



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
Fundação Instituída nos termos da Lei 5.152 de
21/10/1966 – São Luís – Maranhão
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA
SAÚDE**
**COORDENADORIA DO CURSO DE CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS (Licenciatura)**

RADNA SANTOS MALUF

EFEITO DE AGROTÓXICOS EM GIRINOS

DE *PHYSALAEMUS CUVIERI* (AMPHIBIA: ANURA: LEPTODACTYLIDAE)

São Luís
2018

RADNA SANTOS MALUF

EFEITO DE AGROTÓXICOS EM GIRINOS

DE *PHYSALAEMUS CUVIERI* (AMPHIBIA: ANURA: LEPTODACTYLIDAE)

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Ciências
Biológicas da Universidade Federal do
Maranhão como requisito para obtenção
do título de Licenciada em Ciências
Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Gilda
Vasconcellos de Andrade

Coorientador: Gildevan Nolasco Lopes

São Luís
2018

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Maluf, Radna Santos.

Efeito de agrotóxicos em girinos de *Physalaemus cuvieri*
Amphibia: Anura: Leptodactylidae / Radna Santos Maluf. -
2018.

56 f.

Coorientador(a): Gildevan Nolasco Lopes.

Orientador(a): Gilda Vasconcellos de Andrade.

Monografia (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2018.

1. Assimetria flutuante. 2. Dimetoato. 3.
Genotoxicidade. 4. Metomil. 5. Teste agudo. I. Andrade,
Gilda Vasconcellos de. II. Lopes, Gildevan Nolasco. III.
Título.

RADNA SANTOS MALUF

EFEITO DE AGROTÓXICOS EM GIRINOS

DE *PHYSALAEMUS CUVIERI* (AMPHIBIA: ANURA: LEPTODACTYLIDAE)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Maranhão como requisito para obtenção do título de Licenciada em Ciências Biológicas.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Gilda Vasconcellos de Andrade (Orientadora)

Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Silvio Gomes Monteiro

Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Marianna Basso Jorge

Universidade Federal do Maranhão

Para Hantaro com todo amor.

AGRADECIMENTOS

Ao longo desses 5 anos de graduação, o tempo passou e com ele vieram mudanças, amadurecimentos, forças, determinações, planejamentos e sonhos. Desde criança aprendi a ser determinada, a lutar e batalhar pelos meus sonhos e a ser forte mesmo nos momentos em que pensei que não conseguiria. Amei a Biologia no meu terceiro ano e lutei várias vezes para entrar no curso que queria até que enfim chegou este dia. Hoje após longos 5 anos, posso dizer que realizei o maior sonho da minha vida... de ser Bióloga.

Agradeço imensamente à Deus, por ter me concedido saúde, paciência (em poucos momentos), disposição, força pra levantar todos os dias e ir para aulas cansativas. Sem ele, nada disso seria possível. Obrigada senhor, por ter dias em que pensei em desistir e você me enviava pessoas para dizer aquilo que eu precisava, por me conduzir e não me deixar sozinha mesmo quando não acreditava mais em ti.

Aos meus pais Nasaré Maluf e Rachid Maluf por todos os ensinamentos e educação, pelo apoio e amor incondicional, pelas brigas e puxões de orelha, por ouvirem meus lamentos e todos os dias me puxarem da cama para que eu fosse para a faculdade, rirem das minhas histórias da faculdade, me ajudar nas minhas coletas, amarem a minha profissão e respeitarem sempre as minhas decisões. Não sou muito boa em demonstrar carinho e as vezes a minha forma de amar seja um pouco bruta e meio fria, mas vocês sabem que no fundo no fundo, bem lá no fundo eu sei amar vocês e que não imaginaria pais melhores para mim. Obrigada por tudo.

A minha irmã Vitória Maluf por sempre me apoiar em todos os momentos, mesmo antes de entrar na faculdade você me dizia para não desistir e continuar lutando pelo meu sonho, aos momentos pequenos e únicos que passávamos juntas, assistindo Sexy and the City, morando em Balsas e comendo besteiras todos os dias, passando a madrugada rindo e conversando besteiras. Hoje você me deu um presente ainda maior que é ser tia da Laurinha. Um presente lindo e maravilhoso que amarei pro resto da vida, um pacotinho de gente que será uma grande mulher um dia, assim como você é pra mim. Desde pequena te imitava pois sabia que você seria pra sempre meu exemplo e hoje mais do que nunca quero te ver feliz e sendo muito amada pelo meu cunhado João Victor, que também me ajudou em muitos momentos da minha vida com palavras, risadas e brincadeiras.

Sou grata a todos os professores que contribuíram com a minha trajetória acadêmica, especialmente a minha orientadora Gilda Vasconcellos de Andrade, responsável pela orientação do meu projeto e este trabalho de conclusão, que me acolheu desde o meu primeiro período do curso, sendo uma segunda mãe para mim e que pra sempre será o meu exemplo de mulher na ciência deste país. Obrigada por ser tão atenciosa, ser esta professora, mãe e amiga e que esteve presente em toda a minha caminhada profissional e pessoal, sendo paciente, brincalhona e puxando minha orelha mas nunca me deixando sozinha e acreditando no meu melhor. Obrigada por todos os ensinamentos e palavras de conforto.

Ao Luís Paulo, que de forma especial e carinhosa me deu força e coragem, me apoiando nos momentos de dificuldades.

Aos meus avós e avôs Joseana Costa, Dionízio Costa, Vitória Maluf e Jamil Maluf que me amam e amaram incondicionalmente e que me apoiaram e me ensinaram o amor e cuidado.

Aos meus amigos do Laboratório de Herpetologia Fernando, Karina, Kátya, Mallu, Susie, Gildevan, Tayllon, Reis, Carlos, Bruno, Kelly, Luciana, Príncia, Carla, Patricio e Hidayane por todos os ensinamentos, testemunhos, ajudas em coletas, risadas, cafezinhos e festinhas, por bons artigos científicos lidos e apresentados, pelas dificuldades enfrentadas juntos e pela saudade que ficará em meu coração e a amizade que vou carregar comigo.

As minhas amigas Fernanda, Alana, Manu, Blenda, por todos os momentos que passamos juntas, todos os conselhos, risos e choros e por estarem ao meu lado quando eu mais precisei.

A Dona Linair, por ser a Dona do curso de Biologia da Ufma, sem ela não seríamos nada. Cuida de tudo e de todos com muito amor e dedicação.

Agradeço a Universidade Federal do Maranhão, a CAPES, FAPEMA e CNPq por todos os auxílios e serviços ao longo desses anos.

*“A felicidade pode ser encontrada mesmo nas horas
mais difíceis, se você lembrar de acender a luz”.*

DUMBLEDORE, A. P. W.B, 2004.

EFEITO DE AGROTÓXICOS EM GIRINOS

DE *PHYSALAEMUS CUVIERI* (AMPHIBIA: ANURA: LEPTODACTYLIDAE)

RESUMO:

Embora o nosso país seja o que possui maior riqueza de espécies de anfíbios, é um dos líderes em consumo de agrotóxicos, que afetam negativamente esse grupo de animais. Através do ensaio cometa podemos monitorar danos no DNA devido a contaminantes tóxicos, incluindo os agrotóxicos. Estudos na morfologia, como os de assimetria flutuante, avaliam o efeito dos contaminantes ambientais na simetria bilateral dos organismos. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar o efeito dos inseticidas Agritoato® 400 e Brilhante BR® em girinos da espécie *Physalaemus cuvieri* através do ensaio cometa e de variações na assimetria flutuante. As desovas foram coletadas na Ilha do Maranhão em locais sem cultura agrícola. Em laboratório, os girinos foram mantidos em aquários com água desclorada, aeração e sob condições controladas. Para o ensaio cometa, no início do desenvolvimento os girinos foram distribuídos nos aquários para exposição ao Agritoato® 400 em concentrações crescentes, C0 a C5 (0, 0,009, 0,011, 0,015, 0,018 ou 0,025 mgL⁻¹) com 5 replicações, por 96h. Para assimetria flutuante, os embriões e girinos recém-eclodidos foram expostos ao Agritoato® 400 (25, 50, 100, 150, 200, 250, 300 mgL⁻¹) e ao Brilhante BR® (250, 300, 350, 400, 450, 500 e 550 mgL⁻¹) por 96h, ambos com 3 replicações. Os girinos foram anestesiados e fixados, sendo obtidas as medidas de 5 estruturas morfológicas para avaliação da simetria bilateral. No ensaio cometa o controle negativo e as concentrações mais baixas diferiram das concentrações mais altas (ANOVA: $p = 0,0556$; TUKEY: C3, C4, C5 > C0, C1, C2, $p < 0,001$). Apenas a variável comprimento do olho mostrou assimetria flutuante na avaliação do efeito do Agritoato® 400. As demais características nos girinos utilizados para esta avaliação e todas dos girinos da avaliação do efeito do Brilhante BR® mostraram assimetria direcional. Portanto, o Agritoato® 400 pode ser uma substância de alta extensão de degeneração do DNA e ambos os pesticidas podem alterar a simetria bilateral de anfíbios, sendo necessário um monitoramento maior na utilização destes agrotóxicos nas áreas agrícolas. A assimetria direcional detectada na maioria das características analisadas pode estar associada ao ambiente urbanizado, merecendo investigação futura.

Palavras-chave: Dimetoato, Metomil, Teste agudo, Leiuperinae, Genotoxicidade, Assimetria flutuante.

**THE EFFECT OF AGROCHEMICALS IN TADPOLES OF *PHYSALAEMUS*
CUVIERI (AMPHIBIA: ANURA: LEPTODACTYLIDAE)**

ABSTRACT:

Although Brazil has the greatest wealth of amphibian species, it is one of the leaders in the consumption of agrochemicals, which negatively affect this group of animals. Through the comet assay we can monitor DNA damage due to toxic contaminants, including pesticides. Studies on morphology, such as those of fluctuating asymmetry, analyze the effect of environmental contaminants on the bilateral symmetry of organisms. Thus, this paper aimed to investigate the effect of the insecticides Agritoato® 400 and BrilhanteBR® on tadpoles of the species *Physalaemus cuvieri* through the comet assay and variations in the fluctuating asymmetry. The spawnings were collected on the Island of Maranhão in locations without agricultural crops. In the laboratory, the tadpoles were kept in aquaria with dechlorinated water, aeration and under controlled conditions. For the comet assay, at the beginning of development of the tadpoles, they were distributed in the aquaria for exposure to Agritoato® 400 in growing concentrations, C0 to C5 (0, 0.009, 0.011, 0.015, 0.018 or 0.025 mgL⁻¹) with 5 replications, for 96 hours. For fluctuating asymmetry, newly hatched embryos and tadpoles were exposed to Agritoato® 400 (25, 50, 100, 150, 200, 250, 300 mgL⁻¹) and Brilliant BR® (250, 300, 350, 400, 450, 500 and 550 mgL⁻¹) for 96 hours, both with 3 replications. The tadpoles were anesthetized and fixed, and the measurements of 5 morphological structures were obtained to evaluate the bilateral symmetry. In the comet assay, the negative control and the lowest concentrations differed from the highest concentrations (ANOVA: $p = 0.0556$, TUKEY: C3, C4, C5 > C0, C1, C2, $p < 0.001$). Only the variable 'Eye Length' showed fluctuating asymmetry in the evaluation of the effect of Agritoato® 400. The other characteristics in the tadpoles used for this evaluation and all the tadpoles of the evaluation of the Brilhante BR® effect showed directional asymmetry. Therefore, Agritoato® 400 may be a high-level substance of DNA degeneration and both pesticides may alter the bilateral symmetry of amphibians, requiring a greater monitoring of the use of these agrochemicals in agricultural areas. The directional asymmetry detected in most of the characteristics analyzed may be associated with the urbanized environment, deserving future research.

Keywords: Dimethoate, Methomyl, Acute test, Leiuperinae, Genotoxicity, Fluctuating asymmetry.

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1: Localização dos pontos de coleta das desovas de *Physalaemus cuvieri* na Praia de São Marcos em São Luís- MA e no bairro Parque Thiago Aroso, Paço do Lumiar- MA, respectivamente.

Fig. 2: Coleta de desovas de *Physalaemus cuvieri* na Praia de São Marcos em São Luís- MA e no bairro Parque Thiago Aroso. Paço do Lumiar- MA, respectivamente. Fonte: Arquivos pessoais. RSM.

Fig. 3: Esquema do conjunto de aquários com diferentes níveis de concentrações de Agritoato® 400 utilizado para o experimento com teste cometa.

Fig. 4: Aquários com diferentes níveis de concentrações, preparados para receber os girinos utilizados para o experimento do ensaio cometa. Fonte: Arquivos pessoais, RSM.

Fig. 5: Imagens da intensidade dos graus de dano nas classes de 0, 1, 2, 3 e 4 respectivamente. Fonte: Arquivos pessoais, RSM.

Fig. 6: Classes de danos no DNA detectadas pelo ensaio cometa em cada controle em células da cauda de girinos de *Physalaemus cuvieri*, tratados com AGRITOATO® 400 por 96 horas. A média entre os boxes e o desvio a cima. C0= controle (ausente); C1= 0,009mgL-1; C2= 0,011mgL-1; C3= 0,015mgL-1, C4= 0,018mgL-1 e C5= 0,025µgL-1 de Dimetoato.

Fig. 7: Histogramas dos traços morfológicos (DNF, DOF, CO, LO, DON, CFA) de girinos de *Physalaemus cuvieri* expostas ao agrotóxico Agritoato® 400, onde D.N.F e C.O são as únicas variáveis com AF e as demais AD, sendo D.O.F a única variável com expressividade para o lado direito.

Fig. 8: Índice composto (CFA) resultante da centralização das variáveis do agrotóxico Agritoato® 400, mostrando as médias e erro padrão com 95% de intervalo.

