

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

JULIANA DOS SANTOS MENDONÇA

**INFLUÊNCIA DA EXPOSIÇÃO À ATRAZINA E GLIFOSATO NO
DESENVOLVIMENTO ÓSSEO DE *Podocnemis expansa* (TESTUDINES,
PODOCNEMIDIDAE)**

UBERLÂNDIA

2015

JULIANA DOS SANTOS MENDONÇA

**INFLUÊNCIA DA EXPOSIÇÃO À ATRAZINA E GLIFOSATO NO
DESENVOLVIMENTO ÓSSEO DE *Podocnemis expansa* (TESTUDINES,
PODOCNEMIDIDAE)**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária - UFU, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias no Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV/UFU).

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Quagliatto Santos

Área de concentração: Saúde Animal

UBERLÂNDIA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

M539i Mendonça, Juliana dos Santos, 1989-
2015 Influência da exposição à atrazina e glifosato no desenvolvimento
ósseo de *Podocnemis expansa* (Testudines, Podocnemididae) / Juliana
dos Santos Mendonça. - 2015.
79 f. : il.

Orientador: André Luiz Quagliatto Santos.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
Inclui bibliografia.

1. Veterinária - Teses. 2. Réptil - Teses. 3. Toxicologia ambiental -
Teses. 4. Herbicidas - Teses. I. Santos, André Luiz Quagliatto. II.
Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias. III. Título.

“Que nada atrapalhe meu passo, faça perder meu riso, nem abale minha fé. Que os caminhos sejam iluminados, os obstáculos superados e as lutas vencidas. Que os sonhos sejam degraus para as vitórias.”

(Autor desconhecido)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela força, fé e determinação.

Aos meus pais, Omilton e Ana Abadia e a minha irmã, Anelise, pelo apoio incansável, conselhos, compreensão e acolhimento diário. Pela certeza de que eu nunca estive sozinha.

Ao professor Dr. André Luiz Quagliatto Santos, que não se hesitou em abrir as portas do laboratório para mim. Obrigada pela confiança sempre demonstrada, respeito e orientação.

Aos pós-doutorandos Lucélia Gonçalves Vieira e Sady Alexis Chavauty Valdes, a minha extrema gratidão pela co-orientação, ensinamentos, paciência, ajuda e incentivo. Mas também pelas inúmeras risadas, conselhos, viagens e pela amizade estabelecida.

A todos da equipe do Projeto de Ecotoxicologia, integrantes e funcionários do LAPAS/UFU (Laboratório de Ensino e Pesquisa em Animais Silvestres) pelo carinho e convivência.

Aos meus amigos, agradeço pelos momentos de descontração, por entenderem minhas ausências, pela amizade sincera e tão duradoura.

Ao RAN/ICMBio por permitir à realização da pesquisa, oportunidade, parceria e motivação.

À Universidade Federal de Uberlândia e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias pela realização do Mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro e o incentivo ao estudo e à pesquisa.

Obrigada!

INFLUÊNCIA DA EXPOSIÇÃO À ATRAZINA E GLIFOSATO NO DESENVOLVIMENTO ÓSSEO DE *Podocnemis expansa* (TESTUDINES, PODOCNEMIDIDAE)

RESUMO: Estima-se que dois terços do total de agrotóxicos conhecidos sejam utilizados na agricultura, resultando benefícios para o produtor, como aumento da produtividade, qualidade e diminuição de perdas. No entanto, apesar de exercerem importantes funções na produção agrícola, a utilização dos mesmos pode afetar indiretamente tanto a flora quanto a fauna. Os herbicidas compõem a categoria com o maior aumento em sua utilização e são suscetíveis a causar efeitos indesejáveis, sobretudo em ambientes aquáticos. Dentre os possíveis organismos não alvos, os répteis representam uma das classes de animais que estão indiretamente afetadas pela aplicação dos agrotóxicos. Sendo assim, objetivou-se avaliar os possíveis efeitos da exposição aos herbicidas atrazina e glifosato no desenvolvimento ósseo de embriões de *Podocnemis expansa*. Em um primeiro experimento, ovos foram incubados artificialmente em areia umedecida com água contaminada com o produto técnico atrazina na concentração de 2, 20 ou 200 µg/L. Em um segundo experimento, a incubação ocorreu com a utilização dos produtos formulados atrazina, nas mesmas concentrações citadas, e glifosato, nas concentrações de 65, 650 e 6500 µg/L. Foram realizadas coletas de ovos de cada incubadora em intervalos regulares para cada experimento até a eclosão. Para análise do desenvolvimento do esqueleto, os embriões foram submetidos às técnicas de diafanização de tecidos moles e coloração dos ossos pela Alizarina red S e das cartilagens por Alcian blue. Os espécimes foram analisados com auxílio de uma lupa estereomicroscópica. Não foram constatadas interferências da atrazina ou glifosato no desenvolvimento ósseo durante a fase embrionária de indivíduos da espécie *P. expansa* nestas condições de exposição.

PALAVRAS-CHAVE: Agrotóxicos, contaminação, ecotoxicologia, esqueleto, herbicidas, répteis, tartaruga-da-Amazônia.

INFLUENCE OF ATRAZINE AND GLYPHOSATE EXPOSURE IN THE BONE DEVELOPMENT IN *Podocnemis expansa* (TESTUDINES, PODOCNEMIDIDAE)

ABSTRACT: It is estimated that two-thirds of all known pesticides are used in agriculture, which causes benefits to producers, such as productivity and quality increase and losses decrease. However, although they have important functions in agricultural production, their use can indirectly affect both flora and fauna. Herbicides are in the category with the largest increase in their use and are likely to cause unwanted effects, especially in aquatic environments due to its high solubility. Among the possible non-target organisms, reptiles are one of the classes of animals that are indirectly affected by the application of pesticides. Therefore, this study aimed to evaluate the possible effects of exposure to atrazine herbicides and glyphosate in the bone development of *Podocnemis expansa* embryos. In a first experiment, eggs were incubated in sand, artificially contaminated with water with the atrazine technical material at a concentration of 2, 20 or 200 µg/L. In a second experiment, incubation occurred with the use of atrazine formulated products, from the aforesaid concentrations and glyphosate at concentrations of 65, 650 and 6500 µg/L. Collection of eggs from each incubator at intervals for each experiment were performed until the egg hatching. Embryos were subjected to diaphanization techniques for analysis of skeletal development. Soft tissue and bone were stained with Alizarin red S and cartilage with Alcian blue. The specimens were analyzed with a stereomicroscope. There were no interference of atrazine or glyphosate in bone development during the early development of *P. expansa* in the tested conditions.

KEYWORDS: Pesticides, contamination, ecotoxicology, skeleton, herbicides, reptiles, turtle-the-Amazon.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	=	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APA	=	Área de Proteção Ambiental
°C	=	Temperatura em Graus Celsius
CAPES	=	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEUA	=	Comitê de Ética na Utilização de Animais
CITES	=	Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies Ameaçadas de Extinção
Cm	=	Centímetro
CONAMA	=	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DDT	=	Diclorodifeniltricloroetano
DL	=	Dose Letal
DNA	=	Ácido desoxirribonucleico
EMBRAPA	=	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ESI	=	Fonte de Ionização Electrospray
et al.	=	e colaboradores
EUA	=	Estados Unidos da América
GEMA	=	Grupo de Genética e Mutagêneses Ambiental
IBAMA	=	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ICMBio	=	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
INMETRO	=	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IUCN	=	International Union for Conservation of Nature

KOH	=	Hidróxido de potássio
LAPAS	=	Laboratório de Ensino e Pesquisa em Animais Silvestres
LC-MS/MS	=	Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas
LQs		Limite de Quantificação
MAPA	=	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MMA	=	Ministério do Meio Ambiente
mL/min	=	Mililitro por minuto
mg/L	=	Miligramma por Litro
mg/Kg	=	Miligramma por quilograma
mm	=	Milímetros
µg/L	=	Microgramas por litro
µg/Kg	=	Micrograma por quilograma
µl	=	Microlitro
NRR	=	Norma Regulamentadora Rural
nº	=	número
ppb	=	Partes por bilhão
RAN	=	Centro de Conservação e Manejo de Répteis e Anfíbios
SISBIO	=	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
UFU	=	Universidade Federal de Uberlândia
UNRC	=	Universidade Nacional de Río Cuarto
USP	=	Universidade de São Paulo
%	=	Porcentagem

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-1: Fórmula estrutural da atrazina. 16
- Figura 1-2: Fórmula estrutural do glifosato. 18
- Figura 1-3: Área de localização das praias onde ocorre a nidificação de *P. expansa* em Área de Proteção Ambiental (APA) Meandros do Rio Araguaia – GO protegidas pelo Centro de Conservação e Manejo de Répteis e Anfíbios (RAN/ICMBio). 24
Fonte: ICMBio MMA.
- Figura 2-1: Embriões de *Podocnemis expansa* incubados artificialmente em areia contaminada com diferentes concentrações de atrazina diafanizados por KOH e corados com azul de alcian (cartilagens) e vermelho de alizarina (ossos). (A) 20µg/L, estágio 16, vista dorsal; (B) 2µg/L, início do estágio 16, vista ventral; (C) 2µg/L, início do estágio 16, vista dorsal; (D) 200µg/L, estágio 20, vista ventral; (E) 200µg/L, estágio 20, vista dorsal; (F) 2µg/L, estágio 22, vista ventral; (G) 2µg/L, estágio 22, vista dorsal; (H) 200µg/L, final do estágio 23, vista ventral; (I) 200µg/L, final do estágio 23, vista dorsal. Escala 5mm. 45
- Figura 2-2: Embriões de *Podocnemis expansa* incubados artificialmente em areia não contaminada diafanizados por KOH e corados com azul de alcian (cartilagens) e vermelho de alizarina (ossos). (A) estágio 15, vista dorsal; (B) estágio 16, vista dorsal; (C) estágio 16, vista ventral; (D) estágio 23, vista dorsal; (E) estágio 23, vista ventral. Escala 5mm. 46
- Figura 3-1: Embriões de *Podocnemis expansa* em vista ventral. (A) controle, estágio 17; (B) controle, estágio 21; (C) controle, estágio 23; (D) substrato contaminado com atrazina 200µg/L, estágio 17; (E) substrato contaminado com atrazina 2µg/L, 65

estágio 21;(F) substrato contaminado com atrazina 2 μ g/L, estágio 23; (G) substrato contaminado com glifosato 65 μ g/L, estágio 17; (H) substrato contaminado com 650 μ g/L, estágio 21; (I) substrato contaminado com glifosato 65 μ g/L, estágio 23. Diafanização por KOH e coloração das cartilagens com azul de alcian e dos ossos com vermelho de alizarina. Escala 5mm.

Figura 3-2: Embriões de *Podocnemis expansa* em vista dorsal. (A) controle, estágio 17; (B) controle, estágio 21; (C) controle, estágio 23; (D) substrato contaminado com atrazina 200 μ g/L, estágio 17; (E) substrato contaminado com atrazina 2 μ g/L, estágio 21; (F) substrato contaminado com atrazina 2 μ g/L, estágio 23; (G) substrato contaminado com glifosato 65 μ g/L, estágio 17; (H) substrato contaminado com 650 μ g/L, estágio 21; (I) substrato contaminado com glifosato 65 μ g/L, estágio 23. Diafanização por KOH e coloração das cartilagens com azul de alcian e dos ossos com vermelho de alizarina. Escala 5mm.

