens. Diffusion of chemical contaminants to more distant regions by wind and water should be cogitated.

The results suggested that the *L. macrosternum* species is a conceivable local bioindicator for environmental potentially toxic elements. However, other tissues should be used to measure specific elements bioaccumulation.

In the current study, possible limiting for the complete evaluation of *L. macrosternum* as an environmental bioindicator of the Jaguaribe River Valley included no simultaneous chemical quantification of local soils and waters, and some aspects of the methodology, such as the evaluated tissues, their previous conservation in formaldehyde, and sample preparation techniques.

Declaration of Competing Interest

The authors declared no potential conflicts of interest concerning the research, authorship or publication of this article.

Acknowledgements

The authors would like to thank CNPq (402241/2016-9) and Dr. Paulo Cascon for funding for field collections; Dr. Wladiana Matos, Lucas Fonseca, Lauren Ramos and Giovana Rocha, from DQAFQ-UFC, for their generous assistance during pilot experiments; UFAB for the expertise and facilities to perform the chemical analysis; VPT-FMVZ-USP (AUXPE-PROEX 1024/2019) for supplies for chemical analysis.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.enceco.2022.02.003>.

References

- [1] J.H. Duffus, "Heavy metals" - a meaningless term? (IUPAC technical report), Pure Appl. Chem. 74 (2002) 793–807. <https://doi.org/10.1351/pa200274050793>
- [2] O. Pourret, A. Humsthouse, It's time to replace the term "heavy metals" with "potentially toxic elements" when reporting environmental research, Int. J. Environ. Res. Public Health 16 (2019) <https://doi.org/10.3390/ijerph1624446>.
- [3] J. Briffa, F. Sinagra, R. Bundell, Heavy metal pollution in the environment and their toxicological effects on humans, Heliyon. 6 (2020) e04691. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04691>.
- [4] U.S. Environmental Protection Agency, Technical Support Document for Water Quality-Based Toxics Control (USEPA), Office of Water Regulation and Standards, Environmental Protection Agency, Washington, D.C., 1991. EPA/505/2-90-001.
- [5] M.J. Mehncon, Bioindicators of contaminant exposure and effect in aquatic and terrestrial monitoring, in: D.J. Hoffman, B.A. Rattner, G.A. Burton Jr., J. Cairns Jr. (Eds.), Handb. Ecotoxicol. 2nd Ed. Lewis Publishers, Boca Raton 2003, pp. 257–278.
- [6] W.N. Beyer, J.P. Meador, Environmental Contaminants in Biota: Interpreting Tissue Concentrations, CRC Press, Boca Raton, 2011.
- [7] D.J. Hoffman, Wildlife toxicity testing, in: D.J. Hoffman, B.A. Rattner, G.A. Burton, J. Cairns (Eds.), Handb. Ecotoxicol, Lewis Publishers, Boca Raton 2003, pp. 257–278.
- [8] M.B. Jofré, R.L. Antón, E. Caviedes-Vidal, Lead and cadmium accumulation in anuran amphibians of a permanent water body in arid Midwestern Argentina, Environ. Sci. Pollut. Res. 19 (2012) 2889–2897. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-0795-2>.
- [9] W. Adlasing, S. Saemann, A. Grawwunder, M. Puschenreiter, A. Horvath, M. Koller-Peroutka, Amphibians in Metal-Contaminated Habitats, 49, 2013 149–158 <http://www.salamandra-journal.com>.
- [10] K. Dmowski, M. Rossa, J. Kowalska, B. Kramońka-Ostrega, Thallium in spawn, juveniles, and adult common toads (*Bufo bufo*) living in the vicinity of a zinc-mine complex, Poland, Environ. Monit. Assess. 187 (2015) <https://doi.org/10.1007/s10661-014-4141-7>.
- [11] M.D. Prokić, S.S. Borković-Mitić, I.I. Krizmanić, J.J. Mutić, J.D. Trifković, J.P. Gavrić, S.G. Despotović, B.R. Gavrić, T.B. Radovanović, S.Z. Pavlović, Z.S. Saičić, Bioaccumulation and effects of metals on oxidative stress and neurotoxicity parameters in the frogs from the *Pelophylax esculentus* complex, Ecotoxicology. 25 (2016) 1531–1542. <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1707-x>.
- [12] P. Singh, M. Dey, S.N. Ramanujam, Bioaccumulation of heavy metals in anuran tadpoles: a study in Barak Valley, Assam, Int. J. Aquat. Biol. (2016) <https://doi.org/10.12944/CWE.11.1.39>.
- [13] T.S. Kuiuwa, C.E. Mhah, D.S. Abolude, N. Lawal, M. Aminu, Determination of heavy metals in *Hoplobatrachus occipitalis* (crowned bullfrog) and water from some reservoirs in Kadawa irrigation project Kano, Nigeria, J. Appl. Sci. Environ. Manag. 23 (2020) 2131. <https://doi.org/10.4314/jasem.v23i12.8>.
- [14] P. Thanomsangad, B. Tengjaroenkul, M. Sriutthia, I. Neeratrachaphan, Heavy metal accumulation in frogs surrounding an e-waste dump site and human health risk assessment, Hum. Ecol. Risk Assess. An Int. J. 26 (2020) 1313–1328. <https://doi.org/10.1080/10807039.2019.1575181>.
- [15] L.O. Correia, S. Siqueira Júnior, P.L.S. Carneiro, M.A. Bezerra, Evaluation of the use of *Leptodactylus ocellatus* (anuran Leptodactylidae) frog tissues as bioindicator of metal contamination in Contas river, northeastern Brazil, An. Acad. Bras. Cienc. 86 (2014) 1549–1561. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201420130357>.
- [16] J.J. Zocche, L.A. Da Silva, A.P. Damiani, R.A. Mendonça, P.B. Peres, C.E.I. Dos Santos, R. Debastiani, J.F. Dias, V.M. De Andrade, R.A. Pinho, Heavy metal content and oxidative damage in *Hypsiboas faber*: the impact of coal-mine pollutants on amphibians, Arch. Environ. Contam. Toxicol. 66 (2014) 69–77. <https://doi.org/10.1007/s00244-013-9949-6>.
- [17] N. Loumbourdis, D. Wray, Heavy metal concentration in the frog *Rana risibundata* from a small river of Macedonia, Northern Greece, Environ. Int. 24 (1998) 427–431.
- [18] L.C.S. Gatto, Diagnóstico ambiental da bacia do Rio Jaguaribe, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Salvador, 1999. <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv95788.pdf>.