Fig. 9: Histogramas dos traços morfológicos (D.N.F, D.O.F, C.O, L.O, D.O.N, C.F.A) de girinos de *Physalaemus cuvieri* expostas ao agrotóxico Brilhante® 400, onde todas as variáveis são AD, sendo L.O e D.O.N as únicas variáveis com expressividade para o lado esquerdo.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características morfológicas mensuradas ou utilizadas para obtenção dos índices de AF e suas respectivas abreviações.

Tabela 2: Resultado da ANOVA avaliando o efeito de diferentes concentrações do agrotóxico Dimetoato, a partir da exposição de girinos da espécie *Physalaemus cuvieri* por 96h alternadas ao AGRITOATO® 400.

Tabela 3: Níveis de significância obtidos na comparação entre as diferentes concentrações de Agritoato® 400 e o controle negativo que girinos da espécie *Physalaemus cuvieri* foram expostos por 96h alternadas: C0=controle (agrotóxico ausente); C1= 0,009mgL⁻¹; C2= 0,011mgL⁻¹; C3= 0,015mgL⁻¹, C4= 0,018mgL⁻¹ e C5= 0,025mgL⁻¹. (TestePost hoc Tukey HSD, MS= 21,241; df= 5, 84.

Tabela 4: Média das classes de danos no DNA detectadas pelo Ensaio Cometa em células da cauda de girinos de *Physalaemus cuvieri*, tratados com Agritoato® 400 por 96 horas. Onde os controles C4 e C5 demonstram ter a maior média de danos de classe 4.

Tabela 5: Resultados dos testes para avaliação da AF nos traços mensurados em *Physalaemus cuvieri* do agrotóxico Agritoato® 400. Test T (uma amostra), Levene, Spearman e Pearson CCO (Comprimento do corpo).

Tabela 6: Resultados da ANOVA para todas as características mensuradas em *Physalaemus cuvieri* com o agrotóxico Agritoato® 400.

Tabela 7: Resultados dos testes para avaliação da AF nos traços mensurados em *Physalaemus cuvieri* do agrotóxico Brilhante BR®. Test T (uma amostra), Levene, Spearman CCO (Comprimento do corpo).

Tabela 8: Resultados da Kruskal-wallis para todas as características mensuradas em *Physalaemus cuvieri* com o agrotóxico Brilhante BR®.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. METODOLOGIA	6
2.1. Coleta:	6
2.2. Material Biológico:	7
2.3. Pesticida:	7
2.4. Experimentos para ensaio cometa:	8
2.5. Manipulação das lâminas:	10
2.6. Experimento para Assimetria flutuante:	11
2.7. Análise estatística:	13
3. RESULTADOS	14
3.1. Ensaio Cometa:	14
3.2. O efeito sobre a Assimetria flutuante (AF):	15
4. DISCUSSÃO.....	19
5. CONCLUSÃO	25
REFERÊNCIAS	26
APÊNDICE	33
ANEXO.....	37

1. INTRODUÇÃO

O Brasil está no topo mundial em diversidade de anfíbios, sendo ao todo 1.080 espécies (SEGALLA et al., 2016). Contudo, de acordo com Silvano e Segalla (2005), a partir da década de 80 houve um declínio em diversas espécies de anfíbios no mundo, pois houve um crescimento na destruição do habitat desses indivíduos, assim como doenças, contaminação por inseticidas, poluição da água, mudanças climáticas e diversos outros fatores que influenciaram para a redução de espécies e até mesmo a sua extinção.

De acordo com Arenzon (2004), quando determinados organismos são expostos à contaminação por substâncias químicas, podem apresentar alterações biológicas e a avaliação deste impacto pode ser visto através do monitoramento de indivíduos que vivem nessas áreas contaminadas. Essas alterações no ambiente apresentam efeitos colaterais que resultam na degradação da espécie e do local, uma vez que a introdução de contaminantes no ambiente possa gerar perturbações, ocasionando grandes impactos ambientais exercendo pressão na seleção e alterando a dinâmica bioquímica natural do ambiente e seu ecossistema (SILVA, HEUSER, ANDRADE, 2003).

Substâncias químicas como os agrotóxicos ou também descritos como pesticidas, praguicidas ou defensores agrícolas, são produtos de natureza química, física ou biológica que podem exterminar pragas ou qualquer agente biológico que possa interferir em uma área agrícola. São classificadas como: herbicidas, fungicidas e pesticidas de acordo com a sua origem orgânica e inorgânica, podendo trazer riscos à saúde em níveis de contaminação, toxicidade e o tempo de exposição (CASTRO, CONFALONIERE, 2005; SILVA et al, 2011). Os países em desenvolvimento são responsáveis por 20% do mercado mundial de agrotóxicos, entre os quais o Brasil, consome cerca de 50% dos pesticidas utilizados na América Latina (ANVISA, 2005). A utilização desses produtos auxiliam no combate de pragas em lavouras, porém são utilizados de maneira inadequada, provocando problemas não só para a população que o maneja, mas também podem atingir corpos d'água, chegando aos rios ou até mesmo nos lençóis freáticos (ARIAS et al, 2007).

Para detectar modificações na morfologia e também no material genético de indivíduos predispostos a contaminação, podemos utilizar ferramentas para avaliar o risco da presença de contaminantes no ambiente. Através de estudos com manipulação em

análise do DNA, podemos observar tensões e/ou rupturas na fita de DNA que se desenvolvem durante o decurso de suas reações biológicas, como por exemplo, flexão de proteínas induzidas no DNA, alteração no ajuste das moléculas, transdução e energia disponível no material genético que poderia estar inibido, ocasionando uma mudança ou mutação no gene (BUSTAMANTE et al, 2000).

A mutação é a alteração que ocorre na sequência de DNA de um gene ou que pode afetar os cromossomos parcialmente ou por completo de um organismo. Esta ocorre espontaneamente, ao acaso, ou pode ser induzida por agentes físicos, químicos e biológicos aleatoriamente, como por exemplo, radioatividade, contaminação por inseticidas, bactérias e vírus. Contudo, é sabido que nem toda mutação resulta em uma consequência deletéria para o portador, ela também auxilia na evolução, através da variabilidade genética (KLUG et al., 2010). No presente estudo será retratada a mutação induzida, pois se refere às mudanças nos nucleotídeos do DNA por perda ou ganho na sua substituição, através de testes genotóxicos ao qual se avalia níveis de genotoxicidade em animais por meio de ensaio cometa (AWADHESH, 2008).

De acordo com Hartmann et al., 2005, o ensaio cometa é utilizado para detectar lesões genéticas que depois de serem processadas apresentam mutações celulares. As células contendo um elevado grau de dano no DNA mostram o nível crescente da migração do DNA cromossomal do núcleo, podendo ser representado no formato de um cometa (SPEIT; HARTMANN, 1995). Algumas mutações apresentam a possibilidade de reparo nas lesões que são vistas através do ensaio cometa, uma vez que danos no DNA são contínuos em células e tecidos específicos, que através do ensaio cometa pode detectar e visualizar uma possível reparação desses efeitos (TICE, 2000). Contudo, devemos ter a percepção de que não existe células sem danos no DNA, tendo em vista que o próprio metabolismo celular gera mais de 1000 lesões por dia, havendo reparações após pelo menos um ciclo celular (GONÇALVES et al., 2017).

Assim como o material genético pode sofrer danos relacionados a exposição de contaminantes, o indivíduo pode apresentar alterações morfológicas perceptíveis, podendo ser vista através do crescimento espontâneo de membros, como braços, dedos e pernas, assim como alterações no crescimento e funções de percepção, como a falta de audição e visão. De acordo com Van Valen (1962) é possível observar três categorias distintas de alterações morfológicas em seres vivos, podendo ser estas inter-relacionadas,

contudo, com atributos diferentes, sendo: Assimetria Direcional, Assimetria Flutuante e Antissimetria.

Quando um lado é mais expressivo que o outro, ou seja, o lado direito ou esquerdo é mais indicativo que o outro, podemos alegar que este caractere indica Assimetria Direcional, mostrando que normalmente os valores medianos diferem entre os dois lados (SANSEVERINO, NESSIMIAN, 2008; VAN VALEN, 1962).

A Assimetria Flutuante é descrita por Sanseverino e Nessimian (2008), como a inabilidade de determinados organismos em conseguirem se desenvolver, podendo estar relacionada com o estresse genético ou ambiental ao longo do seu desenvolvimento, resultando em uma variação bilateral morfológica. É perceptível que a simetria “perfeita” não é de fato um aspecto morfológico existente de qualquer ser vivo. Pois, haverá um pequeno desvio na produção de características simétricas, onde o lado direito não será igual ao lado esquerdo, assim como o inverso, sendo desta forma descrito por Palmer e Strobeck (1986), como um organismo sob o controle do seu material genético, seu genoma sofrerá modificações pelo seu habitat natural ao longo do tempo.

De acordo com alguns autores, a assimetria flutuante tem sido utilizada como um indicador de medidas de estresse ambiental e instabilidade no desenvolvimento genético de diversos seres vivos (CLARKE, 1993; GURUSHANKARA, KRISHNAMURTHY, VASUDEV, 2007; BISHOP et al, 1999). Mesmo sendo descrita como uma técnica simples e importante por não exigir materiais caros, sendo de certa forma rentável (CLARKE, 1993), a assimetria flutuante é vista por outros como um método ineficiente, por apresentar pouco sinal de qualidade, pois as diferenças são pequenas e os erros de medição podem ser grandes (PALMER, STROBECK, 1986). Entretanto, é viável a utilização deste método como monitoramento de organismos que habitam locais contaminados, pois podem apresentar uma maior possibilidade de sofrerem mudanças morfológicas e genéticas neste ambiente, sendo consideravelmente significativa a variação entre os lados de um organismo (WRIGHT, ZAMUDIO, 2002). Já a Antissimetria para Van Valen (1962), é a categoria mais incomum, porém não descartável, mas de difícil entendimento pois o lado que apresenta maior desenvolvimento não tem expressividade clara.

No Brasil, ainda são escassos trabalhos que envolve a utilização de agrotóxicos com experimentos utilizando anfíbios. Contudo, sabemos que o uso destes contaminantes

vem gerando efeitos há anos, sendo usados de forma inapropriada por agricultores em suas lavouras. Os anfíbios possuem uma pele permeável, além de precisarem ainda do meio aquático para reprodução e sua fase larval, o que poderia resultar em contaminações químicas por vulnerabilidade do mesmo (MARCO et al., 2001). Quando expostos a agrotóxicos, estes indivíduos ficam sujeitos a efeitos colaterais, acarretando em consequências morfológicas ou o óbito (HAYES et al, 2010). Um estudo realizado por Santos (2011), mostrou a presença de anfíbios, incluindo a espécie que utilizaremos neste trabalho, *Physalaemus cuvieri*, em áreas agrícolas na Ilha do Maranhão, que estavam sujeitos e expostos à contaminação de inseticidas organofosforados.

A espécie *Physalaemus cuvieri* possui reprodução restrita às estações chuvosas, utiliza locais permanentes a temporários para desovar e, apresenta desenvolvimento larval de até 45 dias, seja no ambiente natural ou em laboratório (BARRETO; ANDRADE, 1995). Por tais características e pela ocorrência em áreas agrícolas, além de ser abundante e de ampla distribuição geográfica (SANTOS, 2011), esta espécie é um bom modelo para estudos toxicológicos.

Além de contaminar as plantações, organismos vivos que se encontram naquele ambiente podem ser infectados e acumular através da absorção ou ingestão, reagentes tóxicos altamente insolúveis que aumentam com o tempo a sua concentração em locais alagados e dentro do organismo de seres vivos que habitam estes locais. Contudo, há uma necessidade de haver estudos mais aprofundados, que mostre as ameaças da exposição não só à espécie *Physalaemus cuvieri* que está sendo avaliada neste trabalho, bem como outras espécies que dependam do meio aquático para seu desenvolvimento e sua reprodução, sendo estas, espécies prejudicadas indiretamente, não alvo do agrotóxico, afetando assim todo o equilíbrio ecológico.

Esperamos encontrar maiores danos genéticos e maior Assimetria flutuante em girinos de *Physalaemus cuvieri* submetidos a concentrações subletais de Dimetoato e Metomil.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Investigar os efeitos subletais de agrotóxicos em girinos da espécie *Physalaemus cuvieri*.

2.2 Objetivos específicos:

- Expor girinos a condições controladas em exposição aguda do Dimetoato e Metomil.
- Investigar a genotoxicidade utilizando ensaio cometa com o inseticida Dimetoato.
- Analisar a Assimetria flutuante em níveis diferentes de concentrações dos agrotóxicos Dimetoato e Metomil.

2. METODOLOGIA

2.1. Coleta:

As desovas obtidas em períodos chuvosos de 2018 foram coletadas em São Luís e Paço do Lumiar, MA, Brasil, localizadas na Praia de São Marcos (2° 29'20.6''S, 44° 17'15.4''W) e Parque Thiago Arouso (2°30'54.22''S, 44°9'49.30''W) respectivamente (Fig.1), em locais sem cultura agrícola e transportadas em potes plásticos desprovidos de bisfenol. As desovas da Praia de São Marcos foram coletadas próximo à uma avenida (Av. Litorânea) e foram utilizadas apenas para os experimentos de Assimetria Flutuante. As coletas foram realizadas com a permissão do SISBIO (16716) e os experimentos realizados com a autorização do CEUA/MA (Processo nº 23115.040343/2018-52).

As desovas de *Physalaemus cuvieri* (Fig.2) foram levadas para a sala de experimentação do Laboratório de Herpetologia e Ecologia Aplicada à Conservação (LHEAC) da Universidade Federal do Maranhão, São Luís – MA. A sala possui ar condicionado, bancadas, pia, aquários (dimensões: 12 cm x 20 cm x 16 cm), bombas de oxigênio, pipetas, luvas, máscaras, pinças, termômetro e um medidor portátil multiparâmetro.