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES GERAIS	13
1.1	AGROTÓXICOS	13
1.1.1	Atrazina	15
1.1.2	Glifosato	17
1.2	ECOTOXICOLOGIA.....	19
1.3	TESTUDINES	21
1.4	<i>Podocnemis expansa</i>	21
1.5	DESENVOLVIMENTO ÓSSEO.....	24
	REFERÊNCIAS.....	26
2	CAPÍTULO 2 - EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À ATRAZINA NO PRIMEIRO DIA DE INCUBAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO ÓSSEO DE <i>Podocnemis expansa</i> (TESTUDINES, PODOCNEMIDIDAE)	39
2.1	INTRODUÇÃO	40
2.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	42
2.2.1	Coleta de ovos	42
2.2.2	Incubação artificial e exposição aos agrotóxicos	42
2.2.3	Manipulação dos embriões	42
2.2.4	Diagnóstico de tecidos moles e coloração de cartilagens e ossos.....	43
2.2.5	Registro e análise dos dados	43
2.2.6	Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas.....	44
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
2.4	CONCLUSÃO	49
2.5	AGRADECIMENTOS	49
	REFERÊNCIAS.....	49
3	CAPÍTULO 3 - EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À ATRAZINA E AO GLIFOSATO AO LONGO DA INCUBAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO ÓSSEO DE <i>Podocnemis expansa</i> (TESTUDINES, PODOCNEMIDIDAE).....	59
3.1	INTRODUÇÃO	60
3.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	62
3.2.1	Coleta dos ovos	62
3.2.2	Incubação artificial e exposição aos agrotóxicos	63

3.2.3	Manipulação dos embriões	63
3.2.4	Diafanização de tecidos moles e coloração de cartilagens e ossos.....	63
3.2.5	Registro e análise dos dados.....	64
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
3.4	CONCLUSÃO	70
3.5	AGRADECIMENTOS	70
	REFERÊNCIAS.....	71

1 CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 AGROTÓXICOS

Registros da utilização de produtos fitossanitários na agricultura datam desde o século XI, com a utilização de sulfurados. Entretanto, somente a partir do século XX é que ocorreu o reconhecimento da eficiência do controle químico na produção vegetal, com a introdução da molécula sintética do herbicida DDT (Diclorodifeniltricloroetano) (MULLER, 1931). Este foi o marco inicial da era “química” na agricultura (NUNES; RIBEIRO, 1999).

Em 1950, com o advento da “Revolução Verde” no período pós-guerra, houve mudanças no processo tradicional da agricultura, bem como nos impactos causados ao ambiente e a saúde humana (MOREIRA et al., 2002). Por volta da década de 60, o uso de inseticidas foi vinculado aos Programas de Saúde Pública, com o objetivo de combater vetores e parasitas (KONRADSENET, 2003). A partir de 1970, verificou-se a necessidade de regulamentação dos agrotóxicos, tendo em vista o seu uso crescente no país. A Legislação foi sendo atualizada através de inúmeras portarias e em 1989 foi criada a Lei dos Agrotóxicos (Lei 7.802, de 11 de julho de 1989), atualizada conforme a necessidade até os últimos anos (Decreto: Lei 4.074, 04 de janeiro de 2002).

Agrotóxicos, defensivos agrícolas, pesticidas, praguicidas são apenas algumas das inúmeras denominações relacionadas a um grupo de substâncias químicas utilizadas no controle de pragas animais e vegetais (FUNDACENTRO, 1998). São utilizadas em florestas, em ambientes hídricos, urbanos, industriais e em larga escala na agricultura e pastagens (PERES et al., 2003). De acordo com a Norma Regulamentadora Rural (NRR) nº 5, acompanhada da Lei Federal nº 7.802 de 11 de julho de 1989, são definidos como agrotóxicos os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos.

O Brasil é considerado um dos grandes produtores agrícolas mundiais que reúne características como competitividade e área disponível para prover a demanda de alimentos, fibras e energia renovável no mundo (ANDEF, 2009). O uso de tecnologia em toda a cadeia produtiva é fundamental para baixar o custo final de produção, acarretando também na crescente utilização de agrotóxicos (PERES et al., 2005). Com a desestruturação ecológica do meio ambiente que se agrava pela remoção de plantas competitivas, seleção de linhagens, monocultivo, adubação química, irrigação, podas e controles de pragas e doenças, o controle químico passa a ser um mecanismo fundamental para assegurar a proteção contra baixa produtividade ou até destruição da espécie cultivada (TAVELLA et al., 2011; JEPSSON et al., 1975). No entanto, cada vez mais o uso desordenado desses produtos tem causado preocupações por parte da sociedade (IBAMA, 2009).

O registro dos agrotóxicos constitui-se no instrumento básico do processo de controle governamental sobre essas substâncias. Consiste em uma etapa obrigatória em vários países com o intuito de minimizar os riscos à saúde humana e ambiental (PERES et al., 2003). Assim, os órgãos governamentais envolvidos no processo possuem a incumbência de avaliar as características agronômicas, toxicológicas e ecotoxicológicas de cada substância, como também estabelecer restrições e recomendações de uso (PERES et al., 2003).

Os agrotóxicos são avaliados e classificados de acordo com à sua periculosidade ambiental e em função dos efeitos à saúde. Com relação aos riscos que os mesmos podem causar no ambiente, esses poluentes são divididos em classes que variam de I a IV: produtos impeditivos de obtenção de registro ou produtos altamente perigosos ao meio ambiente (Classe I); produtos muito perigosos ao meio ambiente (Classe II); produtos perigosos ao meio ambiente (Classe III); e produtos pouco perigosos ao meio ambiente (Classe IV). Quanto a sua toxicidade à saúde animal, essa classificação ocorre em função dos efeitos estudados em animais de laboratório que tentam estabelecer a Dosagem Letal (DL) desses produtos em 50% dos animais submetidos àquela concentração (PERES et al., 2003).

Em 2008, o Brasil assumiu a colocação de maior consumidor de agrotóxicos e o terceiro maior exportador agrícola do mundo, atrás apenas dos Estados Unidos e da União Europeia (TAVELLA, 2011; IBAMA, 2009). Os agrotóxicos são classificados no país de acordo com a sua finalidade, sendo definido pelo seu

mecanismo de ação no alvo biológico. Nesse contexto, o mercado dos herbicidas correspondem a 48%, os inseticidas 25% e os fungicidas (22%), representando juntos 95% do total de agrotóxicos utilizados (AGROW, 2007).

No Brasil, e em todo o mundo, os herbicidas são os mais utilizados dentre os agrotóxicos, e esse aumento ocorre sobretudo em razão da expansão da fronteira agrícola e do aumento de terras onde é realizado o plantio direto (EMBRAPA, 2003). O Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA, 2009) define herbicida como substâncias químicas que evitam, reduzem ou eliminam plantas infestantes, ou seja, ervas daninhas. São utilizadas para o controle químico das plantas consideradas daninhas nas lavouras, que competem por água e nutrientes com a planta cultivada, levando vantagens sobre estas e causando perdas nas culturas. O maior problema no emprego desses herbicidas está relacionado à questão ambiental, visto que a maioria destes compostos apresenta baixa adsorção em solos e altos potenciais de lixiviação. Os efeitos adversos da interação poluente químico – biota pode alcançar diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar em um sistema aquático (AMARANTE et al., 2002).

1.1.1 Atrazina

A atrazina (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina), pertencente a classe das triazinas, é um dos herbicidas mais utilizados em todo o mundo e tem sido encontrada em altas concentrações tanto em águas superficiais como subterrâneas (LUDOVIE, ROSTON e FILHO, 2003). É considerada um interferente endócrino da classe dos xenostrogênios (substância produzida para utilização nas indústrias, na agricultura e para os bens de consumo), ou seja, pode interferir no funcionamento do sistema endócrino de diferentes espécies. No entanto, os efeitos deste herbicida em organismos em níveis moleculares ainda não são muito bem conhecidos, principalmente em espécies aquáticas.

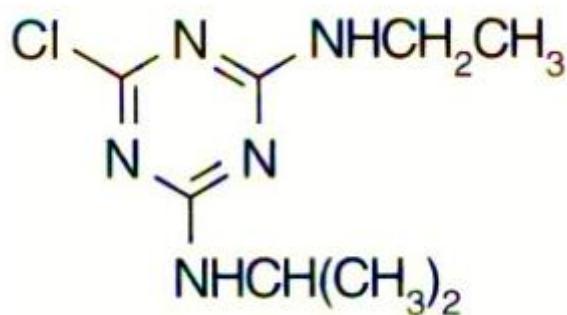


Figura 1-1: Fórmula estrutural da atrazina.

Importante para o controle de alguns cultivos como abacaxi, cana-de-açúcar, milho, pinus, seringueira, a atrazina teve sua utilização ampla em todos os continentes (COUTINHO et al., 2005). No entanto, desde 1993, o uso desse ingrediente ativo foi restrito nos Estados Unidos da América devido a estudos que constataram riscos de efeitos tóxicos em água para consumo humano. Na Europa, a partir de 1989, houve uma baixa comercialização de atrazina devido às restrições de uso e à competição com novos herbicidas menos persistentes no ambiente. Devido a contaminação de águas subterrâneas e superficiais e a comprovação que esse herbicida provoca distúrbios endócrinos em peixes e anfíbios, esse agrotóxico foi banido na Alemanha, Áustria, Dinamarca, Eslovênia e Itália e em toda União Europeia (SALABERRIA; HANSEN; ASENSIO, 2009; ATRAZINE, 2008). No entanto, em países produtores de grãos como o Brasil e a Argentina, seu uso continua ocorrendo, sendo detectadas elevadas concentrações tanto em águas superficiais como subterrâneas (LUDOVICE, ROSTON e FILHO, 2003).

A meia-vida da atrazina no ambiente, ou seja, o intervalo de tempo em que uma amostra deste elemento se reduz a metade, depende das condições ambientais e das características do solo em questão, sendo os microrganismos, bem como a umidade e a temperatura, responsáveis por sua degradação (WOLF e MARTIN, 1975). Segundo Gaynor, Mactovish e Findlay (1992), a degradação deste pesticida oscila entre 20 e 100 dias, existindo casos superiores à 300 dias. Já foi relatado que em temperaturas mais baixas (~7°C) a sua degradação foi insignificante, mas se acelerou acima de 15°C, o que evidencia que a temperatura ótima para degradação está dentro da faixa de atividade metabólica máxima dos microrganismos (MANDELBAUM, ALLAN e WACKETT, 1993). No entanto, quando a atrazina e seus

metabólitos alcançam os cursos d'água sua meia-vida é da ordem de anos (BAIRD, 2002).