- [19] CEARÁ, Assembleia Legislativa, Caderno regional da sub-bacia do Médio Jaguaribe, INEP, Fortaleza, 2009. <http://portal.cogerh.com.br/wp-content/uploads/2018/09/Bacia-do-Medio-Jaguaribe.pdf>.
- [20] R.R. Braga, E.R. Marushima, Jaguaribe Valley: a threatened oasis in the Brazilian semi-arid region – systematic review on environmental contamination and potential hazard to the basin and its users, *Rev. Geociênc. Nordeste*. 7 (2021) 24–34, <https://doi.org/10.21680/2447-3359.2021v7n2D24607>.
- [21] D.J. Santana, S. Mungia, R.R. da Silveira-Filho, L.C. da Silva Barros, I. Andrade, M.F. Napoli, F. Juncá, A.A. Garda, Anurans from the middle Jaguaribe River region, Ceará state, Northeastern Brazil, *Biotropica*. 15 (2015) <https://doi.org/10.1590/1676-06032015001715>.
- [22] P.M. Gondim, J.F.M. Rodrigues, P. Cascon, Fluctuating asymmetry and organosomatic indices in anuran populations in agricultural environments in semi-arid Brazil, *Herpetol. Conserv. Biol.* 15 (2020) 354–366.
- [23] Ceará, Secretaria de Gestão e Planejamento, Tabuleiro do Norte – Perfil Básico Municipal, Fortaleza, 2016. <https://www.ipece.ce.gov.br/wp-content/uploads/sites/45/2018/09/Tabuleiro-do-Norte-2016.pdf>.
- [24] I. De La Riva, M. Maldonado, First record of *Leptodactylus ocellatus* (Linnaeus, 1758) (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) in Bolivia and comments on related species, *197* (1999) 193–197.
- [25] D.M. Borges-Nejosa, P. Cascon, Herpetofauna da área reserva da serra das Almas, Ceará, in: F. Araújo, M. Rodal, M. Barbosa (Eds.), *Análise Das Variações Da Biodiversidade do Bioma Caatinga*, Ministério do Meio Ambiente, Brasília 2005, pp. 243–258.
- [26] Brasil, Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA, Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação, Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, Brasil, https://antigo.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Anexo-Resolucao-Normativa-n-37-Diretriz-da-Pratica-de-Eutanasia.site.conce.pdf 2013.
- [27] F. Chatigny, C. Kamunde, C.M. Creighton, E.D. Stevens, Uses and doses of local anesthetics in fish, amphibians, and reptiles, *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 56 (2017) 244–253 [no.doi/10.1093/lab/56.3.244](https://doi.org/10.1093/lab/56.3.244).
- [28] Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), Guidance in Validation of Analytical Methods (in Portuguese), http://www.inmetro.gov.br/Sidojo/Arquivos/GGCRE/DOQ/DOQ-GGCRE8_05.pdf 2016.
- [29] R Core Team, R: A Language and Environment for Statistical Computing, <https://www.r-project.org/> 2021.
- [30] S.M. Marques, S.C. Antunes, B. Nunes, F. Gonçalves, R. Pereira, Antioxidant response and metal accumulation in tissues of Iberian green frogs (*Pedophylax perati*) inhabiting a deactivated uranium mine, *Ecotoxicology*. 20 (2011) 1315–1327, <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0688-z>.
- [31] I.E. Taiwo, A.N. Henry, A.P. Imbufe, O.O. Adetoro, Heavy metal bioaccumulation and biomarkers of oxidative stress in the wild African tiger frog, *Hoplobatrachus occipitalis*, 8 (2014) 6–15, <https://doi.org/10.5897/AJEST2013>.