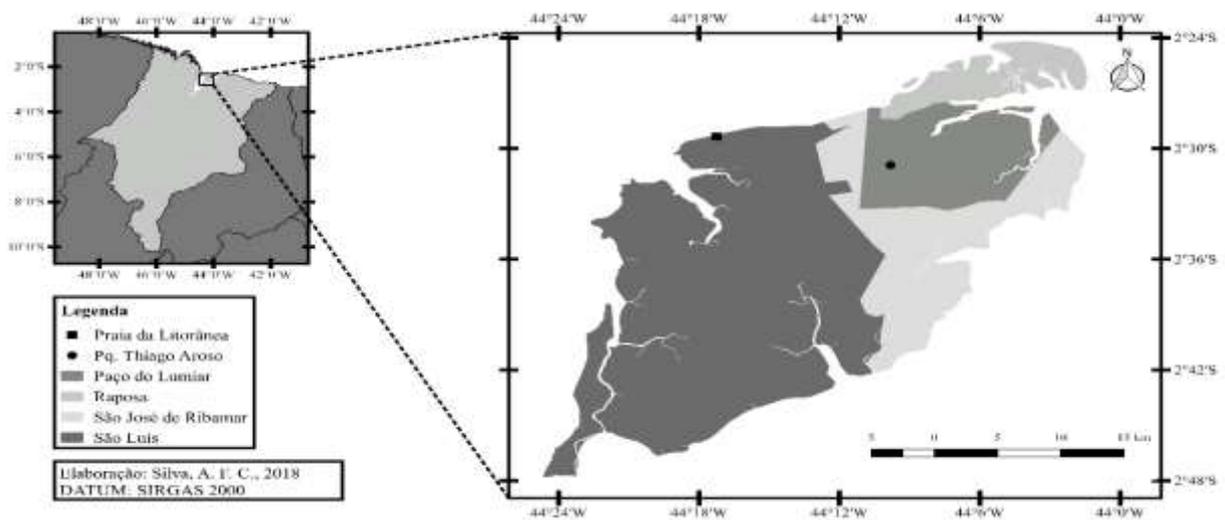


Fig. 1: Localização dos pontos de coleta das desovas de *Physalaemus cuvieri* na Praia de São Marcos em São Luís- MA e no bairro Parque Thiago Arouso, Paço do Lumiar- MA, respectivamente.



Fig. 2: Coleta de desovas de *Physalaemus cuvieri* na Praia de São Marcos em São Luís- MA e no bairro Parque Thiago Aroso. Paço do Lumiar- MA, respectivamente. Fonte: Arquivos pessoais. RSM.

2.2. Material Biológico:

A espécie utilizada para o experimento foi *Physalaemus cuvieri* (FITZ, 1826) (Leptodactylidae, Leiuperinae), escolhida por apresentar uma extensa distribuição geográfica (FROST, 2015), por ser facilmente encontrada em ambiente natural e agrícola, por demonstrar fácil manejo em laboratório (SANTOS, 2011), além do rápido desenvolvimento larvário (BARRETO; ANDRADE, 1995). A desova é um ninho de espuma facilmente localizado sobre a água e contém cerca de 470 ovos (BARRETO; ANDRADE, 1995) e o tamanho máximo de um girino é de cerca de 10 mm (ANDRADE, 1995). Como cada desova possui um grande número de ovos, apenas parte de cada uma foi coletada.

Após a coleta, as desovas foram colocadas em aquários apenas com água desclorada para aclimação. O experimento foi iniciado após a eclosão.

2.3. Pesticida:

Para avaliar os efeitos subletais nos girinos, foi realizada a contaminação da água nos experimentos a partir do Agritoato® 400 (CAS: 60-51-5) utilizado para os testes cometa e assimetria flutuante e Brilhante BR® (CAS: 16752-77-5) utilizado apenas para o experimento assimetria flutuante.

O Agritoato® 400 (CAS: 60-51-5) cujo ingrediente ativo é o Dimetoato (O, O-dimethyl S-methylcarbamoylmethyl phosphorodithioate) é um organofosforado, advém dos ácidos como o fosfórico, sendo um dos mais tóxicos do grupo de inseticidas e inibidor de mediadores químicos do organismo de vertebrados, como a colinesterase. Pode atuar através de ingestão ou contato direto - usado como acaricida e inseticida com classificação toxicológica II, empregado licitamente no Brasil em cultivos de algodão, maçã, tomate, trigo, citros e rosas, tendo um limite de 0,002 mg/kg p.c. de ingestão admissível diária (ANVISA, 2018).

O inseticida e acaricida Brilhante BR® (CAS: 16752-77-5), cujo ingrediente ativo é o Metomil (S-metil N-metilcarbamoiloxi tioacetimidato) sendo um Metilcarbamato de oxima com classificação toxicológica classe I de acordo com a Anvisa (2018), utilizado nas culturas de algodão, arroz, aveia, batata, brócolis, café, centeio, cevada, couve, dendê, feijão, milho, repolho, soja, sorgo, tomate, trigo e triticales possuindo um limite de 0,05mg/kg p.c de ingestão admissível diária.

A escolha da utilização destes inseticidas se fez devido à sua popularidade entre as comunidades rurais e sua disponibilidade no mercado, como descrito por Sousa (2009); Van Bao et al. (1974); Domingues et al. (2004).

2.4. Experimentos para ensaio cometa:

Após a eclosão os girinos das 20 desovas coletadas foram transferidos para cada aquário, em números iguais de cada desova, de forma aleatória, a fim de aumentar a variabilidade genética. Inicialmente separamos 180 girinos já em estágio 25, fase inicial de desenvolvimento larvário (GOSNER, 1960), e tamanho similar. Colocamos seis girinos em cada um dos 30 aquários com água desclorada, sendo que ao decorrer da contaminação com o agrotóxico, houve uma quantidade de 79 girinos mortos. Assim, 101 girinos de *P. cuvieri* receberam os diferentes tratamentos.

O experimento foi realizado de forma que os girinos em cada tratamento foram expostos à água com o Agritoato® 400 em concentrações distintas, com base no esperado após uma aplicação ao habitat natural, além do controle negativo, onde a água permaneceu livre de qualquer inseticida. Optamos por cinco aquários por tratamento, para replicações, e dividimos os girinos em até no máximo sete por aquário para evitar efeitos

de densidade (Fig.3). Os tratamentos foram: C0 (controle negativo) ausência de contaminante; C1 (concentração mais baixa de contaminação, $0,009 \text{ mgL}^{-1}$); C2, C3, C4 (concentrações em nível de média contaminação, $0,011$, $0,015$ e $0,018 \text{ mgL}^{-1}$ respectivamente) e C5 (concentração em nível de alta contaminação, $0,025 \text{ mgL}^{-1}$). A exposição dos girinos ao agrotóxico ocorreu durante o período de 96h.

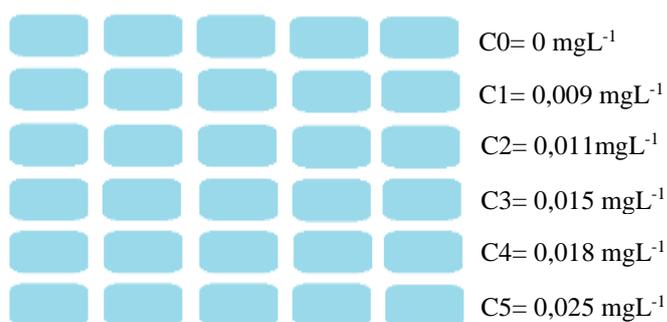


Fig.3: Esquema do conjunto de aquários com diferentes níveis de concentrações de Agriatoato® 400 utilizado para o experimento com teste cometa.

Cada aquário recebeu aeração mínima, uma vez que essa espécie ocorre em ambiente lântico (Fig.4). A solução de cada tratamento foi trocada a cada 48 horas. Ao longo do experimento a temperatura da água foi medida regularmente e a temperatura da sala mantida constante com ar condicionado (25°C). A iluminação também foi mantida com fotoperíodo de 12h (12h claro e 12h escuro) de luz do dia com auxílio de um *timer*.



Fig. 4: Aquários com diferentes níveis de concentrações, preparados para receber os girinos utilizados para o experimento do ensaio cometa. Fonte: Arquivos pessoais, RSM.

2.5. Manipulação das lâminas:

Enquanto os espécimes passavam pelo processo de contaminação, foi realizado o preparo das lâminas de pré-cobertura a partir da limpeza das duzentas e duas lâminas necessárias para amostra e sua réplica com água morna e detergente passando ainda por uma bacia de álcool 70% e por fim água destilada. Foi feita então a mistura de 1,5g de Agarose normal (ultrapura) a 10mL de PBS e 90mL de água destilada. A partir do aquecimento do composto, as lâminas, uma a uma, foram banhadas no mesmo, sendo o excesso contido no lado oposto à parte fosca da lâmina, retirado por papel toalha. Esse processo ocasiona o aparecimento de uma fina malha que tem a finalidade de fixar o material genético.

Quando os girinos estavam no estágio 32 (GOSNER 1960), começamos o decesso dos espécimes que se realizou em contato direto com xilocaína, cortando a cauda para maceração, mergulhando-os em Eppendorf de 2mL contendo 250 μ L de Soro Fetal Bovino (SFB) com a finalidade de fazer o sangue descer. Os Eppendorf foram levados à centrifuga onde permaneceram em agitação por 5 minutos para que fosse visto um botão celular. Depois foram homogeneizados adicionando 120 μ L de Agarose LowMelting e colocados nas lâminas pré-preparadas. As lâminas foram postas em um berço de vidro contendo a solução de Lise para uso (1mL de Triton-X +10 mL de DMSO +89 mL de solução lise estoque: 2,5M NaCl; 100 mM EDTA; 10mM Tris) e levadas a descanso em geladeira por 24 horas.

Passado o tempo de descanso as lâminas foram retiradas da solução de Lise e foram incubadas por 15 minutos em solução tampão de Eletroforese sendo posteriormente colocadas em cuba de Eletroforese e cobertas com o tampão alcalino (30mL de NaOH 10M +5mL de EDTA 0,2M+965 mL de H₂O destilada). A corrida foi feita por 30 minutos a 25V e 300mA e ao final, o tampão de neutralização (24,25g Tris + 475mL água destilada) foi usado na lavagem das lâminas. Por fim, as lâminas foram fixadas com álcool absoluto.

Para coloração das lâminas foi utilizado 30 μ L de Brometo de Etídio (uso), fazendo uma linha de fora a fora nas lâminas e colocando em seguida a lamínula sobre as mesmas para levar ao microscópio de fluorescência que estava regulado com a objetiva de 40x para análise de 100 células por lâmina.

2.6. Experimento para Assimetria flutuante:

Para testar o efeito dos pesticidas Agritoato[®] 400 e Brilhante BR[®] para Assimetria flutuante de embriões de *P. cuvieri* foi escolhido um intervalo de concentração para o Dimetoato e Metomil com base no trabalho de Uthpala (2010); Lau, Karraker e Leung (2015), sendo realizados pré-experimentos para determinar as faixas de concentrações utilizadas. Para o Agritoato[®] 400 foram utilizadas as concentrações 25, 50, 100 mg/L⁻¹ e de Brilhante BR[®] foram utilizadas as concentrações 250, 300, 350, 400, 450, 500 e 550 mg/L⁻¹. O ensaio com os embriões foi realizado de acordo com as normas para o ensaio de teratogênese para embriões de *Xenopus* (FETAX) (ASTM, 1991), com algumas modificações. Para isto, foram escolhidos aleatoriamente os ovos de cada desova coletada, a fim de eliminar as diferenças de base genética e sensibilidade aos pesticidas entre os embriões, aumentando assim a variabilidade genética. Os ovos foram verificados usando um microscópio de dissecação (ampliação de 40 ×). Foram escolhidos embriões no estágio 13 e 14 (Gosner, 1960), sendo mantida intacta a cápsula gelatinosa para garantir condições mais realistas de exposição, ou seja, semelhante ao que ocorre em cenários naturais. Em seguida os embriões foram colocados em placas de petri de plástico (55 mm de diâmetro) com 10 ml de solução teste (concentração de cada pesticida e controle somente com água desclorada) e 10 embriões de *P. cuvieri* por placa/réplica. Para cada concentração, de cada pesticida, foram feitas 3 réplicas. Os organismos foram mantidos sob um ciclo de 12-h:12-h, luz:escuro e 25±1 °C, durante o período de ensaio de 96 h.

As placas de Petri foram checadas todos os dias e o meio renovado, e indivíduos mortos foram removidos a cada 24h, sendo assim, tivemos um total de 295 indivíduos no final da contaminação. Durante os experimentos, o pH, o oxigênio dissolvido e a condutividade foram monitorados diariamente. Ao término, todos os girinos foram anestesiados e eutanasiados por sobredosagem do anestésico (Lidocaína) dissolvido na água e posteriormente fixados e conservados em formaldeído a 5%. Após a fixação, o material foi depositado na Coleção de Herpetologia da Universidade Federal do Maranhão (HUFMA). Assim, o material para a assimetria flutuante foi utilizado do acervo da coleção HUFMA.

2.7 Análise de dados:

Ensaio cometa:

Para detectar se houve quebra de fita simples do DNA se faz necessário realizar ensaios citogenéticos nas células (ensaio cometa), de acordo com a intensidade da cauda em cinco classes (Fig. 5).

As classes se denominam em: classe 0- não danificada; classe 1-pequeno dano; classe 2- médio dano; classe 3- dano moderado; classe 4- dano máximo (SPEIT; HARTMANN, 1995).

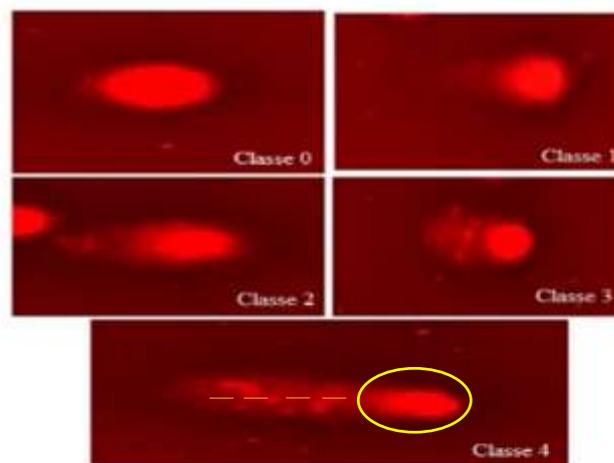


Fig.5: Imagens da intensidade dos graus de dano nas classes de 0, 1, 2, 3 e 4 respectivamente. Fonte: Arquivos pessoais, RSM.