A atrazina é comumente detectada no monitoramento de solos e águas, devido ao uso intenso, baixa reatividade e solubilidade. Sendo assim, seus resíduos e metabólitos podem ser encontrados nesses locais após um longo tempo de aplicação (MELI et al., 1992). Estudos vêm identificando diversos pesticidas em corpos hídricos, entre eles a atrazina. Em amostras de rios de regiões da Itália e Espanha, Benvenuto et al. (2010) identificaram compostos triazínicos em amostras em sete de onze rios estudados. Moléculas de atrazina também foram encontradas em águas subterrâneas em uma frequência de 10 a 20 vezes maior que o segundo contaminante da lista de ocorrências catalogadas nos Estados Unidos (HALLBEG, 1989).

O monitoramento de pesticidas em águas superficiais e subterrâneas ainda não é uma prática muito corrente no Brasil, devido à ausência de infraestrutura laboratorial necessária e aos custos elevados envolvidos na realização das análises (ARMAS et al., 2007; SOUZA, 2013). No entanto alguns estudos já verificaram o herbicida atrazina em amostras do aquífero Guarani (CEDEIRA et al., 2005), bacia do rio Itajaí em Santa Catarina (PINHEIRO, SILVA e KRAISCH, 2010), em áreas agrícolas próximas à cidade de Primavera do Leste (DORES, 2001) e em águas superficiais e subterrâneas do Baixo Jaguaribe, Ceará (MILHOME et al., 2009)

1.1.2 Glifosato

O grande destaque na utilização dos herbicidas é a participação do ingrediente ativo glifosato no mercado brasileiro, que representa 76% do total de herbicidas comercializados (IBAMA, 2009). Seu uso é aprovado em 26 culturas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), dentre elas algodão, café, cana-de-açúcar, feijão, milho, soja, trigo, entre outros (MAPA, 2010).

O glifosato, de nome químico N-(fosfonometil) glicina, é considerado um dos produtos químicos mais populares do mercado atual. Foi desenvolvido em 1950 como um potente agente complexo. Em 1970, a Monsanto descobriu sua ampla atividade como herbicida e no ano seguinte já foi lançado no mercado como o produto comercial Roundup® (SMITH e OEHME, 1992).

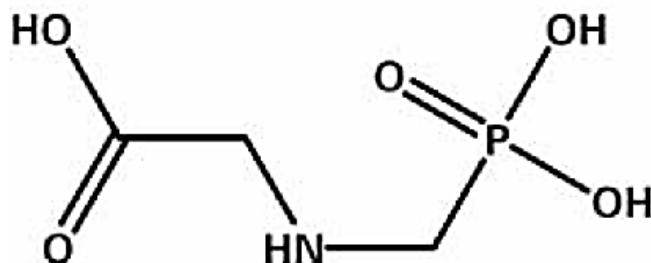


Figura 1-2: Fórmula estrutural do glifosato.

O glifosato é considerado tóxico para organismos aquáticos, pouco tóxico para organismos do solo, aves e abelhas e pouco bioacumulável. Embora seja degradado por microrganismos, esse herbicida apresenta persistência variável no ambiente (NEWTON et al., 1994). Em dados semestrais do ano de 2009, foram comercializadas no Brasil 71 marcas de produtos formulados a base de glifosato, registradas por 20 diferentes empresas (MAPA, 2010). Sua meia-vida no ambiente varia de menos de uma semana a alguns meses, dependendo dos teores de matéria orgânica, argila e do nível de atividade microbiana (TONI et al., 2006; GIESY et al., 2000; WAUCHOPE et al., 1992).

A avaliação dos riscos potenciais do herbicida glifosato para a saúde humana e ambiental foi centrada na presença de resíduos nos vegetais e animais destinados ao consumo humano. Alguns estudos de efeitos adversos em laboratório e em campo demonstraram que o glifosato tem baixa toxicidade para abelhas, minhocas e aves, e que o risco é pequeno para organismos aquáticos (DALLEGRAVE, 2003). No entanto, estudos têm demonstrado efeitos negativos desse herbicida sobre a morfologia normal e reprodução de minhocas expostas a este agrotóxico (CORREIA e MOREIRA, 2010), anomalias em fetos de ratos com retardos no desenvolvimento esquelético (BRAKE e EVERSON, 2004; DALLEGRAVE, 2003), retardo no crescimento, variações anatômicas em ratos e coelhos (WHO, 1994).

Com relação ao contato humano, esse herbicida foi considerado de baixa toxicidade, volatilidade e de reduzida absorção cutânea, tornando sua aplicação segura para trabalhadores que utilizam todos os equipamentos de proteção (DALLEGRAVE, 2003). No entanto, estudos já constataram além de rinite, alterações mutagênicas no DNA e dermatites em pessoas que entraram em contato com esse herbicida (SLAGER et al., 2010; MLADINIC et al., 2009; NIELSEN et al., 2007).

Em razão do seu consumo elevado, associado às suspeitas sobre o seu potencial de interferência no sistema endócrino humano, o glifosato também foi incluído na lista dos 14 agrotóxicos atualmente em reavaliação pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2008).

1.2 ECOTOXICOLOGIA

O termo ecotoxicologia é empregado para relacionar os efeitos tóxicos das substâncias químicas e dos agentes físicos sobre os organismos vivos, nas populações e nas comunidades de um ecossistema definido, incluindo ainda os caminhos da transferência desses agentes e sua interação com o ambiente (IBAMA, 2009). A capacidade de afetar os ecossistemas ou ecotoxicidade dos agrotóxicos é variável e depende das propriedades dos ingredientes inertes e ativos que compõem o produto (IBAMA, 2009). Estudos desta natureza têm enfoque mais ambiental, por meio do envolvimento das substâncias químicas com o ambiente e manutenção das espécies que ali se encontram (CUNHA, 2011). Trabalhos toxicológicos já ocorriam há mais tempo, apesar do termo “ecotoxicologia” ser mais recente. No entanto, a maioria desses estudos, não focavam na manutenção dos ecossistemas, mas analisava apenas a toxicidade individual das espécies (CUNHA, 2011).

A toxicidade de um composto químico depende da frequência da exposição, da susceptibilidade do organismo, de fatores ambientais e das características químicas do agente (TOMITA e BEYRUTH, 2002; RAND; PETROCELLI, 1985). Tendo em vista seus hábitos alimentares, habitat, comportamento, fase de desenvolvimento, aparato metabólico, dentre outros aspectos, a susceptibilidade pode ser diferentes entre as espécies (CARVALHO e PIVOTO, 2011).

A ecotoxicidade de determinado composto químico é variável e depende também das propriedades dos ingredientes ativos e inertes que compõe o produto. Dependendo de sua toxicidade e do tempo que permanece disponível no meio ambiente, os agrotóxicos podem interferir em processos básicos do ecossistema, como respiração do solo, ciclagem de nutrientes, mortalidade de peixes ou aves, redução em população de espécies, entre outros (IBAMA, 2009).

A degradação de ambientes aquáticos ocorre devido à descarga direta ou indireta de efluentes industriais, domésticos ou agrícolas não tratados corretamente

e fora dos padrões das normas ambientais (MARTINEZ e CÓLUS, 2002). Esses ambientes são altamente vulneráveis às substâncias químicas tóxicas, sendo que diversas classes de compostos são agressivas a estes ecossistemas (CARNIATO et al., 2007).

As espécies podem sofrer exposição aguda e/ou crônica. Na aguda, os organismos entram em contato com o composto em apenas um único evento ou em eventos múltiplos que ocorrem em um pequeno período de tempo, variando geralmente de horas a dias. Os efeitos dessa exposição são imediatos, embora já tenha sido relatado a produção de efeitos retardados semelhantes aqueles resultantes de exposição crônica (RAND; PETROCELLI, 1985). Na exposição crônica, segundo os mesmos autores, os organismos são expostos a baixas concentrações do agente tóxico, liberado continuamente ou com certa periodicidade ao longo de um período de tempo (semanas, meses ou anos). No entanto, podem induzir efeitos rápidos e imediatos, em alguns casos.

Os testes de toxicidade vão muito além da letalidade de certas substâncias e incluem avaliação de danos menores e que podem ser contínuos em uma geração. Geralmente utilizam-se certos organismos como peixes, crustáceos e algas que são expostos a determinados agentes tóxicos por um período de tempo específico. Esses estudos são realizados a fim de se investigar os efeitos agudos e crônicos das espécies, além dos possíveis efeitos desses produtos químicos na reprodução e desenvolvimento dos indivíduos (KNIE e LOPES. 2004).

Tendo em vista a grande complexidade e variedade das interações entre esses parâmetros, tornou-se fundamental a padronização de estudos e monitoramento para avaliar os impactos ambientais. Esses testes são aplicados também para avaliar a sensibilidade relativa de organismos aquáticos para determinado contaminante ou agente tóxico ou ainda a eficiência de diferentes métodos de tratamento para efluentes industriais (METCALF e EDDY, 2003). Testes em laboratório são realizados com organismos aquáticos, principalmente com peixes, vistos que os mesmos podem acumular substâncias tóxicas em concentrações muito acima daquelas encontradas nas águas onde vivem de forma direta (HELFRICH et al. 1996). No entanto, há poucos estudos referentes a contaminação e a exposição de outros organismos aquáticos, como os Testudines.

1.3 TESTUDINES

O território brasileiro tem a fauna e flora mais rica de toda a América Latina. No entanto, apesar de muitos trabalhos desenvolvidos, algumas informações sobre répteis ainda são preliminares. Esta classe, através de várias adaptações, conquistou o meio terrestre e sua reprodução não mais depende do ambiente aquático (SILVA e SASSON, 2003). Dentre os répteis, destaca-se a ordem dos Testudines que inclui as tartarugas marinhas, jabutis e os cágados, predadores estes exclusivos de água doce (SILVA e SASSON, 2003; BANZAN, 2008).

A ordem Testudines é a mais antiga de todas entre os vertebrados atuais, sendo que a evidência fóssil mais antiga data do período Permiano, que ocorreu a cerca de 280 milhões de anos atrás (FERRI, 2002). São vertebrados diferenciados, com características primitivas e estruturas altamente especializadas que se desenvolveram ao longo do tempo (POUGH et al, 2008). A história de vida de muitos dos representantes desse grupo, principalmente os de grande porte, faz com que eles sejam vulneráveis ao declínio populacional, devido às baixas taxas de crescimento e aos longos períodos necessários para que atinjam a maturidade. Essas características, bem como um longo período de vida, estão associados geralmente a uma baixa taxa de substituição de indivíduos na população, fato esse que pode predispor as espécies ao risco de extinção (POUGH et al., 2008).

Os Testudines estão entre os animais mais ameaçados do mundo (BONIN, 2006). O Brasil possui 36 espécies distribuídas nos seus mais diversos ecossistemas aquáticos e terrestres, sendo 29 espécies de água doce, duas terrestres e cinco marinhas. Dentre eles, destaca-se a família Podocnemididae, onde se encontram as espécies *Peltocephalus dumerilianus*, *Podocnemis unifilis*, *P. eritrocephala*, *P. sextuberculata*, *P. expansa*. Esta última é o maior Testudines de água doce da América do Sul (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA, 2014).

1.4 *Podocnemis expansa*

Popularmente conhecida como tartaruga-da-Amazônia, tartaruga-verdadeira, arauá ou jurará-açu (LUZ; REIS, 1998), a *Podocnemis expansa*, assim como todos os representantes de sua ordem, apresentam a carapaça como instrumento de defesa

e fuga de seus predadores. Alimentam-se de frutos, raízes, folhas e sementes, bem como moluscos, crustáceos e alguns peixes (IBAMA, 1989).