- [32] I.Z. Qureshi, Z. Kashif, M.Z. Hashmi, X. Su, R.N. Malik, K. Ullah, J. Hu, M. Dawood, Assessment of heavy metals and metalloids in tissues of two frog species: *Rana tigrina* and *Bufo tylosis cyanophyllus* from industrial city Sialkot, Pakistan, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22 (2015) 14157–14168, <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4454-2>.
- [33] M.D. Prokić, S.S. Boroković-Mitić, I.I. Krizmanić, J.J. Mutić, J.D. Trifković, J.P. Gavrić, S.G. Despotović, B.R. Gavrilović, T.B. Radovanović, S.Z. Pavlović, Z.S. Sakić, Bioaccumulation and effects of metals on oxidative stress and neurotoxicity parameters in the frogs from the *Pedophylax esculentus* complex, *Ecotoxicology*. 25 (2016) 1531–1542, <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1707-x>.
- [34] C.D. Teixeira Filho, Teores de metais pesados em alguns solos do estado do Ceará, Universidade Federal do Ceará, 2016. <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/21621>.
- [35] M.E.S. Nobre, D.F. Gomes, S.M.S. Vasconcelos, H. Frischkorn, I.O. Lima Neto, S.K. Ferreira, D.P. Souza, Hydrochemical environmental study of the low Jaguaribe alluvial aquifer, Itaigaba - Ceará, *Rev. Do Inst. Geol.* 39 (2018) 77–92, <https://doi.org/10.33958/revig.v39i3.601>.
- [36] S.L. O'Neal, W. Zheng, Manganese toxicity upon overexposure: a decade in review, *Curr. Environ. Heal. Reports*. 2 (2015) 315–328, <https://doi.org/10.1007/s40572-015-0056-x>.
- [37] National Center for Biotechnology Information (NCBI), PubChem Element Summary for Metals, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/#query=metals2021>.
- [38] R.C. Gupta, *Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles*, 1st ed. Academic Press, San Diego, 2007.
- [39] U.M. Agnew, T.J. Slesinger, Zinc toxicity, StatPearls [Internet], StatPearls Publishing, Treasure Island, 2021 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554548/>.
- [40] Z.M. Zhelev, D.N. Amadova, G.S. Popgeorgiev, S.V. Tsonev, In situ assessment of health status and heavy metal bioaccumulation of adult *Pedophylax ridibundus* (Anura: Ranidae) individuals inhabiting polluted area in southern Bulgaria, *Ecol. Indic.* 115 (2020) 106413, <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106413>.
- [41] R. Swaminathan, Magnesium metabolism and its disorders, *Gin. Biochem. Rev.* 24 (2003) 47–66. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18568054>.
- [42] V. Bencko, F.Y.L. Foong, The history of arsenical pesticides and health risks related to the use of Agent Blue, *Ann. Agric. Environ. Med.* 24 (2017) 312–316, <https://doi.org/10.26444/aaem/74715>.
- [43] R. Eisler, Nickel Hazards to Fish, Wildlife, and Invertebrates: A Synoptic Review, Laurel, https://www.pwrc.usgs.gov/eisler/CHR_34_Nickel.pdf 1998.
- [44] E. Gimeno-García, V. Andreu, R. Boluda, Heavy metals incidence in the application of inorganic fertilizers and pesticides to rice farming soils, *Environ. Pollut.* 92 (1996) 19–25, [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(95\)00090-9](https://doi.org/10.1016/0269-7491(95)00090-9).
- [45] J.H.R. Andrade, T.R. De M. Alves, A problemática da disposição final dos resíduos sólidos na região do Vale do Jaguaribe: um olhar sobre o CGRS-VJ, II Congr. Sul-Americano Resíduos Sólidos e Sustentabilidade, IBEAS, Foz do Iguaçu 2019, pp. 1–7. <http://www.ibeas.org.br/conresol/conresol2019/IV-144.pdf>.