Assimetria flutuante:

Para obtenção dos índices de Assimetria flutuante, medimos 5 estruturas morfológicas em cada indivíduo (Tabela 1), cada indivíduo foi colocado em uma placa de Petri com gel de ultrassom para evitar a distorção nas imagens e pigmentados com azul de metileno para melhor visualização na câmera AxioCam ERc 5s do microscópio Carl Zeiss MicroImaging GmbH, As medições foram realizadas através do software Zeiss, sendo cada característica aferida em milímetros (mm). Devido à algumas más formações externas em quinze indivíduos, como a deformação da cauda, curvatura da coluna vertebral, olho mal posicionado na órbita e narina próxima a linha da boca, não foram medidos devido à má formação excessiva, sendo descartados da análise.

Tabela 1: Características morfológicas mensuradas ou utilizadas para obtenção dos índices de AF e suas respectivas abreviações.

Estruturas mensuradas	Abreviação
Distância das narinas à ponta do focinho	D.N.F
Distância dos olhos à ponta do focinho	D.O.F
Comprimento dos olhos	C.O
Largura dos olhos	L.O
Distancia Olho e Narina	D.O.N
Índice Composto	C.F.A

Para a assimetria flutuante foi seguido o protocolo adaptado de Palmer e Strobeck (1986), calculando o índice $AF = (D - E)$, onde D representa o lado direito e E representa o lado esquerdo. Três medições foram realizadas de cada medida (lado esquerdo e direito) de todas as características com diferença de um mês para avaliação de possíveis erros de medição. O erro de medição foi pequeno e foi utilizada a média das duas medidas. Posteriormente, foram utilizados o índice $AF = (|D - E|)$ (Palmer e Strobeck 1986) e os valores absolutos da diferença entre os dois lados (direito e esquerdo) de cada estrutura para comparação entre os tratamentos (controle e diferentes concentrações dos dois agrotóxicos). Como a maioria das características analisadas apresentaram assimetria direcional (AD), a distribuição das diferenças de cada característica foi centralizada com média zero. Após este procedimento foi possível inferimos um Índice Composto de Assimetria Flutuante (CFA), como proposto por Leung et al. (2000), onde a soma dos valores absolutos de AF de todos os caracteres mensurados são obtidos por um único valor de AF por indivíduo.

2.7. Análise estatística:

Ensaio cometa:

Após a quantificação das classes de dano no ensaio cometa, foi realizada a análise de variância (ANOVA) para avaliar se houve ou não diferença entre os tratamentos

(controle e diferentes concentrações de Agritoato[®]400), e o teste de homocidade das variâncias de Levene. Como teste a posteriori foi utilizada a comparação múltipla de Tukey, com nível de significância de 5%.

Assimetria flutuante:

Foi utilizado teste T para uma amostra para verificar AF nas diferentes características mensuradas. O teste de Levene foi realizado para analisar a normalidade na distribuição dos índices da assimetria flutuante, caso os dados não apresentem normalidade, será utilizado um teste não paramétrico, Kruskal-wallis. Para verificar se esses índices foram ou não dependentes do comprimento total das larvas, foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman ou Pearson em casos de testes não paramétricos, com nível de significância de 5%. Ambas as análises foram realizadas no programa R.

3. RESULTADOS

3.1. Ensaio Cometa:

O teste ANOVA mostrou uma diferença significativa para o ensaio cometa entre a média das concentrações e o controle (Tabela 1). O teste de Tukey mostrou que não houve diferença significativa entre o controle negativo e a concentração C2, mas as concentrações C1, C3, C4 e C5 tiveram diferença significativa em relação ao controle negativo, e apenas C3, C4 e C5 não diferiram entre si, apresentando uma taxa de mutação maior que as demais concentrações e o controle (Tabelas 2, 3 e 4 em Apêndice, Fig. 6).

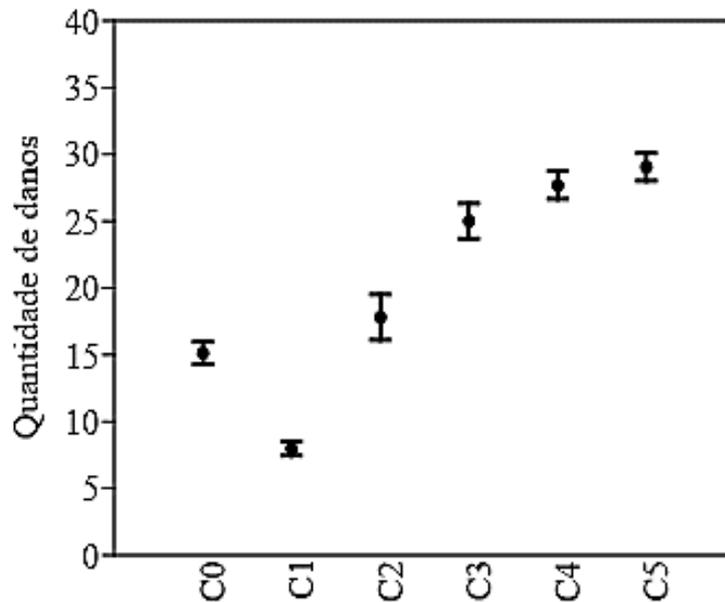


Figura 6: Classes de danos no DNA detectadas pelo Ensaio Cometa em cada concentração em células da cauda de girinos de *Physalaemus cuvieri*, tratados com dimetoato por 96 horas. A média entre os boxes e o desvio a cima. C0= controle (ausente); C1= 0,009mgL⁻¹; C2= 0,011mgL⁻¹; C3= 0,015mgL⁻¹, C4= 0,018mgL⁻¹ e C5= 0,025μgL⁻¹ de Dimetoato.

3.2. O efeito sobre a Assimetria flutuante (AF):

Dimetoato:

Na análise de traços morfológicos individuais, as variáveis distância da narina ao focinho (DNF) e comprimento do olho (C.O) apresentaram AF, com as diferenças entre o lado esquerdo e direito mostrando distribuição normal com média que não difere de zero (Tabela 5). As variáveis D.N.F, D.O.F, L.O apresentaram distribuição normal tendo as médias significativamente diferindo de zero, porem a variável D.O.N não apresenta distribuição normal, sendo realizado o teste de Pearson (Tabela 5), não apresentando AF. A maioria dessas características mostrou assimetria direcional para o lado esquerdo, com a média sendo maior do que zero, e apenas D.O.F apresentou assimetria direcional para o lado esquerdo, sendo a média menor do que zero, como mostra a fig.7.

Nenhuma das variáveis apresentaram dependência em relação ao comprimento do corpo. Somente a variável C.F.A mostrou efeito do agrotóxico diferindo entre o controle e a concentração 100 mg/L (C.F.A: p=0,003, Tukey: p= 0,030) (Tabela 6, Fig. 8 e 9).

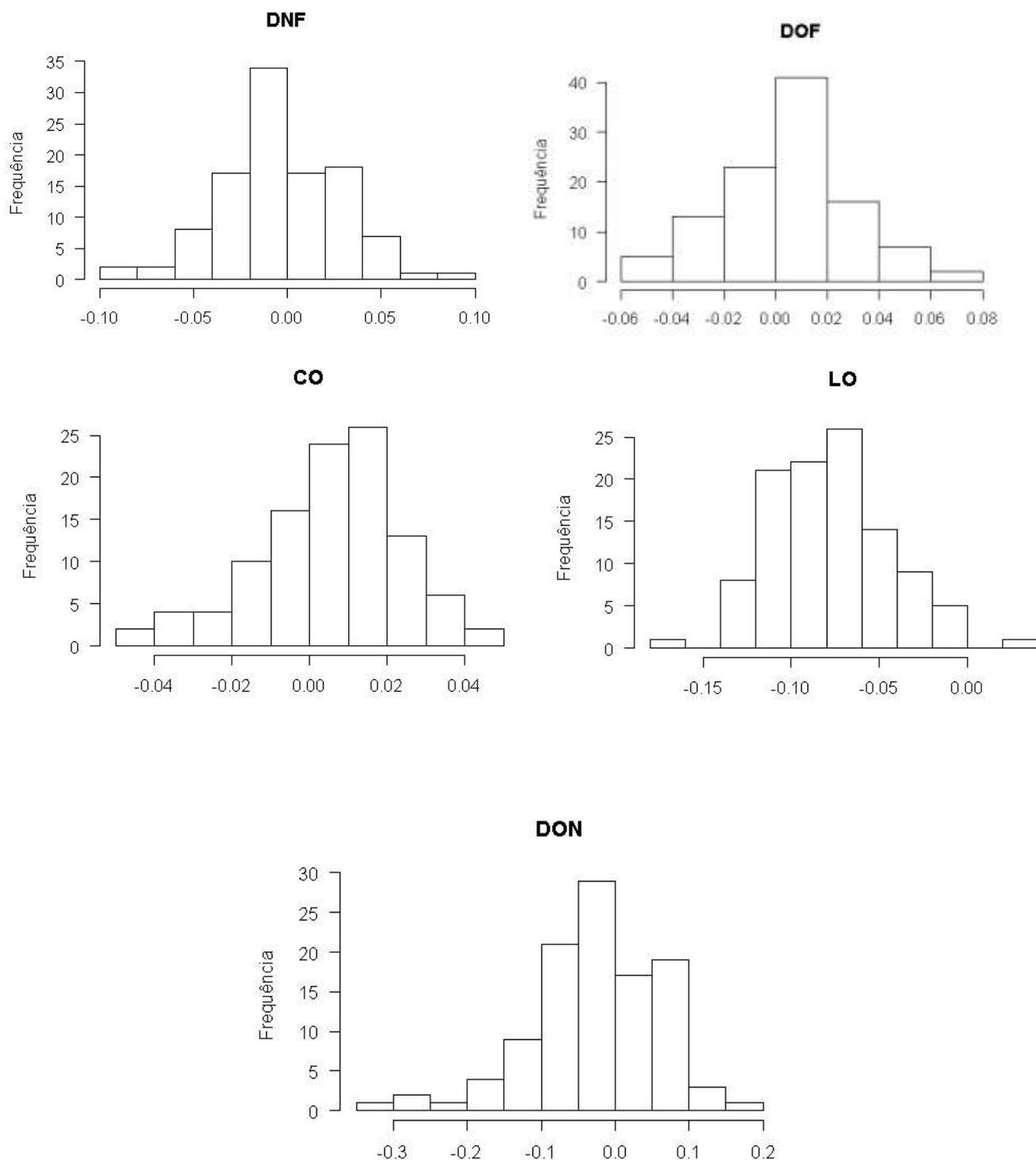


Figura 7: Histogramas dos traços morfológicos (DNF, DOF, CO, LO, DON, CFA) de girinos de *Physalaemus cuvieri* expostas ao agrotóxico Agritoato® 400, onde D.N.F e C.O são as únicas variáveis com AF e as demais AD, sendo D.O.F a única variável com expressividade para o lado direito.

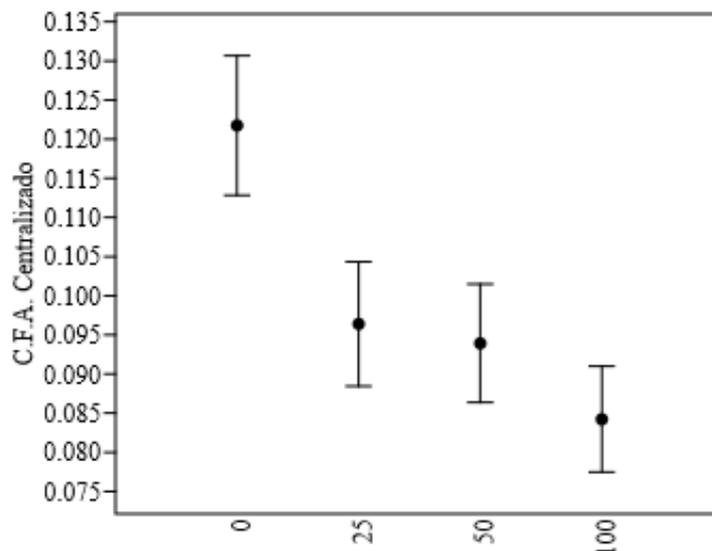


Fig. 8: Índice composto (CFA) resultante da centralização das variáveis do agrotóxico Agritoato® 400, mostrando as médias e erro padrão com 95% de intervalo.

Metomil:

Na análise de traços morfológicos individuais, nenhuma variável apresentou AF. As médias das diferenças de todas as variáveis, D.N.F, D.O.F, C.O, L.O, D.O.N e C.F.A, foram maiores que zero. Essas características mostraram que houve assimetria direcional pois a maioria das variáveis apresentam maior expressividade do lado direito, sendo apenas L.O e D.O.N às variáveis que apresentaram maior expressividade do lado esquerdo, como mostra a fig.9.

O teste de normalidade confirma distribuição normal para todas as diferenças entre o lado esquerdo e direito das características morfológicas mensuradas. Não houve relação de dependência entre as variáveis e o comprimento do corpo, o que demonstra que os resultados encontrados não dependem do tamanho das larvas e também não mostraram sofrerem efeitos quanto ao agrotóxico (Tabela 7 e 8).