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

A nidificação de *P. expansa* ocorre preferencialmente nas praias após a meia-noite em grupo de centenas e até milhares (PRITCHARD, 1979; PRITCHARD e TREBBAU 1984; ERNST e BARBOUR 1989; DUPRE et al. 2007, SALERA JÚNIOR et al., 2009). As fêmeas sobem as praias, caminham lentamente pela areia, escavam um ninho profundo e depositam em média 100 ovos dentro de câmaras. Após sua oviposição, as fêmeas fecham os ninhos e retornam para o rio. Todas essas etapas desde a saída para a postura e retorno ao rio levam geralmente mais de duas horas (VANZOLINI 1967, ALHO e PÁDUA 1982, PRITCHARD e TREBBAU 1984).

Devido a coleta de seus ovos e carne, fonte de proteínas para povos ribeirinhos que vivem na região, a população de *P. expansa* vem sendo reduzida drasticamente (PEARSE et al., 2006; MOLL e MOLL, 2004). Em 2011, foi regulamentada no Apêndice II da Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies Ameaçadas (CITES), e listada segundo a União Internacional para a Conservação da Natureza como espécie com baixo risco de extinção, mas dependentes de programas de conservação para sua proteção (IUCN, 2011).

A grande predação de Testudines ocorrida entre os anos de 1960 e 1970 alarmou o Governo Federal Brasileiro, que publicou a Lei nº 5.197 dispondo proteção sobre a fauna e proibindo a captura, caça ou a coleta de animais silvestres em qualquer fase de seu desenvolvimento, bem como seus ninhos, abrigos e

criadouros naturais (ROCHA, 2011). Em 1979, o Governo Federal, com o propósito de conservar Testudines de água doce, estabeleceu o Projeto de Proteção e Manejo de Quelônios da Amazônia. Esse projeto de proteção é coordenado desde 1989 pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA).

O Centro de Conservação e Manejo de Répteis e Anfíbios (RAN) foi criado em 2001 através da portaria nº 58. É considerado um dos maiores centros de manejo e conservação de Testudines do mundo (OLIVEIRA, 2003). O Projeto Quelônios da Amazônia atualmente é coordenado pelo RAN, pertencente ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio (ROCHA, 2011; BATAUS, 1998). Uma das principais metas desse projeto é recuperar e proteger áreas de reprodução, e por meio de estratégias de manejo, aumentar o sucesso reprodutivo das espécies de tartarugas, especialmente *P. expansa* (BANZAN, 2008; CANTARELLI, 2006). O mesmo atua em várias localidades do país, dentre elas as bacias Amazônica e Tocantins/Araguaia, áreas de ocorrência natural da espécie (ROCHA, 2011).

A Área de Proteção Ambiental (APA) Meandros do Rio Araguaia compreende as várzeas situadas nos rios Araguaia, Crixás-Açu, Verde e Cristalino e abrange os Estados de Goiás, Mato Grosso e Tocantins, nos municípios de Nova Crixás e São Miguel do Araguaia (GO), Cocalinho (MT) e Araguaçu (TO). Com o intuito de preservar a fauna e a flora da região de transição entre os biomas Cerrado e Amazônia, entre eles *P. expansa*, essa área foi criada em 1998 (ROCHA, 2011). O distrito de Luiz Alves, pertencente ao município de São Miguel do Araguaia (GO), possui área de desova da espécie, popularmente denominada de “Remansão”. Com 40km de extensão, essa região apresenta várias praias que anualmente são selecionadas por fêmeas para oviposição.

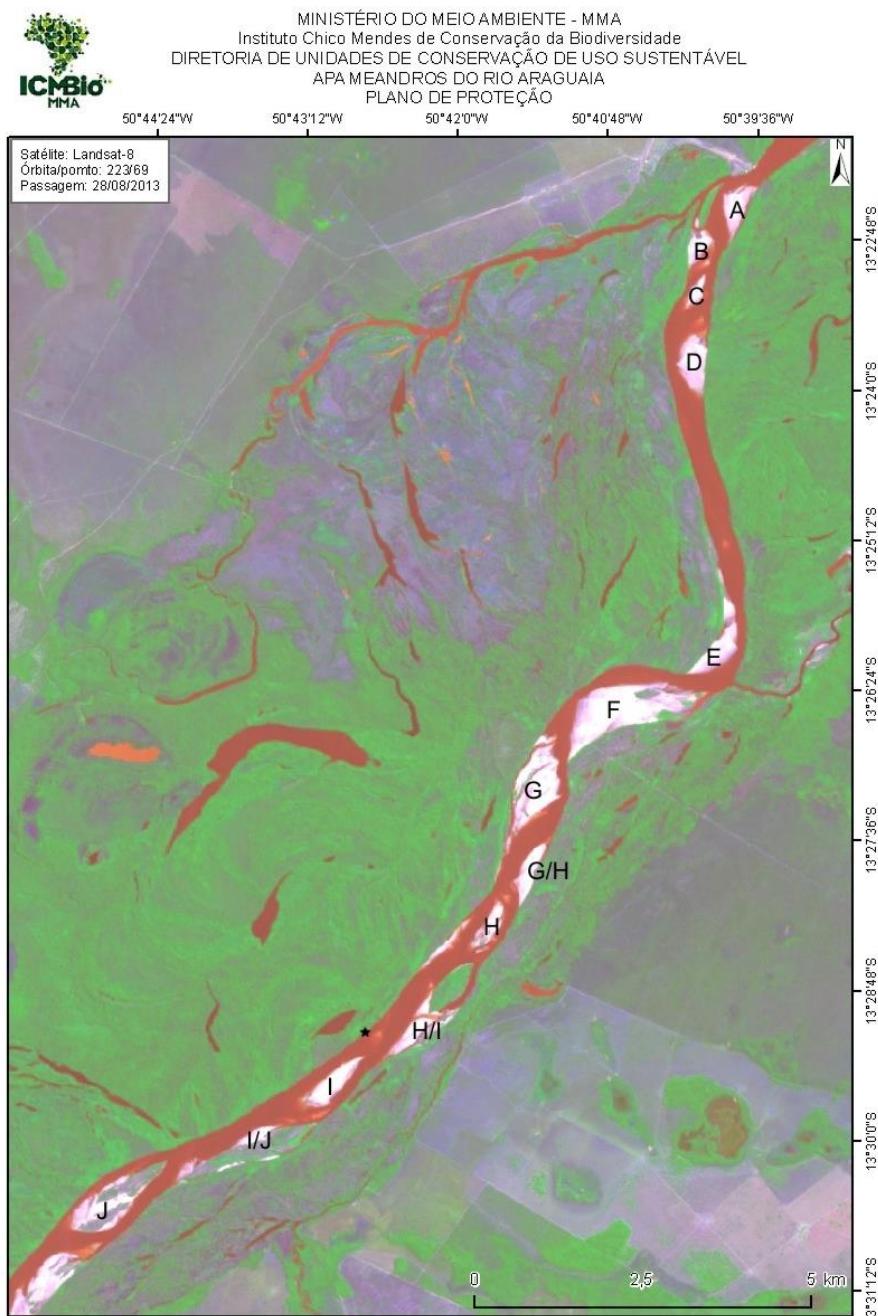


Figura 1-3: Área de localização das praias onde ocorre a nidificação de *P. expansa* em Área de Proteção Ambiental (APA) Meandros do Rio Araguaia – GO protegidas pelo Centro de Conservação e Manejo de Répteis e Anfíbios (RAN/ICMBio). Fonte: ICMBio MMA.

1.5 DESENVOLVIMENTO ÓSSEO

O esqueleto pode ser um bioindicador importante para investigar os efeitos de substâncias lançadas no ambiente ou para o estudo do potencial teratogênico de novas moléculas (BELL et al., 2006). Corresponde a um conjunto de estruturas vivas

capaz de crescer e sofrer adaptações e reparos, desenvolvendo-se juntamente com as demais estruturas. Estão presentes em quase todas as regiões do corpo e os elementos esqueléticos individuais são bastante diversos em sua morfologia e arquitetura tecidual (VIEIRA, 2008; WHITE et al., 2003).

No sentido de se conhecer o desenvolvimento ósseo de répteis, a ordem Testudines tem sido objeto de numerosos estudos em embriogênese. Muitos destes trabalhos focalizaram principalmente a morfologia externa (NORO et al., 2009; IUNGMAN et al., 2008; BOUGHNER et al., 2007). Alguns autores forneceram dados que descreveram a sequência de ossificação do esqueleto (SHEIL e GREENBAUM, 2005; FRANZ-ODENDAAL, 2006). Há ainda trabalhos descrevendo efeitos dos fatores externos na embriogênese, como exposição aos derivados de petróleo (PACKARD et al., 2000; BELL et al., 2006; WIESNER e IBEN, 2003). No entanto, apesar da importância, nenhum estudo experimental de exposição a agrotóxicos durante incubação de ovos de répteis brasileiros foi descrito, especialmente no que se refere ao desenvolvimento ósseo.

O esqueleto de *P. expansa*, assim como os demais répteis, em sua maior parte, forma-se e cresce por ossificação endocondral, um processo caracterizado por uma cartilagem intermediária (VIEIRA, 2008; POGUE et al., 2004; TAGARIELLO et al., 2005). O processo de formação deste molde de tecido cartilaginoso envolve várias fases em que células mesenquimais pré-condrogênicas formam condensações antes de diferenciarem em condroblastos (POGUE et al., 2008; VIEIRA, 2008; TAGARIELLO et al., 2005). Cada uma dessas etapas, na transição desde condensação até diferenciação, é caracterizada por padrões temporais específicos e várias mudanças ocorrem em períodos previsíveis. Perturbações nesta série altamente orquestrada de acontecimentos em desenvolvimento de cartilagem e osso, crescimento e homeostase, inevitavelmente podem resultar em defeitos do esqueleto (VIEIRA, 2008; BELL et al., 2006).

REFERÊNCIAS

AGROW - Complete guide to generic pesticides. 2007. Disponível em:<http://www.agrow.com/multimedia/archive/00053/DS258_58994a_53150a.pdf> Acesso em: 16 nov 2014.

ALHO, C.J.R.; PÁDUA, L.F.M. Early growth of pen-reared Amazon turtles (*Podocnemis expansa*) (Testudinata, Pelomedusidae). **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 4, p. 641-646, 1982.

AMARANTE JUNIOR, O. P.; SANTOS, T. C. R.; BRITO, N. M.; RIBEIRO, M. I. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 4, p. 589-593, 2002.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC 10 de 07 de julho de 2008. Brasília: Anvisa; 2008.

ARMAS, E. D.; MONTEIRO, R. T. R.; ANTUNES, P. M.; SANTOS, M. A. P. F.; CAMARGO, P. B. Diagnóstico espaço-temporal da ocorrência de herbicidas nas águas superficiais e sedimentos do Rio Corumbataí e principais afluentes. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, p. 1119-1127, 2007.

ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE DEFESA VEGETAL – ANDEF. Tecnologia em primeiro lugar: o Brasil a caminho de se tornar o maior produtor mundial de grãos. **Revista Defesa Vegetal**, Maio de 2009.

ATRAZINE SHEET (Atrazine), 2008.