- [46] S. Rezaeezadeh, M.R. Hosseinzadeh, J.G. Raith, M. Mosyayed, Mineral chemistry and phase relations of Co-Ni arsenides and sulfarsenides from the Baycheh-Bagh deposit, Zanjan province, Iran, *Ore Geol. Rev.* 127 (2020), 103836 <https://doi.org/10.1016/j.oregeorev.2020.103836>.
- [47] A.R. El-Sayed, H.S. Mohran, H.M. Abd El-Lateef, Corrosion study of zinc, nickel, and zinc-nickel alloys in alkaline solutions by Tafel plot and impedance techniques, *Metall. Mater. Trans. A*. 43 (2012) 619–632, <https://doi.org/10.1007/s11661-011-0908-4>.
- [48] P.B. Tchounwou, C.G. Yedjou, A.K. Patella, D.J. Sutton, Heavy metal toxicity and the environment, *EXS*. 101 (2012) 133–164, https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4_6.
- [49] A.O. Lima, Polo de Inovação terá foco no Baixo Jaguaribe, *Diário Do Nord.* (2013) <https://diariodonordeste.verdesmares.com.br/negocios/polo-de-inovacao-tem-foco-no-baixo-jaguaribe-1.478667>.
- [50] L. Falcão, Governo do Ceará inaugura infraestrutura do Polo Metalmeccânico de Tabuleiro do Norte para fortalecer o setor e gerar empregos, *Diário Do Nord.* (2021) <https://www.ceara.gov.br/2021/09/02/governo-do-ceara-inaugura-infraestrutura-do-polo-metalmeccanico-de-tabuleiro-do-norte-para-fortalecer-o-setor-e-gerar-empregos/>.
- [51] A.F. Pantaleona, I.P. Maia, Marcas da ação antrópica na história ambiental do Rio Jaguaribe, Ceará, Brasil, *Rev. Gestão Costeira Integ.* 14 (2014) 459–468, <https://doi.org/10.5894/rgci431>.
- [52] A.P. Soares, O.L.S. Weber, O. Espírito Santo, Metais pesados em calcários do estado de Mato Grosso, *Geociências*. 34 (2015) 465–474. <http://www.ppegeo.igc.usp.br/index.php/GEOSP/article/view/8991/8255>.
- [53] G.M. Ferrie, V.C. Alford, J. Atkinson, E. Baitchman, D. Barber, W.S. Blamer, G. Crawshaw, A. Daneault, E. Dierenfeld, M. Finke, G. Fleming, R. Gagliardo, E.A. Hoffman, W. Karasov, K. Klasing, E. Koutsos, J. Lamton, S.R. Lavin, A. Lentini, S. Livingston, B. Lock, T. Mason, A. McComb, C. Morris, A.P. Pessier, F. Oles-Popelka, T. Probst, C. Rodriguez, K. Schad, K. Semmen, J. Sincage, M.A. Stamper, J. Steinmetz, K. Sullivan, S. Terrell, N. Wertan, C.J. Wheaton, B. Wilson, E.V. Valdes, Nutrition and health in amphibian husbandry, *Zoo Biol.* 33 (2014) 485–501, <https://doi.org/10.1002/zoo.21180>.
- [54] World Health Organization (WHO), Manganese, Air Quality Guidelines, 2nd ed. WHO, Copenhagen 2000, pp. 154–156. https://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0003/123078/AQG2ndEd_6_8Manganese.pdf.
- [55] N. Yekta, D.G. Blackburn, Sexual dimorphism in mass and protein content of the forelimb muscles of the northern leopard frog, *Rana pipiens*, *Can. J. Zool.* 70 (1992) 670–674, <https://doi.org/10.1139/z92-100>.
- [56] B.O. Calado, Atlas geológico do Ceará, Ministério de Minas e Energia, CPRM, Serviço Geológico do Brasil, Rio de Janeiro, 2016. https://rigeo.cprm.gov.br/bitstream/doc/18059/3/atlas_geol_ceara.pdf.
- [57] E. Shaji, M. Santosh, K.V. Sarath, P. Prakash, V. Deepchand, B.V. Divya, Arsenic contamination of groundwater: a global synopsis with focus on the Indian peninsula, *Geosci. Front.* 12 (2021) 101079. <https://doi.org/10.1016/j.gsf.2020.08.015>.
- [58] S.J. Prizzo, Elementos químicos (metais pesados) em águas de abastecimento público no Estado do Ceará, Fortaleza, <https://rigeo.cprm.gov.br/xmlui/handle/doc/10014> 2006 Accessed in Nov. 2, 2021.