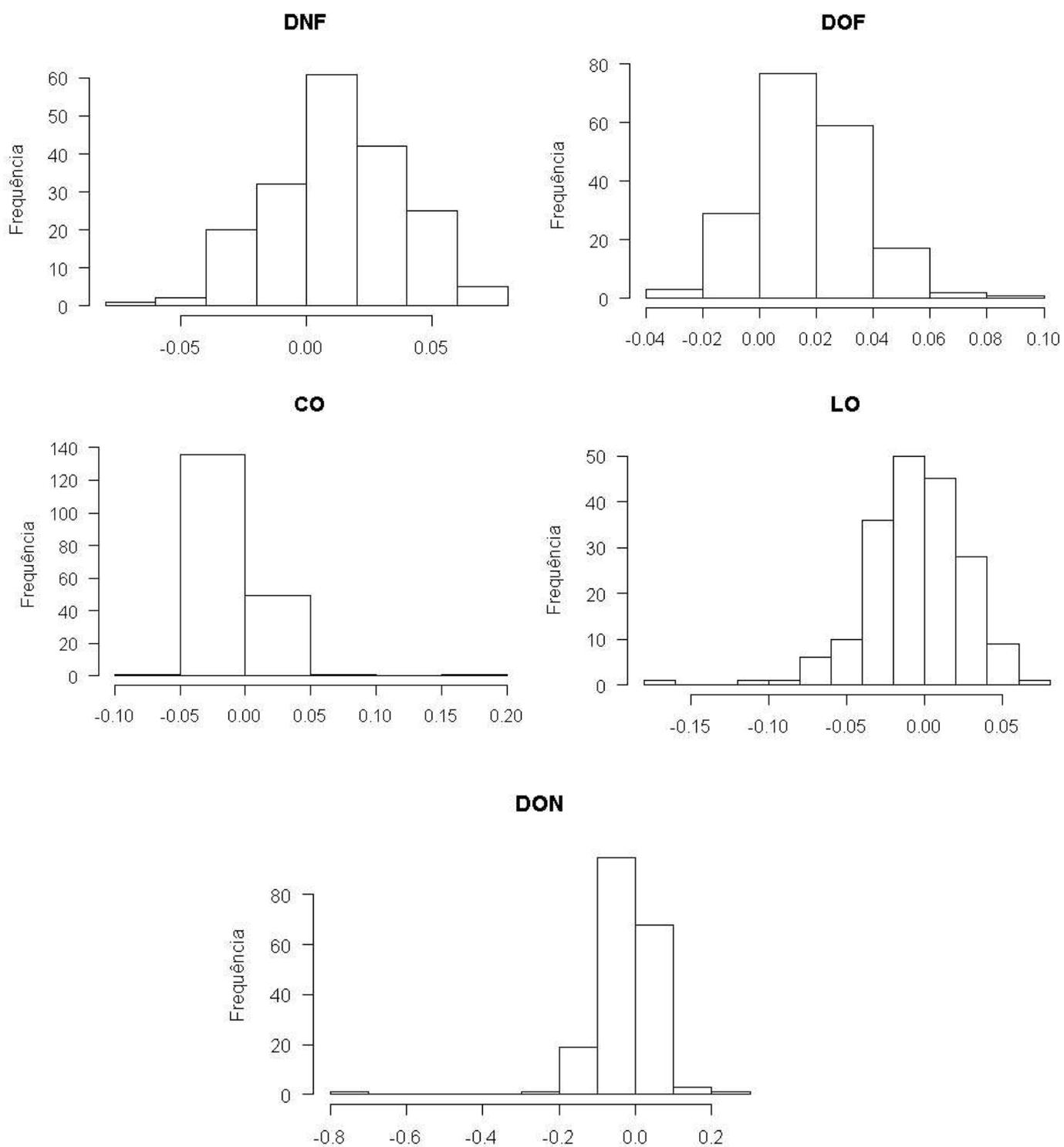


Figura 9: Histogramas dos traços morfológicos (D.N.F, D.O.F, C.O, L.O, D.O.N, C.F.A) de girinos de *Physalaemus cuvieri* expostas ao agrotóxico Brillhante® 400, onde todas as variáveis são AD, sendo L.O e D.O.N as únicas variáveis com expressividade para o lado esquerdo.

4. DISCUSSÃO

De acordo com os resultados apresentados, as concentrações mais baixas do agrotóxico Agritoato® 400 no ensaio cometa, C1(0,009 mg.L⁻¹) e C2(0,011 mg.L⁻¹) não diferiram do controle negativo (0 mg.L⁻¹), ao passo que, as concentrações mais altas, C3(0,015 mg.L⁻¹), C4(0,018 mg.L⁻¹) e C5(0,025 mg.L⁻¹) diferiram significativamente do controle negativo, com uma taxa maior de mutação. Este resultado é importante para uma melhor compreensão do efeito que este agrotóxico causa em ambientes aquáticos, principalmente em áreas agrícolas. De acordo com Duellman et al. (1986), testes com produtos tóxicos são realizados com anfíbios, pois possuem peles permeáveis que são altamente absorvedoras e por ainda dependerem do meio aquático para reprodução e o início do seu desenvolvimento. Esta característica é prejudicial para a conservação das espécies em áreas impactadas por serem susceptíveis a diversos agentes químicos, como visto por Mayer e Ellersieck (1986).

São poucos os estudos utilizando o princípio ativo dimetoato, porém no estudo de Uthpala et al. (2010), utilizou as concentrações 0,025, 0,050, 0,075 e 0,001 mgL⁻¹ do composto ativo dimetoato igual a deste estudo. Em testes de toxicidade aguda, realizado em campo, mostraram que afetaram os girinos de *Polypedates cruciger* (Anura: Ranidae), podendo indicar a resistência de girinos de *P. cuvieri*, nas concentrações 0,009, 0,011, 0,015, 0,018 e 0,025 mgL⁻¹, quando comparado a girinos de *P. cruciger*, pois a mortalidade e a quantidade usada do agrotóxico foi bem menor. Em Rabelo (2014) em seu trabalho, foi usada a mesma quantidade deste composto ativo, tendo cerca de 35% de mortalidade em seus experimentos, um nível maior do que é relatado neste trabalho, apresentando similaridade ao nosso resultado que possui cerca de 32,6% de mortalidade.

Sayim e Uğur (2006), usando larvas de *Hyla arborea* em estágios 21 e 25 de acordo com Gosner (1960), puderam observar que as concentrações usadas do composto ativo dimetoato causaram cerca de 50% da mortalidade dos girinos após 96h de exposição. No estágio 21, Gosner (1960), os girinos que estavam em altas concentrações foram mais sensíveis do que aqueles em estágio 25 chegando à mortalidade mais rapidamente, mas ambos tiveram consequências de deformações morfológicas (edemas e cauda deformada), sintomas de hiperatividade seguida pela perda de equilíbrio e também imobilidade.

O trabalho de Moreira et al. (2012), mostra que no uso de organofosforados e organoclorados ocorrem anormalidades, acarretando em efeitos diretos que ocasionam a

perda da natação e adulterações morfológicas. Outra característica também notória, se dá pela existente possibilidade dos contaminantes ocasionarem repercussões neurotóxicas, no caso os que inibem a acetilcolinesterase (AChE).

A exposição a contaminantes de baixa concentração, mas efetiva, podem ocasionar efeitos letais sobre esses organismos (WEIS et al 2001). Além deste fato, estágios próximos à fase de metamorfosear podem ser mais sensíveis a compostos tóxicos, pois é o momento que se inicia a transição dos ambientes aquáticos e terrestres, como relatado em Howe, Gillis e Mowbray (1998).

Outros estudos com organofosforados como o Paration metílico, por Silva et al. (2013), realizados na espécie *P. cuvieri*, mostraram que o composto pode induzir danos ao DNA mesmo em concentrações baixas (0,1 a 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$), acarretando diversos desequilíbrios, ocasionando impactos ambientais e também a espécie que depende deste ambiente para sobrevivência reprodutiva.

De acordo com Tice (2000), a técnica para detectar danos genotóxicos deve ser capaz de identificar várias classes de anomalias no DNA de uma variedade de tecidos, proporcionando informações de cada célula individualmente e que seja sensível a agentes mutagênicos. Sendo um método fácil e rápido assim como ser relativamente inexpressivo, o ensaio cometa é uma técnica de fácil entendimento, pois esta ferramenta permite a visualização de falhas no DNA e são necessárias poucas células que possuam núcleo, demonstrando ser sensível a um grande número de agentes mutagênicos (OLIVE, BANÁTH, DURAND, 1990). Devido às rupturas de filamentos, é usado em laboratórios para examinar a genotoxicidade de diferentes compostos, como águas contaminadas e animais expostos a agrotóxicos para um ter um biomonitoramento ambiental (MCKELVEY et al, 1993). Gonçalves et al. (2017), avaliaram áreas agrícolas de soja e milho de diferentes municípios do estado de Goiânia, usando 117 girinos para experimento em laboratório, sendo utilizado assim como neste trabalho, o ensaio cometa para identificar possíveis danos genéticos, demonstrando que houve maiores danos no DNA em indivíduos da área do cultivo de soja do que aqueles da área de cultivo de milho em relação ao controle que não apresentou danos.

Pequenas células com níveis de danos igual a zero e um, foram observados no controle e mais explícitos nas concentrações C1 e C2, provavelmente por conta do tecido estudado, no caso a maceração da cauda. De acordo com Galluzzi et al. (2007), até o término da metamorfose este tecido costuma ser totalmente removido devido à morte de

algumas células ocorrendo a apoptose da mesma. Já o número elevado de células com danos entre dois, três e quatro no controle, contudo, mais expressos nas concentrações C3, C4 e C5, tem sido visto como alto nível de fundo (“background”) principalmente em organismos aquáticos como representado por Wilson et al. (1998). Entretanto, neste estudo, não foi possível de fato detectar as causas instrumentais e inerentes ao método para estes efeitos.

Em nossos resultados foi observado que apenas a variável C.O (comprimento do olho) apresentou assimetria flutuante nos girinos da espécie em estudo *P.cuvieri* utilizados para avaliar os efeitos do contaminante Agritoato® 400. Contudo, houve assimetria direcional nas demais características mensuradas em ambos os contaminantes. Verificou-se também que houve efeitos letais e subletais ocasionando a morte e má formação, que ocasionou até a exclusão de indivíduos da amostra de medidas neste experimento. Mesmo em pouco tempo de exposição aos inseticidas Agritoato® 400 e Brilhante BR®, esses agrotóxicos causaram efeitos em animais que ainda dependem do meio aquático.

A redução de sobrevivência também foi vista no trabalho de Costa (2014), com a mesma espécie deste trabalho e metodologia similar, que relatou também assimetria flutuante nos girinos em contato com o agrotóxico Glifosato, sendo o D.N.F a variável que possuía maior nível de AF no tratamento em relação ao controle em procedimento crônico. Entretanto, em nosso trabalho, foi possível observar que mesmo havendo uma variável apresentando AF, as demais apresentaram AD.

Saturnino (2017) usou duas populações da espécie *Boana albopunctata* em suas análises para avaliar possíveis desvios morfológicos mostrando que a espécie não sofreu AF por contaminantes oriundos do local de coleta. Porém as características mensuradas, demonstraram AD assim como em nossos estudos, relatando que este tipo de desvio por ser predeterminação gênica, ou seja, por ser repassada para as próximas gerações, demonstra uma ocorrência espontânea, assim como vistos em outros casos (ETEROVICK et al., 2016; EARL, WHITEMAN, 2009). Considerando-se que estas espécies tiveram também o lado direito mais expressivo que o lado esquerdo, evidencia que algumas espécies tendem a comportamentos preferenciais motores mais de um lado do corpo do que do outro para realizar determinadas ações, como por exemplo a espécie *Bufo Bufo*, que utiliza mais o lado direito para retirada de elementos presentes na região cefálica (LIPPOLIS et al., 1998).

A frequência ou o excesso de AF pode prejudicar a estabilidade que um organismo precisa para a realização das funções adequadas do seu corpo (MARKOW, 1995). Delgado-Acevedo e Restrepo (2008) observaram níveis diferentes de AF em duas espécies de rãs endêmicas de Porto Rico, *Eleutherodactylus antillensis* e *E. coqui*, onde apenas *E. coqui* apresentou aumento no comprimento do rádio-ulna (osso do antebraço) na assimetria flutuante em uma das nove áreas de coleta que mostrou níveis altos de modificações ambientais.

Tendo em vista que a toxicidade foi aguda (96h), podemos prever também que por este motivo pode não ter sido relevante a ocorrência de AF. Em outros trabalhos realizados com experimento crônico foi possível observar AF em uma ampla variedade de animais, para identificar possíveis impactos de diferentes tipos de estresses ambientais (LEARY, ALLENDORF, 1989; SIEGEL, DOYLE, 1975; CLARKE, 1993; WRIGHT, ZAMUDIO 2002; SARRE, 1996). De acordo com Velásquez, Muñoz e Baustista (2017), utilizando a toxicidade aguda, aplicaram o inseticida Cipermetrina (Cypermon® 20 CE) em embriões e girinos de quatro espécies de anuros colombianos, *Boana xerophylla*, *Engystomops pustulosus*, *Rhinella marina* e *Rhinella humboldti*. Assim como neste trabalho, usaram embriões expostos ao inseticida, onde *R. Humboldti* foi a espécie mais sensível em experimento laboratorial e *B. xerophylla* em microcosmos, enquanto que *E. pustulosus* foi o menos sensível nas duas condições experimentais, já os efeitos subletais, geraram apenas atrasos no desenvolvimento de embriões de *E. pustulosus* sob condições de microcosmo. Com isso podemos inferir que o tempo de exposição aos inseticidas pode ter sido uma possível causa para este fecho.