BAIRD, C. **Química ambiental**. 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 607 p.

BANZAN, N. M. Sucesso reprodutivo da tartaruga-da-amazônia *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) (Reptilia: Pelomedusidae), no município de Ribeirão Cascalheira – MT. 2008. 43f. Trabalho de Conclusão de Curso

(Departamento Ciências Biológicas – Universidade do Estado do Mato Grosso, 2008.

BATAUS, Y. S. L. **Estimativa de parâmetros populacionais de *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) no rio Cricás-açu (GO) a partir de dados biométricos.** 1998. 58 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia), Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 1998.

BELL, B.; SPOTILA, JR.; CONGDON, J. High incidence of deformity in aquatic turtles in the John Heinz National Wildlife Refuge. **Environmental pollution**, Barking, v. 142, p. 457-465, 2006.

BRAKE, D. G.; EVERSON, D. P. A generational study of glyphosate-tolerant soybeans on mouse fetal, postnatal, pubertal and adult testicular development. **Food and chemical toxicology**, Oxford, v. 42, n. 1, p 29-36, 2004.

BENVENUTO, F.; MARÍN, J. M.; SANCHO, J. V.; CANOBBIO, S.; MEZZANOTTE, V.; HERNÁNDEZ, F. Simultaneous determination of triazines and their main transformation products in surface and urban wastewater by ultra-high-pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytical Bioanalysis Chemical**, v. 397, p. 2791–2805, 2010.

BONIN, F., DEVAUX, B.; DUPRÉ, A. **Toutes les Tortues du Monde.** Paris: Delachaux and Niestle, 416 pp. 2006.

BOUGHNER, J. C.; BUCHTOVÁ M; FU, K.; DIEWERT, V.; HALLGRÍMSSON, B.; RICHMAN, J. M. Embryonic development of *Python sebae* - I: Staging criteria and macroscopic skeletal morphogenesis of the head and limbs. **Zoology**, Jena, v. 110, p. 212-230, 2007.

CANTARELLI, V. H. **Alometria Reprodutiva da Tartaruga-da-Amazônia (*Podocnemis expansa*): Bases Biológicas para o Manejo.** Tese (Doutorado), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba. 2006.

CARNIATO, J. G.; GERALDO, S. M.; BRITO-PELEGRINI, N. N.; PELEGRINI, R.T.; PATERNIANI, J.E.S. Avaliação da toxicidade de percolado de resíduos sólidos pós tratamento biológico e fotocatalítico. **Engenharia Ambiental: Pesquisa e Tecnologia**, v. 4, n. 2, p. 92-101, 2007.

CARVALHO, N. L.; PIVOTO, T. S. Ecotoxicology: Concepts, scope and agronomic importance. **Revista Eletrônica do PPGEAmp-CCR//UFSM**, v. 2, n. 2, p. 176 –192, 2011.

CARVALHO, J. C. M. **Atlas da Fauna Brasileira**. 3^a Ed. São Paulo: Companhia de Melhoramentos; Brasília, DF: Fundação de Assistência ao Estudante, 140p. 1995.

CERDEIRA, L. A.; PESSOA, M. C. P. Y.; SANTOS, N. A. G.; LANCHOTE, V. L. Lixiviação de atrazina em solo em área de recarga do Aquífero guarani. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 4, n. 2, p. 92-101, 2005.

CORREIA, F. V.; MOREIRA, J. C. Effects of glyphosate and 2,4-D on earthworms (*Eisenia foetida*) in laboratory tests. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, New York, v. 85, n. 3, p.264-268, 2010.

COUTINHO, C. F. B.; TANIMOTO, S. T.; GALLI, A.; GARBELLINI, G. S.; TAKAIAMA, M.; AMARAL, R. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Pesticidas: Mecanismo de ação, degradação e toxidez. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 15, p. 65-72, 2005.

CUNHA, L. M. R. **Ecotoxicologia e a qualidade da água para o uso na agricultura**. Estágio Supervisionado - Universidade de Brasília, Gestão de Agronegócio. 24f. 2011.

DALLEGRAVE, E.; MANTESE, F. D.; COELHO, R. S.; PEREIRA, J. D.; DALSENTER, P. R.; LANGLOH, A. The teratogenic potential of the herbicide glyphosate-Roundup in Wistar rats. **Toxicology letters**, v. Amsterdam, 142, n. 1-2, p 45-52, 2003.

DORES, E. F. G. C; DE-LAMONICA-FREIRE, E. M. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas. Estudo de caso: águas usadas para consumo humano em primavera do leste, Mato Grosso – análise preliminar. **Quimica Nova**, São Paulo, v. 24, n.1, p. 27-36, 2001.

DUPRE, A., DEVAUX, B. & BONIN, F. 2007. **Turtles of the World**. A & C Black Publishers Ltd, London, 416 p.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Tecnologias de Produção de Soja Região Central do Brasil 2003**. 2003. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Soja/SojaCentralBrasil2003/controle.htm>>. Acesso em 19 dez 2014.

FERRI, V. **Turtles & Tortoises: A Firefly Guide**. Firefly Books. 256p. 2002.

FRANZ-ODENDAAL, T. A. Intramembranous ossification of scleral ossicles in *Chelydra serpentina*. **Zoology**, Jena, v.109, p.75-81, 2005.

FUNDACENTRO. Prevenção de acidentes no trabalho com agrotóxicos: segurança e saúde no trabalho, n. 3. São Paulo: Fundação Jorge Duprat Figueiredo de Segurança e Medicina do Trabalho, Ministério do Trabalho, 1998.

GAYNOR, J. D.; MACTAVISH, D. C.; FINDLAY, W. I. Surface and sub-surface transport of atrazine and alachlor from a Brookston clay loam under continuous corn production. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 23, p. 240-245, 1992.

GIESY, J. P.; DOBSON, S.; SOLOMON, K. R. Ecotoxicological risk assessment for roundup herbicide. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v.167, n.1, p.35-120, 2000.

HALLBERG, G.R. Pesticides pollution of groundwater in the humid United States. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v. 26, p. 299-367, 1989.

HELFRICH, L.A.; WEIGMANN, D.L.; HIPKINS, P.; STINSON, E.R. **Pesticides and aquatic animals: a guide to reducing impacts on aquatic systems.** Disponível em: <www.ext.vt.edu/pubs/waterquality/420-013/420-013.pdf>. Acesso em 30 de dez. 2014.

IBAMA - O INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Manual para requerimento de avaliação ambiental: agrotóxicos e afins.** Brasília: DIQUA/ CGASQ. Brasília: Ibama, 2009. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/qualidade-ambiental/manualde-procedimento-para-registro-de-agrotoxicos/>>. Acesso em: 22 dez 2014.

IBAMA - INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: uma abordagem ambiental.** REBELO, R. M. Brasília: Ibama, p. 84 2010.

IBAMA - O INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. 1989. Projeto Quelônios da Amazônia: 10 anos. IBAMA, Brasília, 119 p.

IUCN - INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE AND NATURAL RESOURCES –. 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Disponível em:<<http://www.redlist.org>> Acessado em 27 out 2014.

IUNGMAN, J.; PIÑA, C. I.; SIROSKI, P. Embryological development of *Caiman latirostris* (Crocodylia: Alligatoridae). **Genesis**, New York, v. 46, p.401-417, 2008.

JEPPSON, L. R.; KEIFER, H. H.; BAKER, E. W. **Mites injurious to economic plants.** Berkeley: University of California Press, 1975. 614 p.

KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B. **Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações.** Florianópolis: FATMA / GTZ, p. 289, 2004.

KONRADSEN, F.; VAN DER HOEK, W.; COLE, D. C.; HUTCHINSON, G.; DAISLEY, H.; SINGH, S.; EDDLESTON, M. Reducing acute poisoning in developing countries – options for restricting the availability of pesticides. **Toxicology**, v.192, n 2-3, p. 249-26, 2003.

LUDOVICE, M. T. F.; ROSTON, D. M.; FILHO, J. T. Efeito da faixa-filtro na retenção de atrazina em escoamento superficial. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 7, n. 2, p. 323-328, 2003.

LUZ, V. L. F.; REIS, I. J. Biologia, Manejo e Conservação de Répteis. Ordem dos Testudines. In: XXII CONGRESO BRASILEIRO DE ZOOLÓGICOS, IV ENCONTRO INTERNACIONAL DE ZOOLÓGICOS. Área Técnica de Criação de Testudines em Cativeiro, Centro Nacional dos Testudines da Amazônia, CENAQUA, **Anais...** p. 5-8. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, IBAMA, Salvador: 1998.

MALVASIO, A. **Aspectos do mecanismo alimentar e da biologia reprodutiva em *Podocnemes expansa* (Schweigger, 1812), *Podocnemes unifilis* (Troschel, 1848) e *P.sex tuberculata* (Cornalia, 1809)**(Testudines, Pelomedusidae). 2001.199p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas)- Faculdade de zoologia, Instituto de biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

MANDELBAUM, R. T.; ALLAN, D. L.; WACKETT, L. P. Isolation and Characterization of a Pseudomonas sp. That Mineralizes the s-Triazine Herbicide Atrazine. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 4, p. 1451-1457, 1993.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA. E ABASTECIMENTO. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT)**. 2010. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 19 nov 2014.

MARTINEZ, C. B. R.; CÓLUS, I. M. S. Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi. In: MEDRI, M. E. et al. (Ed.). **A bacia do Rio Tibagi. Londrina:** M. E. Medri, p. 551-577, 2002.

MELI, G.; BAGNATI, R.; FANELLI, R.; BENFENATI, E.; AIROLDI, L. Metabolic profile of atrazine and nitrosoatrazine in rat urine. **Bulletin environmental contamenation toxicology.**, New York, v. 48, n. 5, p. 701-708, 1992.

METCALF, L.; EDDY, H.P. **Wastewater engineering treatment in reuse.** 4.ed. McGraw Hill: Boston. 2003.

MILHOME, M.A.L.; SOUSA, D. O. B.; LIMA, F. A. F.; NASCIMENTO, R. F. Avaliação do potencial de contaminação de águas superficiais e subterrâneas por pesticidas aplicados na agricultura do baixo Jaguaribe, CE. Artigo Técnico, **Engenharia Sanitária Ambiental**, v.14, n.3, 2009.

MLADINIC, M.; BEREND, S.; VRDOLJAK, A. L.; KOPJAR, N.; RADIC, B.; ZELJEZIC, D. Evaluation of genome damage and its relation to oxidative stress induced by glyphosate in human lymphocytes in vitro. **Environmental and molecular mutagenesis**, New York, v. 50, n. 9, p 800-807, 2009.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Projeções do Agronegócio: Brasil 2009/2010 a 2019/2020.** Brasília: MAPA; 2010. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Ministerio/planos%20e%20programas/projcoes_web1.pdf> Acesso em: 30 dez. 2014.

MOLINA, F.B; ROCHA, M. B. Identificação, caracterização e distribuição dos quelônios da Amazônia brasileira. Apostila da aula ministrada no mini-curso “Metodologia de pesquisa e classificação de quelônios” In: Encontro sobre quelônios da Amazônia. 1996. Belém. **Anais...** CENAQUA/IBAMA. p.1-25. 1996.

MOLL, D.; MOLL,E. O. **The ecology, exploitation and conservation of river turtles.** New York: Oxford University Press. 420p. 2004.

MOREIRA, D. L; ENGELHARDT, R. L.; REIS, A. S.; SANCHES, E. M.; LEITÃO, S. G.; LEITÃO, G. G. Substâncias fenólicas com atividade antioxidante de

Pseudopiptadenia contorta (Leguminosae-Mimosoideae). **Revista brasileira de farmacognosia**, São Paulo, v. 12, p. 124-125, 2002.

NEWTON, M.; HORNER, L. M.; COWELL, J.E.; WHITE, D.E.; COLE, E.C. Dissipation of glyphosate and amino methyl phosphonic acid in North American forest. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Nitra, v.42,p.1795-1802, 1994.

NIELSEN, J. B.; NIELSEN, F.; SORENSEN, J. A. Defense against dermal exposures is only skin deep: significantly increased penetration through slightly damaged skin. **Archives of dermatological research**, Berlin, v. 299, n. 9, p. 423-431. 2007.

NORO, M.; UEJIMA, A.; ABE, G.; MANABE, M.; TAMURA, K. Normal Developmental Stages of the Madagascar Ground Gecko *Paroedura pictus* With Special Reference to Limb Morphogenesis. **Developmet Dynamics**, New york, v. 238, p. 100-109, 2009.

NUNES, G. S.; RIBEIRO, M. L. Pesticidas: Uso, Legislaçäoe Controle. Pesticidas. **Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v.9, p.31-44, 1999.

OLIVEIRA, L. M. **Importância da Tartaruga-da-Amazônia (*Podocnemis expansa*) (SCHWEIGGER, 1812) (REPTILIA, TESTUDINES, PELOMEDUSIDAE) para a população humana de São Félix do Araguaia-MT.** Monografia, Departamento de Biologia, Curso de Pós-Graduação em ecologia do Cerrado. Universidade do Estado do Mato Grosso. Nova Xavantina. 2003.

PACKARD, G. C.; PACKARD, M. J. E.; BIRCHARD, G. F. Availability of water affects organ growth in prenatal and neonatal snapping turtles (*Chelydra serpentina*). **Journal of Comparative Physiology**, Berlin, v. 170, p. 69-74, 2000.

PEARSE, D.E.; ARNDT, A.D.; VALENZUELA, N.; MILLER, B.A.; CANTARELLI, V.; SITES, J.W. JR. Estimating population structure under non-equilibrium conditions in a conservation context: continent- wide population genetics of the giant Amazon river turtle *Podocnemis expansa* (Chelonia; Podocnemidae). **Molecular Ecology**, Oxford, v. 15, p. 985-1006, 2006.

PERES, F.; MOREIRA, J. C.; DUBOIS, G. S. Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema, pp. 21-41. In: É veneno ou é remédio? **Agrotóxicos, saúde e ambiente**. Fiocruz, Rio de Janeiro. 2003.

PERES, F.; ROZEMBERG, B.; LUCCA, S. R. Percepção de riscos no trabalho rural em uma região agrícola do estado do Rio de Janeiro, Brasil: agrotóxicos, saúde e meio ambiente. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 6, p. 1836-1844, 2005.

PINHEIRO, A.; SILVA, M. R.; KRAISCH, R. Presença de pesticidas em águas superficiais e subterrâneas na bacia do Itajaí, **SCREGA**, v. 7, no. 2, p. 17-26, jul./dez. 2010.

POUGH, F. H.; ANDREWS, R. M.; CADLE,J.E.; CRUMP, M.L.; SAVITSKY,A.H.; WELLS, K. D. **Herpetology**. 3rd ed. New Jersey: Pearson prentice hall.736p. 2003.

POUGH, F.H.; HEISER, J.B.; JANIS,C.M. **A vida dos vertebrados**. 4.ed. São Paulo: Atheneu Editora. 684p. 2008.

POGUE, R.; SEBALD, E.; KING, L.; KRONSTADT, E.; KRAKOW, D.; COHN, D. H. A transcriptional profile of human fetal cartilage. **Matrix Biology**, Stuttgart, v. 23, p. 299–307, 2004.

PRITCHARD, P. C. H.; TREBBAU, P. **The Turtles of Venezuela**. Caracas: Society for Study of Amphibians and Reptiles, 1984 403 p.

PRITCHARD, P.C.H. **Encyclopedia of Turtles**. T.F.H. Publ. Inc., Neptune, 1979, 895 p.

RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. Introduction. In: RAND, G.M.;PETROCELLI, S.R., (Ed.). **Fundamentals of aquatic toxicology**: methods and applications, New York: Hemisphere, p.1-28. 1985.

ROBERTSON, S. P.; TWIGG, S. R.; SUTHERLAND-SMITH, A. J.; BIANCALANA, V.; GORLIN, R. J.; HORN, D.; KENWRICK, S. J.; KIM, C. A.; MORAVA, E.; NEWBURY-ECOB, R.; ORSTAVIK, K. H.; QUARRELL, O. W.; SCHWARTZ, C. E.; SHEARS, D. J.; SURI, M.; KENDRICK-JONES, J.; WILKIE, A. O.. et al., Localized mutations in the gene encoding the cytoskeletal protein filamin A cause diverse malformations in humans. **Nature Genetics**, New York, v. 33, p. 487 – 491, 2003

ROCHA, B. B. S. Diversidade Genética da Tartaruga da Amazônia (*Podocnemis expansa* Schweigger, 1812) na Bacia Hidrográfica Tocantins-Araguaia. Iniciação Científica - **PIBIC/ICMBio, Ministério do Meio Ambiente Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Répteis e Anfíbios**, Brasília, 2011.

SALABERRIA, I.; HANSEN, B. J.; ASENSIO, V.; OLSVIK, P. A.; ANDERSEN, R. A.; JENSSSEN, B. M. Effects of atrazine on hepatic metabolism and endocrine homeostasis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Toxicology and applied pharmacology**, New York, v. 234, n. 1, p. 98-106, 2009.

SALERA-JR., G.; PORTELINHA, T.C.G.; MALVASIO, A. Predation on adult females of *Podocnemis expansa* Schweigger (Testudines, Podocnemididae) by *Panthera onca* Linnaeus (Carnivora, Felidae), in Tocantins State. **Biota Neotropica**, v. 9, n 3, p. 387-391, 2009.

SANTOS, A.L.; ALVARENGA, G.J.R.; MORAES, F. M.; AVILA JUNIOR, R.H.; CARVALHO, S.F.M.; MAGALHÃES, L.M.; ANDRADE, M.B.; MARQUES, F.K. & DENADAI, J. Morfologia Externa, Topografia do Coração e Comportamento da Artéria Coronária de *Podocnemis expansa*. **Revista Biosciência**. Uberlândia, v. 19, p.103-108, 2003.

SHEIL, C. A.; GREENBAUM, E. Reconsideration of skeletal development of *Chelydra serpentina* (Reptilia: Testudinata: Chelydridae): evidence for intraspecific variation. **Journal of Zoology**, London, v. 265, p. 235–267, 2005.

SILVA, J.C.; SASSON, S. **Biologia**. 3^a Ed. São Paulo: Saraiva, 640 p.2003.

SLAGER, R. E.; SIMPSON, S. L.; LEVAN, T. D.; POOLE, J. A.; SANDLER, D. P.; HOPPIN, J. A. Rhinitis associated with pesticide use among private pesticide applicators in the agricultural health study. **Journal of toxicology and environmental health. Part A**, Washington, v. 73, n. 20, p 1382-1393, 2010.

SMITH, E. A.; OEHME, F. W. The biological activity of glyphosate to plants and animals: a literature review. **Veterinary Human Toxicology**, Manhattan, v. 34, n. 6, p. 531-543, 1992.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA. **Lista brasileira de répteis**. Herpetologia Brasileira - Volume 3 - Número 3 - 2014. Disponível em: < <http://www.sbherpetologia.org.br/images/LISTAS/2014.03-07-MudancasTaxonomicas.pdf>> . Acesso em: 16 dez 2014.

SOUZA, R. R. **Efeitos da atrazina na composição química e morfologia de cascas de ovos de *Podocnemis Expansa* (Testudines, Podocnemididae) incubados artificialmente**. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. 52 f. 2013.

TAGARIELLO, A.; SCHLAUBITZ, S.; HANKELN, T.; MOHRMANN, G.; STELZER, C.; SCHWEIZER, A.; HERMANNS, P.; LEE, B. SCHMIDT, E. R.; WINTERPACHT, A.; ZABEL, B. Expression profiling of human fetal growth plate cartilage by EST sequencing. **Matrix Biology**, Stuttgart, v. 24, p. 530 – 538, 2005.

TAVELLA, L. B.; SILVA, I. N.; FONTES, L. O.; DIAS, J. R. M.; SILVA, M. I. L. O uso de agrotóxicos na agricultura e suas consequências toxicológicas e ambientais . **Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v. 7, n 2, p. 6-12, 2011.

TOMITA, R.Y.; BEYRUTH, Z. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. **Biológico**. São Paulo, v. 64, n. 2, p. 135-142, 2002

TONI, L. R. M.; SANTANA, H.; ZAIA, D. A. M. Adsorção de glyphosate sobre solos e minerais. **Química Nova**, São Paulo, v.29, n.4, p.829-833, 2006.

VANZOLINI, P.E. Notes on the nesting behavior of *Podocnemis expansa* in the Amazon Valley (Testudines, Pelomedusidae). **Papéis avulsos de zoologia**, São Paulo, v. 20, n.17, p.191-215, 1967.

VIEIRA, L. G. **Ontogenia dos ossos do esqueleto da tartaruga-da-amazônia *Podocnemis expansa* Schweigger, 1812 (Testudines, Podocnemididae)**. 2008. 152 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008.

VOGT, R.C. **Tartarugas da Amazônia**. Lima, Peru: Gráfica Biblos.104p. 2008.

WAUCHOPE, R. D.; BUTLER, T. M.; HORNSBY, A.G.; AUGUSTIJN-BECKERS, P.W.M.; BURT, J.P. The SCS/ARS/CES pesticide properties database: select values for environmental decision making. **Reviews of environmental contamination and toxicology**, New York, v.123, n.1, p.1-164, 1992.

WHITE, D. G.; HERSEY, H. P.; MOSS, J. J.; DANIELS, H.; TUAN, R. S.; BENNETT, V. D. Functional analysis of fibronectin isoforms in chondrogenesis: Fulllength recombinant mesenchymal fibronectin reduces spreading and promotes condensation and chondrogenesis of limb mesenchymal cells. **Differentiation**, London, v. 71, p. 251–261, 2003.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Glyphosate. Geneva. **Environmental Health Criteria**, London, v. 159, p. 1-177, 1994.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Public health impact of pesticides used in agriculture. Genebra: World Health Organization, 1990. WRI -World Resources Institute.

WIESNER, C. S.; IBEN, C. Influence of environmental humidity and dietary protein on pyramidal growth of carapaces in African spurred tortoises (*Geochelone sulcata*). **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 87, p. 66–74, 2003.

WOLF, D. C.; MARTIN, J. P. Microbial decomposition of ring 14C- atrazine, cyanutric acid and 2-chloro-4,6-diamino-s-triazina. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 4, p. 134-135, 1975.