Algumas substâncias tóxicas são resistentes no ambiente aquático o que pode afetar no desenvolvimento dos girinos. Dessa forma, a frequência do manuseio e a quantidade podem aumentar a durabilidade das substâncias sujeitando espécies que vivem nestes locais a uma exposição duradoura (BRIDGES 2000, RELYEA e JONES 2009). Por outro lado, muitos inseticidas usados atualmente são de curta duração expondo estes indivíduos a um período menor de contaminação durante seu processo de crescimento (SIMIONI, SILVA, MOTT, 2013). De acordo com alguns estudos, o período de exposição a certos produtos químicos podem afetar o tamanho do seu corpo, sendo um efeito negativo para sua sobrevivência. Em uma escala imaginária, os ovos em exposição aguda sofrem mais deformações, assim como os embriões sofrem mais em determinadas exposições do que um girino em um estágio mais avançado suportaria (BISHOP, 1999;

HOWE, GILLIS, MOWBRAY, 1998). De acordo com Berrill et al. (1998), houve baixa mortalidade nos embriões expostos ao Endossulfan (um organoclorado), porém constataram mortalidade após a exposição durante 2 semanas, sendo possível observar que para ocorrer um efeito mais significativo é importante determinar experimentos a longo prazo sendo preferível o uso de exposições crônicas.

Alguns espécimes sofreram anomalias perceptíveis no momento da captura das imagens como por exemplo a má formação da cauda, curvatura da coluna vertebral e diminuição do tamanho do corpo. Herek (2017), em seu estudo avaliou os efeitos agudos e crônicos usando Glifosato sobre girinos de duas espécies de anfíbios *Physalaemus cuvieri* e *Physalaemus gracilis* detectando que este agente tóxico alterou morfológicamente a boca, intestino, membros e caudas quando ainda estavam em estágio larval, assim como houve também o retardo da metamorfose nas duas espécies tendo oito dias a mais para mudança de metamorfose com relação ao controle. Como podemos observar também no estudo de Trachantong et al. (2017), utilizaram o agrotóxico Metomil, o mesmo usado nas nossas análises, onde contaminou a espécie *Hoplobatrachus rugulosus*, demonstrando que este inseticida causou diminuição no crescimento do corpo dos girinos e alterou o tempo de metamorfose dos indivíduos, onde os girinos contaminados metamorfosearam primeiro do que o controle. De acordo com Andrade (1995), o tempo de eclosão da espécie *P. cuvieri* dura em média 72h, sendo em laboratório em média 45 dias de duração do período larval. Não foi possível analisar neste trabalho a durabilidade do desenvolvimento da espécie *P. cuvieri*, entretanto as deformações e anomalias nos mostra que certos indivíduos sofreram com o impacto dos agrotóxicos com relação aos controles.

O índice composto (CFA) se apresentou significativo quando comparamos o controle e os diferentes níveis de contaminação nas duas substâncias utilizadas. Podemos observar através dos estudos de Leung, Forbes e Houle (2000), utilizando seis simulações computacionais para comparar a eficiência em detectar AF em populações com e sem estresse do ambiente em que vivem, que a utilização do CFA mostrou ser o traço mais expressivo do que as demais variáveis no ambiente sem estresse. Da mesma forma, Costa (2014), encontrou diferenças significativas no índice composto (CFA) e considerou provável que AF seja um desvio acumulativo, onde em determinadas características possa apresentar um índice maior do que em outros, além de auxiliar na detecção da diferença entre assimetria flutuante, assimetria direcional e antissimetria em diversas populações.

Também foi detectada que a distância entre a narina e o focinho (D.N.F) e o comprimento do olho (C.O) no Agritoato®400 foram as únicas variáveis que mostrou efeito do agrotóxico apresentando AF. Laurens (1914), em seu experimento retirou os olhos de larvas de *Rana pipiens*, *R. sylvatica* e *Amblystoma punctatum* para determinar se eram sensíveis à luz apenas por percepções de sensibilidade através da pele, descobrindo que os girinos tanto cegos como o controle (com os olhos) não respondiam aos estímulos de luz, mas possuíam percepções motoras.

Mesmo em águas limpas e não contendo resíduos que possam deixar a água turva, as larvas de anuros não possuem uma boa visão, como outros vertebrados, principalmente em larga escala, porém, apresentam sensibilidade a claridade e conseguem ter percepções sensoriais do ambiente em que estão, no qual auxilia na detecção de predadores ou alimento (DUNLAP e SATTERFIELD, 1985; CHOVANEC, 1992).

Com relação a sensibilidade dos agrotóxicos Agritoato® 400 e Brilhante BR® utilizados neste trabalho, é sabido que pode ter ocorrido diferenças quanto a absorção dos mesmos, gerando diferentes efeitos. Tendo em vista que, cada substância usada em bioindicadores pode ter efeitos diferentes pela variedade das condições experimentais, como por exemplo o tempo de exposição, formulações comerciais variadas, quantidade de réplicas e também o estágio de desenvolvimento dos indivíduos, pode haver diversos problemas em comparação com outros estudos (MANN et al., 2009).

Devido a área de coleta das desovas para os experimentos de AF ser uma área de urbanização litorânea, é provável que esta esteja influenciando no desvio morfológico da espécie. Tendo em vista que, a AF e AD podem aumentar devido ao estresse ambiental no qual estão sujeitos, induzindo a fatores de riscos como predação e doenças, parasitismo e competição, assim como também alterações gênicas (SARRE 1996; WRIGHT, ZAMUDIO, 2002). Clarck (1993) realizou estudos com invertebrados utilizando uma espécie de camarão, *Palaemon elegans*, retirado de água salgada e a larva de um Diptera da espécie *Chiromus salinarius* de água doce próximo a uma fábrica de fertilizantes na Ucrânia para avaliar o impacto ambiental através da assimetria flutuante. Ambas as espécies demonstraram sofrer níveis altos de desvios das características demonstrando que as mudanças no ambiente podem ocasionar estresse na população, causando maiores níveis de AF.

Beasley, Bonisoli-Alquati e Mousseau (2013) relatam que experimentos realizados em laboratório podem ocasionar efeitos colaterais maiores, devido à ausência

de fatores ambientais e diversidade genética. Consequências estas que poderiam potencialmente interferir no estresse, sendo menos agressor no ambiente natural, ocasionando uma diminuição na tolerância a perturbações apontando que o uso de AF como biomarcador. Este teste pode ser de fato auxiliador para resultados rápidos e sem custos excessivos de materiais, sendo realizado tanto no habitat natural como em laboratório, assim como pode ser usado como um meio de conservação de espécies em extinção com práticas de manejo.

5. CONCLUSÃO

Diante do que foi exposto, a maceração da cauda de girinos de *Physalaemus cuvieri* para a realização do teste cometa se mostrou viável, sendo observada uma grande quantidade de células com danos 3 e 4. Assim foram detectados efeitos genotóxicos significativos do agrotóxico Agritoato® 400 na espécie *Physalaemus cuvieri*, mesmo sendo em concentrações baixas ($0,015 \text{ mg.L}^{-1}$, $0,018 \text{ mg.L}^{-1}$ e $0,025 \text{ mg.L}^{-1}$), confirmando que este inseticida causa danos ao DNA.

Em relação à assimetria flutuante, foi possível observar que apenas dois traços mensurados, a distância entre a narina e o focinho (D.N.F) e o comprimento do olho (C.O), apresentaram AF enquanto que os demais apresentaram assimetria direcional, sendo a maioria com expressividade direcionada para o lado direito. O Agritoato® na concentração 100 mgL^{-1} afetou a AF, aumentando a variação, o que pode afetar a percepção sensorial dos girinos.

REFERÊNCIAS

American Society for Testing and Materials. 1991. Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus (FETAX). Standard Guide E1439-98. **ASTM International**, West Conshohocken, PA.

ANDRADE, G. V. **A história de vida de *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leptodactylidae) em um ambiente temporário**. 1995. Tese de Doutorado - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

ANVISA. 2018. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/>>. Acesso em: 18 ago. 2018.

ANVISA. 2005. Nota técnica sobre livre comércio de agrotóxicos e impactos a saúde humana. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>> Acesso em: 26/11/2018.

ARENZON, A. **Ensaio ecotoxicológicos no monitoramento da qualidade de águas subterrâneas potencialmente impactadas**. 2004. Tese de Doutorado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

ARIAS, A. R. L. et al. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 61-72, 2007.

AWADHESH. N. J. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. v. 23, n. 3, p. 207-221, 2008.

BARRETO, L; ANDRADE, G. V. Aspects of the reproductive biology of *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leptodactylidae) in northeastern Brazil. **Amphibia-Reptilia**, v.16, p.67-76, 1995.

BEASLEY, A. E; BONISOLI-ALQUATI, A; MOUSSEAU, T. A. The use of fluctuating asymmetry as a measure of environmentally induced developmental instability: A meta-analysis. **Ecological Indicators**, v. 30, p. 218–226, 2013.

BERRILL, M, et al. Toxicity of endosulfan to aquatic stages of anuran amphibians. **Environmental Toxicology Chemistry**, v.17, p.1738–1744, 1998.

BISHOP, C. A.; et al. Anuran development, density and diversity in relation to agricultural activity in the holland river Watershed, Ontario, Canada (1990–1992). **Environmental Monitoring and Assessment**, v.57, p.21–43, 1999.

BRIDGES, C. M. Long-term effects of pesticide exposure at various life stages of the Southern Leopard frog (*Rana sphenoccephala*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.39, p.91-96, 2000.

BUSTAMANTE, C; SMITH, S, B; LIPHARDT, J; SMITH, D. Single-molecule studies of DNA mechanics. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 10, p. 279–285, 2000.

CASTRO, J. S. M.; CONFALONIERI, U. Uso de agrotóxicos no Município de Cachoeiras de Macacu (RJ). **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v.10, n. 2 p.473-482, 2005.

CHOVANEC, A. The influence of tadpole swimming behaviour on predation by dragonfly nymphs. **Amphibia-Reptilia**, v. 13, p. 341-349, E. J. Brill, Leiden, 1992.

CLARKE, G, M. Fluctuating asymmetry of invertebrate populations as a biological indicator of environmental quality. **Environmental Pollution**, v.82, p.207-211, 1993.

CORE TEAM. 2017. Disponível em: <<https://www.r-project.org/>>. Acesso em: 27 set. 2018.

COSTA, C. R; OLIVI, P. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v.31, n.7, p.1820-1830, 2008.

COSTA, R. N. **Medindo os Impactos do Glifosato e do Estresse Ambiental com uma Régua: Assimetria Flutuante e Mortalidade em Girinos (Amphibia: Anura) de *Physalaemus cuvieri* (Leptodactylidae) e *Scinax fuscomarginatus* (Hylidae)**. 2014. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

DELGADO-ACEVEDO, J; RESTREPO, C. The Contribution of Habitat Loss to Changes in Body Size, Allometry, and Bilateral Asymmetry in Two *Eleutherodactylus* Frogs from Puerto Rico. **Conservation Biology**, v.22, n.3, p. 773–782, 2008.

DOMINGUES, M. R; BERNARDI, M. R; ONO, E. Y. S; ONO, M, A. Agrotóxicos: Risco à Saúde do Trabalhador Rural. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 25, p. 45-54, 2004.

DUELLMAN, W. E; TRUEB, L. 1986. *Biology of Anphibians*. 1. Ed. Baltimore, Maryland.

DUNLAP, D. G; SATTERFIELD, C. K. Habitat selection in larval anurans: Early experience and substrate pattern selection in *Rana pipiens*. **Developmental Psychobiology**, v.18, p.37-58, 1985.

EARL, J. E; WHITEMAN, H. H. Effects of pulsed nitrate exposure on amphibian development. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 28, n. 6, p. 1331–1337, 2009.

ETEROVICK, P. C.; SLOSS, B. L.; SCALZO, J. A. M.; ALFORD, R. A. Isolated frogs in a crowded world: Effects of human-caused habitat loss on frog heterozygosity and fluctuating asymmetry. **Biological Conservation**, v. 195, p. 52–59, 2016.

- FROST, D. R. Amphibian Species of the World 6.0: an Online Reference. **American Museum of Natural History**. Disponível em: <<http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/>>, New York, USA. 2015. Acesso em: 12 de Agosto de 2018.
- GALLUZZI, L. et al. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. **Cell Death and Differentiation**, v. 14, n.7, p.1237–1243, 2007.
- GONÇALVES, M. W. et al. The agricultural impact of pesticides on *Physalaemus cuvieri* tadpoles (Amphibia: Anura) ascertained by comet assay. **Zoologia**, v. 34, p.1-8, 2017.
- GOSNER, K. L. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. **Herpetologica**, v.16, n.3, p.183-190, 1960.
- GURUSHANKARA, H. P; KRISHNAMURTHY, S. V; VASUDEV, V. Morphological abnormalities in natural populations of common frogs inhabiting agroecosystems of central Western Ghats. **Applied herpetology**, v.4, n.1, p.39-45, 2007.
- HARTMANN, M. et al. The in vivo comet assay: Use and status in genotoxicity testing. **Mutagenesis**. v. 20, n. 4, p. 245-254, 2005.
- HAYES, T. B. et al. Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v.107, n.10, p.4612-4617, 2010.
- HEDDLE, J. A. et al. The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity. **Mutation Research**, v.123, p.61-118, 1983.
- HEREK, J. S. **Glifosato e seus efeitos sobre duas espécies de anfíbios nativos da América do sul *Physalaemus cuvieri* e *Physalaemus gracilis***. 2017. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Erechim.
- HOWE, G. E; GILLIS, R; MOWBRAY, R. C. Effect of chemical synergy and larval stage on the toxicity of atrazine and alachlor to amphibian larvae. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.17, p. 519–525, 1998.
- KENDALL, R. J. et al. **Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons**. 2001. Ecotoxicology. 6. ed., KLAASSEN, C. D. (Ed.). McGraw-Hill, 1236. p.
- KLUG, W. S. et al. **Conceitos de Genética**. 2010. 9 ed. São Paulo: Artmed, 863 p.
- LAU, E. T; KARRAKER, N. E; LEUNG, K. M. Y. Temperature-dependent acute toxicity of methomyl pesticide on larvae of 3 Asian amphibian species. **Environmental Toxicology Chemistry**, v. 34, p. 2322–2327, 2015.
- LAURENS, H. The reactions of normal and eyeless amphibian larvae to light. **Journal of Experimental Zoology**, v. 16, n.2, p. 195–210, 1914.