2 CAPÍTULO 2 - EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À ATRAZINA NO PRIMEIRO DIA DE INCUBAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO ÓSSEO DE *Podocnemis expansa* (TESTUDINES, PODOCNEMIDIDAE)

Juliana dos Santos Mendonça^{1*}, Lucélia Gonçalves Vieira¹, Sady Alexis Chavauty Valdes¹, Franz Zirena Vilca², Valdemar Luiz Tornisielo², André Luiz Quagliatto Santos¹

¹Laboratório de Ensino e Pesquisa em Animais Silvestres (LAPAS), Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, MG, Brasil.

²Laboratório de Ecotoxicologia, Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (CENA/USP), Piracicaba, SP, Brasil.

*Autor para correspondência: ju_smendonca@yahoo.com.br. Rua Piaui, S/N, Campos Umuarama. CEP 38400-902, Av. Jardim Umuarama, Uberlândia, MG - Brasil. Tel: (34)3218-2696.

RESUMO: O uso de agrotóxicos é uma prática bastante difundida na agricultura brasileira. A dispersão destas substâncias é um fator importante na contaminação da fauna e da flora. A atrazina, um interferente endócrino da classe dos xenoestrogênios, é utilizada mundialmente na agricultura e tem seu uso permitido em diversas culturas no Brasil. A *Podocnemis expansa* é o maior réptil de água doce representante da ordem Testudines da América do Sul. Sua distribuição permite o contato com moléculas comumente utilizadas como agrotóxicos, capazes de produzir prejuízos às populações não-alvo. Para avaliar os possíveis efeitos da exposição à atrazina na ontogenia óssea desta espécie, ovos foram incubados artificialmente em areia umedecida com água contaminada com atrazina na concentração de 0, 2, 20 ou 200 µg/L. Os embriões foram coletados ao longo da incubação e submetidos à diafanização dos tecidos moles por hidróxido de potássio (KOH) e coloração dos ossos pela Alizarina red S e das cartilagens pelo Alcian blue. Os embriões foram avaliados quanto à presença de anormalidades durante os diferentes estágios de desenvolvimento pré-natal de seus elementos esqueléticos. Não foi constatada interferência da atrazina no desenvolvimento ósseo durante a

fase embrionária de indivíduos da espécie *P. expansa* nestas condições de exposição.

Palavras-chave: agrotóxicos, contaminação, Ecotoxicologia, esqueleto, répteis, tartaruga-da-Amazônia.

2.1 INTRODUÇÃO

Com o intenso crescimento da atividade agrícola a partir da década de 60, a utilização de agrotóxicos tornou-se uma prática comum na cadeia produtiva (Valdes 2010), com o objetivo de reduzir perdas e aumentar a produtividade (Van der Oost et al., 2003). Desde então, inúmeros casos de contaminação de fauna por agrotóxicos vem sendo relatados (Cope, 1966; Tanabe e Tatsukawa, 1994; Schiesari et al., 2006).

A aplicação dos agrotóxicos diretamente nos campos de cultivo não restringe sua distribuição apenas à área cultivada. Parcelas destas substâncias se dispersam pelo ambiente e são capazes de contaminar o solo, ar, água e a vegetação (Larson et al. 1997). A partir destes substratos, animais também são passíveis de contaminação sofrendo direta ou indiretamente os efeitos dos defensivos agrícolas (Fava et al. 1993; Giesy et al., 2000; Graymore et al., 2001; Johnston 2001). Recentemente, resíduos de vários agrotóxicos têm sido detectados na América do Sul, em geral no entorno ou no interior de áreas agrícolas (Van der Oost et al., 2003), como em rios e solos brasileiros (Bortoluzzi et al., 2007).

Os herbicidas constituem a classe utilizada em maior volume na agricultura (IBAMA 2010). São suscetíveis a causar efeitos indesejáveis, sobretudo em ambientes aquáticos, devido à tendência em apresentar maior solubilidade em água (Hartley et al. 2001; Valdes 2010). No entanto, o maior problema no emprego destes produtos está relacionado à questão ambiental, visto que grande parte deles apresenta alto potencial de lixiviação, persistência no solo, adsorção moderada à matéria orgânica presente no solo e potencial de fixação aos solos e sedimentos, podendo ainda alcançar lençóis freáticos (Amarante Junior et al. 2002; Moura et al., 2008).

A atrazina é o herbicida mais utilizado e tem sido encontrada em altas concentrações tanto em águas superficiais como subterrâneas (Kreutz et al. 2010).

Sua solubilidade é moderada, com meia-vida de 20 a 100 dias (Mandelbaum et al., 1993). É utilizada no Brasil para o controle de gramíneas e folhas em diferentes culturas, como sorgo, abacaxi, cana de açúcar, pinus e milho (ANVISA, 2003). Pode ainda, interferir no funcionamento do sistema endócrino de diversas espécies de animais (Ghiselli e Jardim, 2007).

O esqueleto configura-se como importante biomarcador na investigação dos efeitos de substâncias lançadas no ambiente e também para estudo do potencial de novas moléculas em produzir alterações no desenvolvimento dos organismos (Bell et al. 2006). A literatura científica relata o aparecimento de alterações nas respostas fisiológicas em animais expostos a atrazina, desde elevações no metabolismo total até o comprometimento nas taxas de crescimento e diminuição na alimentação (Miron, 2009). Ezemonye e Tongo (2009) demonstraram que a atrazina pode acarretar desde efeitos fisiológicos e bioquímicos, até mortalidade em girinos expostos a concentrações mais elevadas. Neuman-Lee e Janzen (2011) relataram o aparecimento de alterações funcionais induzidas pela exposição à atrazina em Testudines. No entanto, são poucos os estudos que relatam os efeitos tóxicos da atrazina em répteis sul-americanos, especialmente em Testudines.

A espécie *Podocnemis expansa* (tartaruga-da-Amazônia) pertence à ordem Testudines e ocorre desde Guianas, Venezuela, Colômbia até o norte e centro-oeste do Brasil. Habita bacias de grandes rios, como Amazonas, Araguaia e Tocantins (Bataus 1998; Valenzuela 2001). É um animal de hábitos diurnos e vive em grupos. Sua postura ocorre de setembro a outubro e desovam em média de 100 ovos (Alves-júnior et al., 2012), com eclosão entre 54 a 68 dias (Ferreira Júnior e Castro, 2003).

Salera-Júnior et al. (2009) descreveram as relações de uso e consumo da tartaruga-da-Amazônia nas comunidades da bacia do rio Araguaia onde a espécie é fonte de alimentação através da carne e dos ovos, com destaque para o consumo do sangue pela população indígena. A gordura é empregada para fins terapêuticos e medicinais e o casco dos animais é usado na fabricação de adornos. Estes animais, portanto, podem ser uma fonte de contaminação indireta ao homem.

O estudo dos efeitos de xenobióticos nesta espécie pode servir como modelo para a compreensão dos efeitos em outras espécies de Testudines. Assim, o propósito com o presente estudo foi avaliar os efeitos teratogênicos da atrazina no

desenvolvimento ósseo de embriões de *P. expansa* expostos a diferentes concentrações durante o período de incubação artificial.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Coleta de ovos

Foram coletados, em outubro de 2012, 240 ovos de *P. expansa*, em área de Proteção Ambiental Meandros Rio Araguaia, Brasil ($13^{\circ} 20' 38''$ S e $50^{\circ} 38' 05''$ W) com licença SISBIO/ICMBio 36957-1/2012. Todos os procedimentos foram submetidos à Comissão de Ética na Utilização Animal da Universidade Federal de Uberlândia e obtiveram parecer favorável sob o registro CEUA/UFU 055/12.

Os ovos foram removidos dos ninhos e acondicionados em sacos plásticos com vermiculita umedecida com água na proporção de 2:1 v/v e transportados ao Laboratório de Ensino e Pesquisa em Animais Silvestres da Universidade Federal de Uberlândia (LAPAS/UFU) para incubação artificial.

2.2.2 Incubação artificial e exposição aos agrotóxicos

Os ovos foram incubados artificialmente em quatro bandejas colocadas em incubadoras de acordo com método de Verdade et al. (1992). Ao longo da incubação, a temperatura foi mantida entre 28 e 31°C com auxílio do termostato e a umidade relativa do ar foi verificada diariamente através de termohigrômetro digital, variando entre 80 e 100%.

O substrato utilizado para a incubação dos ovos foi areia trazida do local de coleta. Este substrato foi contaminado com o produto técnico atrazina em concentrações determinadas tomando como base o limite máximo de 2 μ g/L aceito para contaminação por atrazina em águas de superfície brasileiras estabelecido pelas resoluções do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) nº 357/2005 e nº 20/1986. No primeiro dia de incubação artificial adicionou-se ao substrato água destilada contaminada com o herbicida nas concentrações de 0, 2, 20 e 200 partes por bilhão (ppb). Em cada tratamento foram incubados 60 ovos de *P. expansa*.

2.2.3 Manipulação dos embriões

O dia de acomodação dos ovos nas caixas de incubação foi considerado dia 0. A partir deste, foram realizadas coletas de dois ovos de cada incubadora a cada três dias até a eclosão, totalizou-se uma média de 40 ovos coletados por tratamento. Posteriormente à coleta dos ovos, foi realizada eutanásia dos embriões de forma humanitária, conforme determinações legais, e seguindo orientações técnicas específicas. Desta forma, a casca dos ovos foi cortada com tesoura cirúrgica, os embriões foram removidos e, imediatamente, foi administrado pentobarbital sódico (Close et al. 1997), em dose superior a 60mg/Kg, por via intracelomática (Reilly et al. 2001), garantindo a sobredose do anestésico para obtenção de rápida inconsciência do animal seguida de morte por parada respiratória. Após a eutanásia, os embriões foram preservados em formaldeído 3,7% para posterior diafanização.

Para análise de cromatografia utilizou-se como material o conteúdo líquido do ovo e a areia utilizada na incubação, ambos coletados em intervalos de 5 dias. As cascas dos ovos foram cortadas com tesoura cirúrgica e o conteúdo líquido, composto por membranas e vitelo, foi separado do embrião e armazenado em pequenos recipientes de plásticos individualmente. Uma pequena amostra da própria areia utilizada na incubação dos ovos de cada tratamento foi removida das incubadoras e acondicionada em recipientes com tampas. Esses materiais após coletados seguiram imediatamente para congelamento em temperatura próxima de -10°C. Posteriormente, as amostras foram transportadas com gelo até o Laboratório de Ecotoxicologia no Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo (USP), situada em Piracicaba, SP.

2.2.4 Diafanização de tecidos moles e coloração de cartilagens e ossos

Os embriões foram submetidos às técnicas de diafanização de tecidos moles por hidróxido de potássio (KOH) e coloração dos ossos pela Alizarina red S e das cartilagens por Alcian blue, segundo os métodos de Davis e Gore (1936) e Dingerkus e Uhler (1977) modificados.

2.2.5 Registro e análise dos dados

Os espécimes foram analisados com auxílio de uma lupa estereomicroscópica (Leica, DM 1000). As características morfológicas da cartilagem e dos ossos dos

embriões expostos à atrazina foram comparadas com resultados obtidos por Vieira (2008) ao descrever a ontogenia dos ossos do esqueleto de embriões de *P. expansa*.