LEARY, R. F; ALLENDORF, F. W. Fluctuating Asymmetry as an Indicator of Stress: Implications for Conservation Biology. **Trends in Ecology & Evolution**, v.4, n.7, p.214-217, 1989.

LEUNG, B; FORBES, M. R; HOULE, D. Fluctuating Asymmetry as a Bioindicator of Stress: Comparing Efficacy of Analyses Involving Multiple Traits. **The American Naturalist**, v. 155, n. 1, p.101-115, 2000.

LIPPOLIS, G. et al. Lateralized agonistic responses and hindlimb use in toads. **Animal Behaviour**, v. 56, p. 875–881, 1998.

MANN, M. R. et al. Amphibians and agricultural chemicals: Review of the risks in a complex environment. **Environmental Pollution**, v. 157, p. 2903–2927, 2009.

MARCO. A, et al. Sensitivity to urea fertilization in three amphibian species. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 40, p. 406-409, 2001.

MARKOW, T. A. Evolutionary ecology and developmental instability. **Annual Review of Entomology**, v. 40, p. 105-120, 1995.

MAYER, F. L; ELLERSIECK, M. R. **Manual of Acute Toxicity: Interpretation and Data Base for 410 Chemicals and 66 Species of Freshwater Animals**. Washington, D.C: US Fish & Wildlife Service, 1986.

MCKELVEY-MARTIN. V. J, et al. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. **Mutation Research**, v. 288. p. 47–63, 1993.

MOREIRA, J, C, et al. Contaminação de águas superficiais e de chuva por agrotóxicos em uma região do estado do Mato Grosso. **Revista Ciência & Saúde Coletiva**, v. 17, n. 6, p.1557-1568, 2012.

OLIVE. P. L; BANATH. J. P; DURAND. R. E. Heterogeneity in radiation induced DNA damage and repair in tumour and normal cells using the “comet assay”. **Radiation Research**, v. 122, p. 86–94, 1990.

PALMER, A. R, STROBECK, C. Fluctuating asymmetry: Measurement, Analysis, Patterns. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v.17, p. 391-421, 1986.

RABELO, R. R. C. **Avaliação dos efeitos do Dimetoato em girinos de *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leptodactyludade: Leiuperinae)**. 2014. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Maranhão.

RELYEA, R. A., JONES, D. K. The toxicity of Roundup Original Max to 13 species of larval amphibians. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 28, n.9, p. 2004-2008, 2009.

SANSEVERINO A, M; NESSIMIAN, J, L. Assimetria flutuante em organismos aquáticos e sua aplicação para avaliação de impactos ambientais. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n.3, p. 382-405, 2008.

SANTOS, C. L. **Diversidade de girinos e efeitos de pesticidas em larvas de *Physalaemus cuvieri* Fitzinger, 1826 (anura: Leiuperidae) em áreas agrícolas da ilha de São Luís, MA.** 2011. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Maranhão.

SANTOS, P. **Avaliação dos efeitos genotóxicos dos corpos de água temporários de um perímetro irrigado do semiárido sergipano, por meio do teste SMART em *Drosophila melanogaster* (MEIGEN, 1830) e do teste do micronúcleo em anfíbios de *Hysiboas creptans* (WIED-NENWIED, 1824).** 2014. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Sergipe.

SARRE, S. Habitat fragmentation promotes fluctuating asymmetry but not morphological divergence in two geckos. **Population Ecology**, v. 38, p.57-64, 1996.

SATURNINO, M. A. **Mudanças na paisagem e estresse biológico: alterações cromossômicas, energéticas e epigenéticas em *Boana albopunctata* em área agrícola e conservada no Distrito Federal.** 2017. Dissertação de Mestrado - Brasília, Distrito Federal. 66p.

SAYIM, F; UĞUR, K. Effects of Dimethoate on Tree Frog (*Hyla arborea*) Larvae. **Turkish Journal of Zoology**, v. 30. p. 261-266, 2006.

SEGALLA et al. Sociedade brasileira de herpetologia- SBH. Brazilian amphibians: List of Species. <http://www.sbherpetologia.org.br>. (Último acesso em 20/08/2018), 2016.

SIEGEL, M. I; DOYLE, W. J. The differential effects of prenatal and postnatal audiogenic stress on fluctuating dental asymmetry. **Journal of Experimental Zoology**, v.191, p. 211-14, 1975.

SILVA L. J. et al. Basal defoliation and their influence in agronomic and phytopathological traits in tomato plants. **Horticultura Brasileira**, n. 29, p. 377-381, 2011.

SILVA, H. S. V. P. et al. Toxicidade aguda e genotoxicidade do agrotóxico comercial Folisuper 600BR a girinos de *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leiuperidae). **Pesticidas: r. ecotoxicol. e meio ambiente**, Curitiba, v. 23, p. 1-10, 2013.

SILVA, M. R; CAMPOS, A. C. E; BOHM, F. Z. Agrotóxicos e seus impactos sobre ecossistemas aquáticos continentais. **SaBios: Rev. Saúde e Biol.**, v.8, n.2, p.46-58, 2013.

SILVA, J.; HEUSER, V.; ANDRADE, V. Biomonitoramento Ambiental. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. In: DA SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003.

SILVANO, D. L; SEGALLA, M. V. Conservação de anfíbios no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 79-86, 2005.

SIMIONI, F., SILVA, D. F. N, MOTT, T. Toxicity of Glyphosate on *Physalaemus albonotatus* (Steindachner, 1864) from Western Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v.8, n.1, p.55-58, 2013.

SINGH, N. P; STEPHENS, R. E. Microgel electrophoresis: Sensitivity, mechanisms, and DNA electrostretching. **Mutation Research**, v. 383, p. 167-175, 1997.

SOUSA, L. T. F. **Avaliação do uso de pesticidas nos pólos agrícolas de São Luís, MA**. 2009. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Maranhão. 69p.

SPEIT, G; HARTMANN, A. The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay). **Mutagenesis**, v. 10, n. 6, p. 555-560, 1995.

TICE, R. et al. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206-221, 2000.

TRACHANTONG, W. et al. Lethal and sublethal effects of a methomyl-based insecticide in *Hoplobatrachus rugulosus*. **Journal of Toxicologic Pathology**, v. 30, p.15–24, 2017.

TRIANA VELÁSQUEZ, T. M, HENAO MUÑOZ L. M, BERNAL BAUTISTA, M. H. Acute Toxicity of the Insecticide Cypermethrin (CYPERMON® 20 EC) on Four Species of Colombian Anurans. **Acta Biológica Colombiana**, v. 22, n. 3, p. 340-347, 2017.

UTHPALA, A.J; et al. Toxicity of Agrochemicals to Common Hourglass Three Frog (*Polypedates cruciger*) in Acute and Chronic Exposure. **International Journal of Agricultura and Biology**, v. 12, n. 5, p. 641- 648, 2010.

VAN VALEN, L. A study of fluctuating asymmetry. **Evolution**, v. 16, p. 125-142, 1962.

VAN BAO, T. et al. Chromosome Aberrations in Patients Suffering Acute Organic Phosphate Insecticide Intoxication. **Humangenetik**, v. 24, p. 33-57, 1974.

VELÁSQUEZ, T. M. T; MUÑOZ, L. M. H; BAUTISTA, M. H. B. Acute toxicity of the insecticide Cypermethrin (CYPERMON® 20 EC) on four species of Colombian Anurans. **Acta biol. Colomb**, v. 22, n. 3, p. 340-347, 2017.

WEIS. J. S et al. Effects of contaminants on behavior: biochemical mechanisms and ecological consequences. **Bioscience**, v. 51, n. 3, p. 209-217, 2001.

WILSON, J.T; et al. Evaluation of a comet assay as a method for the detection of DNA damage in the cells of a marine invertebrate *Mytilus edulis* L (Molusca: Pelcypoda). **Mutation Research**, v. 399. p. 87-95, 1998.

WRIGHT, A. N; ZAMUDIO, K. R. Color Pattern Asymmetry as a Correlate of Habitat Disturbance in Spotted Salamanders (*Ambystoma maculatum*). **Journal of Herpetology**, v. 36, n. 1, p.129-133, 2002.

APÊNDICE

Tabela 2: Resultado da ANOVA avaliando o efeito de diferentes concentrações do agrotóxico Dimetoato, a partir da exposição de girinos da espécie *Physalaemus cuvieri* por 96h alternadas ao AGRITOATO® 400.

COMETA		LEVENE		ANOVA		
	F	df	P	MS Effect	F	P
	105,20	38,19	0,0016	1014,94	52,63	1,868E-24

Tabela 3: Níveis de significancia obtidos na comparação entre as diferentes concentrações de Agritoato® 400 e o controle negativo que girinos da espécie *Physalaemus cuvieri* foram expostos por 96h alternadas: C0=controle (agrotóxico ausente); C1= 0,009mgL⁻¹; C2= 0,011mgL⁻¹; C3= 0,015mgL⁻¹; C4= 0,018mgL⁻¹ e C5= 0,025mgL⁻¹. (Teste *Post hoc* Tukey HSD, MS= 21,241; df= 5, 84.

CONCENTRAÇÕES	CONTROLE	C1	C2	C3	C4	C5
CONTROLE	-	0,0003	0,5506	3,421E-07	3,44E-10	1,619E-10
C1	6,299	-	4,048E-07	1,582E-10	1,581E-10	1,581E-10
C2	2,372	8,671	-	0,00031	3,463E-07	8,359E-09
C3	8,726	15,03	6,354	-	0,5525	0,1301
C4	11,09	17,39	8,722	2,368	-	0,958
C5	12,29	18,59	9,917	3,563	1,196	-

Tabela 4: Média das classes de danos no DNA detectadas pelo Ensaio Cometa em células da cauda de girinos de *Physalaemus cuvieri*, tratados com Agritoato® 400 por 96 horas. Onde os controles C4 e C5 demonstram ter a maior média de danos de classe 4.

Substâncias Químicas	Dose de exposição (mgL ⁻¹)	Classe de dano 0	Classe de dano 1	Classe de dano 2	Classe de dano 3	Classe de dano 4
Controle negativo	0	51,46	17,66	6,73	4,93	20
Controle 1	0,009	40,46	14,2	5	8,93	31,46
Controle 2	0,011	41,66	17,26	3,86	7,06	30,2
Controle 3	0,015	7,4	17,53	11,46	15,4	47,33
Controle 4	0,018	9,93	10,4	4,46	4,73	70,46
Controle 5	0,025	2,46	12	5,26	7,86	72,4

Tabela 5: Resultados dos testes para avaliação da AF nos traços mensurados em *Physalaemus cuvieri* do agrotóxico Agritoato® 400. Test T (uma amostra), (g.l = grau de liberdade), Levene, Pearson/Spearman CCO (Comprimento do corpo), (t = Pearson; s = Spearmann).

Traços	N	TEST T (1 AMOSTRA)			LEVENE		PEARSON/SPEARMAN-CCO		
		t.	g.l	p.	f.	p.	t/s	p.	
D.N.F	107	- 0,83	106	0,4029	131,8	1,774E-37	t	0,83107	0,4078
D.O.F	107	2,06	106	0,0413	131,7	1,734E-37	t	- 0,21726	0,8284
C.O	107	1,64	106	0,1023	131,7	1,703E-37	t	0,31709	0,7518
L.O	107	- 23,62	106	2,2E-16	132,3	1,787E-37	t	0,64972	0,5173
D.O.N	107	- 3,07	106	0,0027	131,9	2,058E-37	s	194560	0,6308

Tabela 6: Resultados da ANOVA para todas as características mensuradas em *Physalaemus cuvieri* com o agrotóxico Agritoato® 400.

Traços	f.	d.f	p.
D.N.F	0,87	105	0,352
D.O.F	0,10	105	0,746
C.O	2,73	105	0,101
L.O	0,60	105	0,440
D.O.N	0,32	105	0,567
C.F.A	9,11	105	0,003

Tabela 7: Resultados dos testes para avaliação da AF nos traços mensurados em *Physalaemus cuvieri* do agrotóxico Brilhante BR®. Test T (uma amostra), Levene, Spearman CCO (Comprimento do corpo).

Traços	N	TEST T (1AMOSTRA)			LEVENE		SPEARMAN-CCO	
		t.	g.l	p.	f.	p.	s.	p.
D.N.F	188	27,52	187	2,2E-16	757,7	7,132E-48	997890	0,1769
D.O.F	188	6,05	187	7,502E-09	757,7	7,065E-48	510450	2,2E-16
C.O	188	12,71	187	2,2E-16	757,8	7,066E-48	695300	1,805E-07
L.O	188	- 4,70	187	4,843E-06	757,8	7,152E-67	1150200	0,5985
D.O.N	188	- 2,16	187	0,03188	757,9	7,47E-48	1018700	0,2744

Tabela 8: Resultados da ANOVA para todas as características mensuradas em *Physalaemus cuvieri* com o agrotóxico Brilhante BR®.

Traços	f.	d.f	p.
D.N.F	171,9	186	2,332E-39
D.O.F	155,7	186	8,213E-36
C.O	236,1	186	2,045E-53
L.O	209,9	186	1,145E-47
D.O.N	218,7	186	1,321E-49
C.F.A	134,5	186	3,637E-31

ANEXO**Ensaio Cometa Metodologia Alcalina****Equipamentos:**

- | | |
|--|------------------------------------|
| 1. Banho-Maria | 7. Cuba de eletroforese horizontal |
| 2. Agitador Magnético | 8. Fonte |
| 3. Pipetas P20 e P200 | 9. Máquina de gel |
| 4. Deionizador (H ₂ O deionizada) | 10. Peagâmentro |
| 5. Microcentrífuga | 11. Balança de precisão |
| 6. Microscópio ótico e fluorescência | |

Materiais

- | | |
|-----------------------------------|--|
| 1. Lâminas de ponta fosca | 13. Erlenmeyer 1000mL |
| 2. Pinças | 14. Berço horizontal |
| 3. Placa de petri | 15. Provetas de 100mL e 1000mL |
| 4. Papel alumínio | 16. Estantes para tubos eppendorf e falcon |
| 5. Rolo de papel | 17. Caixa para armazenamento de lâminas |
| 6. Lamínulas 24X60 mm | 18. Bequer de 50 mL, 100mL, 200mL e 1000mL |
| 7. Bisturi e lâminas para bisturi | 19. Vidraria para armazenamento de soluções de com âmbar de 1000mL |
| 8. Ponteiras P20-P200 | 20. Caixa de isopor que caiba a cuba de eletroforese e que tampe. |
| 9. Tubos eppendorf de 2 mL | |
| 10. Tubos Falcon de 50 mL | |
| 11. Pipeta de Pauster | |
| 12. Pisseta | |

OBS.:Caso tenha a necessidade de armazenar os girinos de um dia para outro é necessário aquários, peneiras e água de fossa livre de flor e cloro.

Reagentes

- | | |
|--------------------------------|--|
| 1. Xilocaína | 10. DMSO |
| 2. Brometo | 11. LaurilSarcosinato de Sódio |
| 3. Álcool absoluto | 12. Soro fetal bovino |
| 4. H ₂ O deionizada | 13. Agarose |
| 5. NaCl | 14. Agarose Lowmelting |
| 6. EDTA | 15. PBS (se necessário preparo KCl, KH ₂ PO ₄ , NaCl, Na ₂ HPO ₄) |
| 7. NaOH | |
| 8. TRIS | |
| 9. TRITON X-100 | |

Preparo de Soluções

Solução de Lise (Estoque) 1000mL

Passo	Quantidade	Reagente	PM
1	890 mL	H ₂ O deionizada (Milique)	
2	146,1g	NaCl (Cloreto de Sódio) 2,5M	
3	37,2g	EDTA (Ácido Etilenodiaminotetracético) 100mM	372,24
4	1,2g	TRIS 10 mM	121,14
5	8g	NaOH (Hidróxido de sódio)	40,0
6	10g	LaurilSarcosinato de sódio	

Preparo: Dissolver os reagentes do passo 2 ao 5 na água e homogeneizar no agitador com bailarina (bem lentamente para não ter a formação de grumos) acertar o **pH para 10** com NaOH e após, dissolver o reagente 6 aos poucos na solução.

- A. Todo realizado sem aquecimento da solução;
- B. A solução deve ser estocada na temperatura ambiente, e no escuro (nessas condições a solução pode ser mantida ate seu uso total);
- C. 8g de NaOH é suficiente para ajuste de pH;

Solução de Lise (Uso) 100mL

Passo	Quantidade	Reagente	PM
1	1mL	TRITON X-100	
2	10 mL	DMSO	
3	89 mL	Solução Estoque	

Preparo: Misturar bem, invertendo a proveta. Essa solução será preparada na hora de uso, não podendo ser armazenada de um dia para outro. Depois de feita deverá ser abrigada fora do alcance da luz (embalar com papel alumínio). Como essa solução é utilizada gelada coloca-se a solução nos berços embalados em papel alumínio na geladeira por volta de 40 min a 60min (trabalhar com a luz apagada se possível).

- A. A solução será feita na hora e armazenada no escuro (embalar com papel alumínio);
- B. Deixar a solução no berço de lâminas no escuro por volta de 40-60 min em temperatura de 4°C, antes de colocar as lâminas (a solução deve ficar gelada).
- C. Utiliza-se uma micropipeta para pegar o TRITON, mas devido a sua viscosidade corta-se a ponta da ponteira.

Tampão de Eletroforese

Passo		2L	1L	Reagente	PM
1	Quantidade	21,6g	10,8g	NaOH (300mM)	
2		9mL	4,5mL	EDTA (200mM)	
3		1800mL	900mL	Água deionizada	

Preparo: Para cada corrida de eletroforese preparar o tampão no dia da corrida e guardar na geladeira. Misturar bem os reagentes. Acertar o pH para 13 (**pH≥13**) com NaOH.

- A. Volume total de tampão depende da capacidade da cuba de eletroforese;
- B. Acertar a amperagem e a voltagem acrescentando ou tirando tampão;
- C. Aproximadamente = 25 V e 300 mA.

Tampão de Neutralização

Passo	Quantidade	Reagente	PM
1	24,25 g	TRIS	
2	475ML	Água deionizada	

- A. Acertar o pH para 7,5 com HCl.
- B. Estocar em temperatura ambiente.
- C. Esta solução pode fugar facilmente.

Solução de Coloração (Estoque) 20%

Passo	Quantidade	Reagente	PM
1	10 mg	Brometo de Etídio	
2	50 ml	Água deionizada	

A. Estocar em temperatura ambiente.

Solução de Coloração (Uso) 2%			
Passo	Quantidade	Reagente	PM
1	1 mL	Solução Estoque	
2	9mL	Água Deionizada	

A. Filtrar se necessário.

PBS 1000 mL			
Passo	Quantidade	Reagente	PM
1	0,2g	H ₂ O deionizada (Milique)	
2	0,2g	NaCl (Cloreto de Sódio) 2,5M	
3	8g	EDTA (Ácido Etilenodiaminotetracético) 100mM	372,24
4	1,15g	TRIS 10 mM	121,14
5	1000 mL	NaOH (Hidróxido de sódio)	40,0

Acertar o pH para 7,4, sendo que normalmente não atinge esse valor. Caso isso não ocorra, é possível que os reagentes estejam com problemas ou houve erro na pesagem destes. Estocar em refrigerador e fazer no balão volumétrico.

Agarose normal – 1,5%			
Passo	Quantidade	Reagente	PM
1	1,5g	Agarose normal	
2	100 mL	PBS	

Preparo: Dissolver bem a agarose no agitador com bailarina por volta de 2 a 3H. Aquecer no micro-ondas e quando levantar fervura desligar. Transferir para o tubo falcon 50 mL e levar para o banho Maria a 80°C.

Agarose de Baixo Ponto de fusão-Lowmelting (LMR)

Passo	Quantidade	Reagente	PM
1	0,1 g	Agarose LMR	
2	20 mL	PBS	

Preparo: Dissolver bem a agarose e leva-la ao micro-ondas e quando levantar fervura desligar. Levar para o banho Maria a 40°C para que a agarose permaneça na forma líquida se necessário aquecer novamente no microondas.

Antes de Começar a Metodologia

Preparar as soluções:

- a. Solução de lise estoque;
- b. Tampão de neutralização;
- c. Solução de coloração;
- d. PBS se houver necessidade de preparo caseiro, normalmente se compra pronto para uso;

Preparo da Lâmina

- a. Utilizar lâminas novas (nunca reutilize lâminas).
- b. Lavar as lâminas com água e sabão. Deixar secar na vertical a T.A.
- c. Limpar com álcool 70%.
- d. Preparar **Agarose Normal A 1,5%**.
- e. Transferi-la para tubo falcon de 50 mL (esse tubo cabe certinho a lâmina).
- f. Levar para o *Banho Maria* a **80°C** para que a agarose se mantenha na forma líquida.
- g. Mergulhar as **Lâminas** na agarose com auxílio da *Pinça* até chegar à ponta fosca.
- h. Colocar as **Lâminas** na horizontal.
- i. Procurar formar uma camada bem fina e homogênea, cuidado ao retirar a lâmina e mantendo-a bem reta.
- j. Limpar o outro lado da lâmina para tirar o excesso da agarose.
- k. Deixar a lâmina secar “**overnith**” na horizontal em temperatura ambiente.
- l. Armazenar na geladeira.
- m. Pode durar ate 1 mês.

Metodologia 1º dia

1. Preparar a Solução De Lise Para Uso deixar na geladeira
2. Eutanásia do animal (Girino)
3. Xilocaína:
Colocar um pouco da Xilocaína em uma *Placa de Petri* e colocar o animal em cima e massageá-lo com a xilocaína. E aguardar alguns minutos para que o animal pare de se movimentar, indicando sua morte.
4. Preparo da Amostra: Colocar **250µL** de **Soro Fetal Bovino (SFB)** em um *Eppendorf* de 2 mL.
OBS.: a quantidade de **SFB** varia de acordo com o tamanho do animal sendo que o máximo utilizado é de 1 mL.
5. Com o animal recém eutanaziado.
6. Transferir para uma *Placa de Petri*.
7. Utilizando *Pinça* e *Bisturi* fazer um **Corte (pique)** no início da **Veia Caudal**.
OBS.: cuidado para não cortar muito próximo a barriga para não corta-la e o intestino sair, isso deixa a amostra muito suja dificultando a análise, e cuidado para não cortar muito em baixo, pode ser que não pegue a veia (Nem sempre sai sangue).
8. Colocar o animal no *Eppendorf* com **SFB**.
9. Aguardar 15 minutos para o sangue descer/escorrer.
10. Retirar e descartar o Girino, ou em caso de armazenamento, cada indivíduo deverá ser tombado e guardado na coleção.
11. Centrifugar o **SFB** que está com o sangue do girino.
12. Preparar a Agarose LowMelting e deixar no banho Maria a 40°C.
13. Pegar as lâminas que foram pré-preparadas com Agarose Normal 1,5%, deixar chegar a T.A.
14. Pegar as amostra e verificar a formação de um botão celular e retirar se necessário o excedente de soro.
15. Pegar **15 µL** de amostra colocar em um novo *Eppendorf*.
OBS.: Homogeneizar bastante as amostras antes.
16. Pegar **120µl** de **Agarose LowMelting** e homogeneizar junto com a amostra e colocar na **Lâmina pré-preparada** fazendo uma linha de fora a fora na lâmina, colocando a **Lamínula** para espalhar a amostra sobre a lâmina.
OBS.:As etapas **18 a 20** tem que ser **Rápida** porque corre o risco de a agarose começar a solidificar o que dificulta espalhar a amostra.
17. Levar para a geladeira e esperar um pouco (1-5min)
18. Tirar a **Lamínula** com bastante cuidado.
19. Colocar as lâminas nos berços que contém a **Solução de Lise para uso** na geladeira, ao abrigo da luz e aguardar **24 horas**.
OBS.: Dependendo do ensaio esse tempo varia 1-48 horas. Normalmente 3h é o mínimo e 48h e o máximo.
20. Apos o uso jogar fora o restante da solução de lise para uso.

Observação: Para realizar Cometa de sangue, o sangue tem que ser coletado com algum tipo de anticoagulante (heparina, EDTA), e realizar a metodologia: passo 1 e pular para o passo 17 em frente.

Metodologia 2º Dia

1. Eletroforese
2. Durante todo o procedimento manter **Pouca Luz** no laboratório, de preferência uma luz de fundo.
3. Colocar no *Erlenmeyer* **900mL** de **H2O Destilada** e deixar na Geladeira.
OBS.: Essa água tem que estar gelada para preparo do **Tampão de Corrida**.
4. Preparar a Cuba De Eletroforese
5. Colocar a **Cuba De Eletroforese** no **Isopor**
6. Fazer **Gelo** pra preencher o isopor sendo preencha o *Fundo* e a *Lateral* da **Cuba de Eletroforese**.
7. Com a água já gelada preparar o **Tampão de Eletroforese**.
8. Tirar a **Lâminas** da geladeira.
OBS.: As Lâminas estão na **Solução De Lise Para Uso**.
9. Coloca-las na cuba
10. Colocar sempre o lado **Fosco das Lâminas** para o sentido do *Catodo* (positivo)
11. Colocar o tampão de corrida de eletroforese com bastante cuidado
OBS.: Evitar a formação de bolhas, colocar ate cobrir as **Lâminas** com uma camada **fina** de **Tampão de Eletroforese**.
12. Deixar as **Lâminas** em imersão no tampão de eletroforese por *30 minutos*
13. Ajustar a amperagem na fonte para **25V e 0300mA**.
14. OBS.: para esse ajuste meche-se na quantidade de tampão, se nãoatingiu a voltagem **retira-se** tampão de eletroforese, se não atingiu a miliamperagem **põe-se** tampão de eletroforese.
15. Deixa correr **30 minutos**
OBS.: esse tempo pode varia de **25-30 minutos**
16. Após a corrida lavar as **Lâminas** com **Tampão de Neutralização** por **3-5 minutos**.
Repetir esse procedimento **3 vezes**.
OBS.: Essa lavagem pode realizada usando *Berço*, ou *Suporte De Lâminas* com auxilio da *Pipeta de Pauster*. Esse tampão não pode ser reutilizado, pois, a variação do pH.
17. Lavar as **Lâminas** com **Água Destilada** com cuidado e deixar secar inclinado. Utilizar a *Pisseta*.
18. Fixar com **Álcool Absoluto** por **10 minutos**.
19. Deixar a **Lâminas** secar
20. Armazenar e **Caixa para Lâminas** a T.A.
21. Essas **Lâminas** podem se armazenadas para leitura por até *4 meses*.

Leitura dos Danos Genéticos

1. Coloração da Lâmina
2. Preparar a solução de **Coloração para Uso**.
3. Colocar de **10 a 15µL** de **Brometo a 2%** fazendo uma linha de fora a fora na **Lâmina**
OBS.: Fazer a linha bem no centro tomando cuidado para não sair da **Lâmina**.
4. Por a **Lamínula**
5. Levar ao *Microscópio de Fluorescência* imediatamente.
6. Fazer a captura na objetiva de 10x aumento de 100x com filtro de 515-560nm e filtro de barreira de 590nm.
OBS.: Em relação a objetiva e o aumento vai de acordo com a quantidade de célula por campo que se deseja analisar e os filtros e de acordo com o microscópio do laboratório.
7. Analisa 100 células de cada amostra classificando conforme a forma e tamanho da cauda.
OBS.: 0 sem danos/ 1 poucos danos/ 2 médio dano/3 muitos danos
8. Depois da análise descartar a **Lâmina**
OBS.: **Lâmina** pode ser armazenada apos a captura, porém, essa captura não pode demorar, pois é necessária a retirada da lamínula (retirar levantando, não arrastando).