2.2.6 Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas

Para o processo de extração da atrazina no sedimento areia, foi utilizado o método QuEChERS (Anastassiades et al., 2003; Braganca et al., 2012) sem clean-up (Carneiro et al., 2013). O extrato obtido foi analisado por cromatografia LC-MS/MS. Com relação a extração do herbicida do conteúdo do ovo, o método QuEChERS (Anastassiades et al., 2003) foi adaptado de acordo com Carneiro et al. (2013) e o extrato foi submetido ao mesmo procedimento analítico.

Foi utilizado para análise das amostras o sistema cromatográfico de fase líquida acoplado à espectrometria de massas. Para o mesmo, contou-se com uma coluna cromatográfica (Zorbax Eclipse Plus C18 3,0 x 100mm 3,5 micron), duas fases móveis (30 % água, 0,1 % ácido fórmico, 70 % acetonitrila e 0,1 % ácido fórmico), fluxo de 0,6 ml/min, temperatura da coluna de 30°C e volume de injeção de 20 μ L. O espectrômetro de massas foi operado a uma temperatura de 300°C e o sistema de ionização utilizado foi ESI no modo positivo com 4000V.

Brancos de matriz foram utilizados para o processo de validação do método de análises cromatográficas. Como parâmetros, foram consideradas: linearidade, limite de quantificação (LQs), recuperação, repetitividade e incerteza do método (Sanco, 2014; INMETRO, 2011). Todos os valores encontrados situam-se dentro dos aceitáveis pelas normas acima mencionadas, o que demonstra o desempenho do método analítico empregado.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram coletados 40 embriões de cada tratamento para avaliação dos efeitos da atrazina na ontogenia óssea. Após o processo de diafanização e coloração dos ossos e cartilagens, estes foram avaliados quanto às características correspondentes ao estágio esperado de desenvolvimento ósseo de acordo com estudo de Vieira (2008). Não foram observadas anomalias na ontogenia óssea dos

embriões de *P. expansa* desde a fase de formação dos moldes de cartilagem até a consolidação do tecido ósseo em nenhum grupo experimental (Figuras 1 e 2).

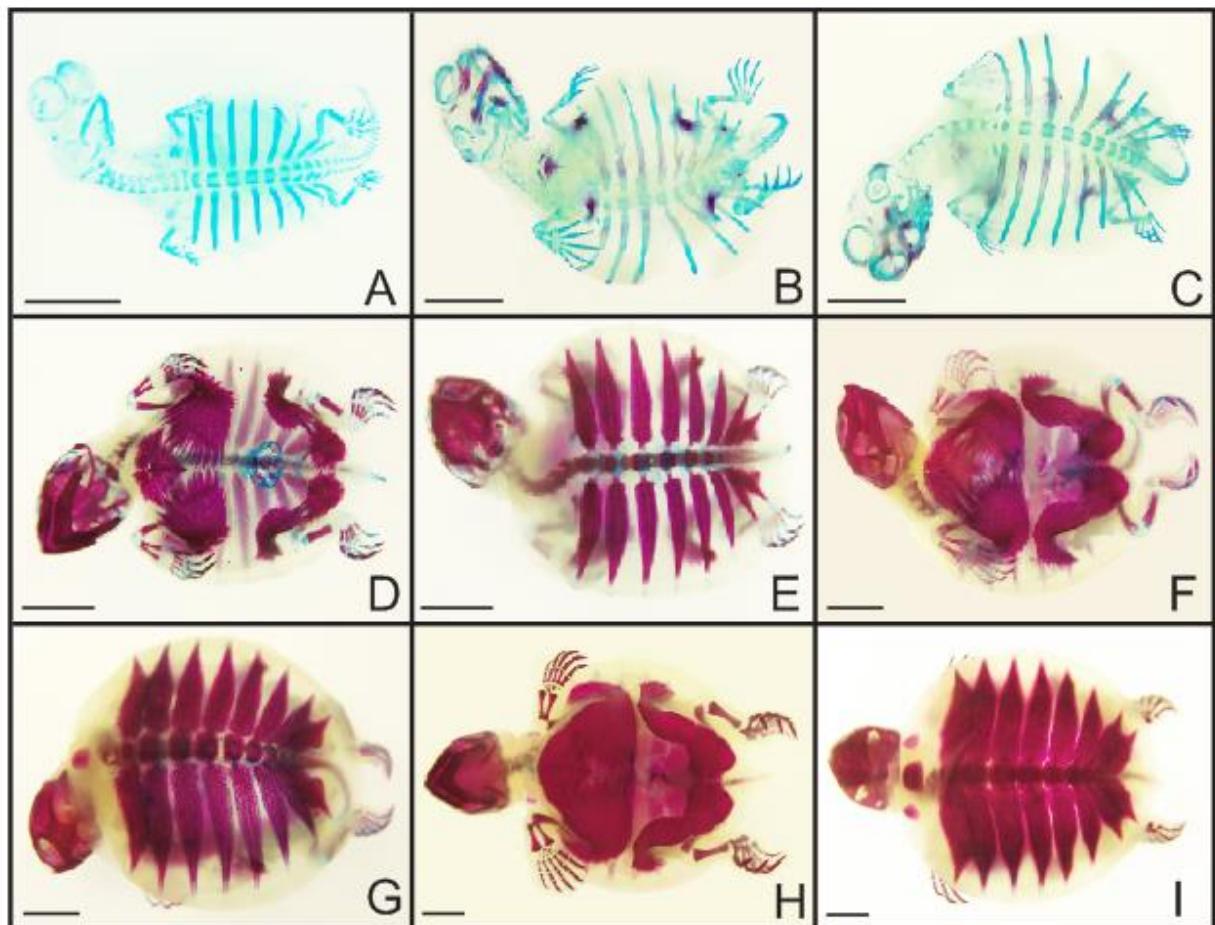


Figura 2-1: Embriões de *Podocnemis expansa* incubados artificialmente em areia contaminada com diferentes concentrações de atrazina diafanizados por KOH e corados com azul de alcian (cartilagens) e vermelho de alizarina (ossos). (A) 20 μ g/L, estágio 15, vista dorsal; (B) 2 μ g/L, início do estágio 16, vista ventral; (C) 2 μ g/L, início do estágio 16, vista dorsal; (D) 200 μ g/L, estágio 20, vista ventral; (E) 200 μ g/L, estágio 20, vista dorsal; (F) 2 μ g/L, estágio 22, vista ventral; (G) 2 μ g/L, estágio 22, vista dorsal; (H) 200 μ g/L, final do estágio 23, vista ventral; (I) 200 μ g/L, final do estágio 23, vista dorsal. Escala 5mm.

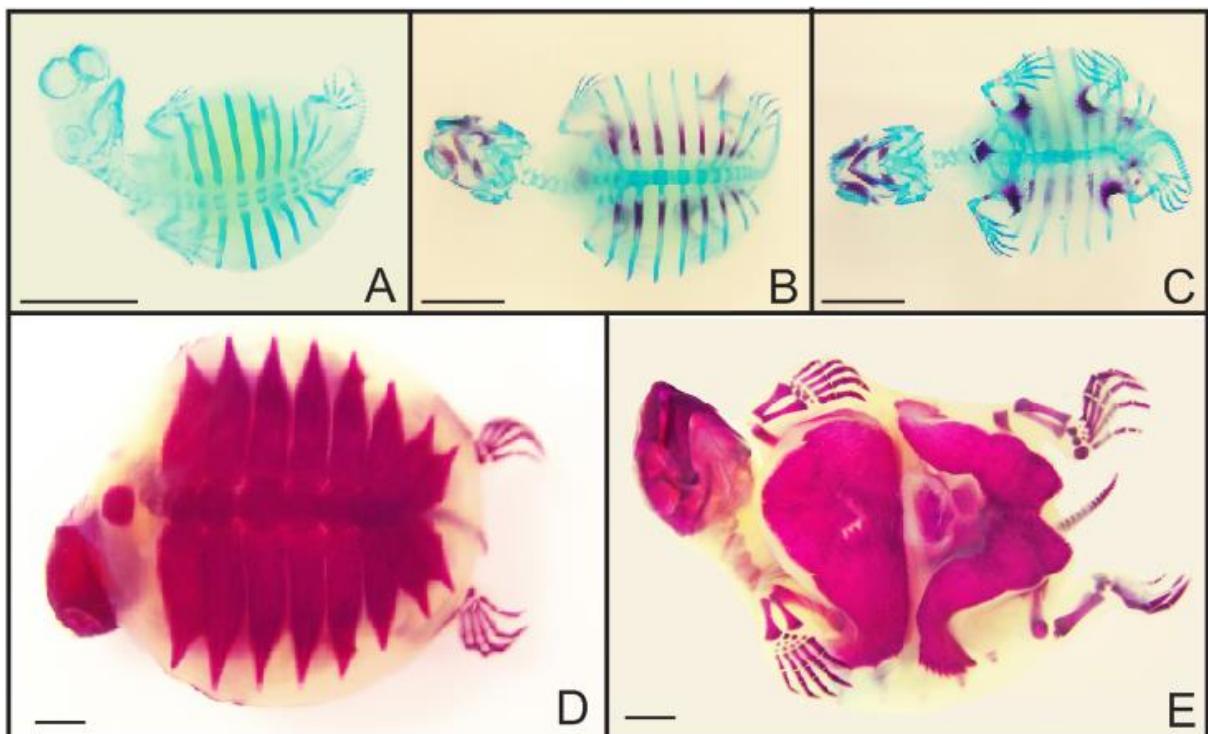


Figura 2-2: Embriões de *Podocnemis expansa* incubados artificialmente em areia não contaminada diafanizados por KOH e corados com azul de alcian (cartilagens) e vermelho de alizarina (ossos). (A) estágio 15, vista dorsal; (B) estágio 16, vista dorsal; (C) estágio 16, vista ventral; (D) estágio 23, vista dorsal; (E) estágio 23, vista ventral. Escala 5mm.

Os resultados do presente estudo são semelhantes aos encontrados por Neuman-Lee e Janzen (2011). Estes autores relataram ausência de interferência na ontogenia óssea de embriões de duas espécies de cágados do gênero *Graptemys* expostos ao herbicida atrazina uma única vez no início da incubação. No entanto, os autores chamam atenção para o fato de que a exposição em período diferente ou mais prolongado poderia ter gerado, possivelmente, maior toxicidade para esses vertebrados. Nesse caso, bem como ocorreu no presente estudo, a exposição pontual ao herbicida apenas no início da incubação não foi suficiente para acarretar anomalias ósseas nos embriões. No entanto, de acordo com os mesmos autores, os recém-eclodidos apresentaram menor aptidão física e dificuldade de locomoção. Em outros estudos, também realizados durante a incubação de ovos de *Chelydra serpentina* (De Solla et al. 2006), *Alligator mississippiensis* (Gross, 2001a) e *Pseudemys elegans* (Gross, 2001b) onde também houve contaminação dos ovos com concentrações de atrazina que variaram entre 100 e 500 mg/L, não foram observadas nenhuma alteração morfológica dos indivíduos neonatos.

A falta de alterações macroscópicas na formação do esqueleto de *P. expansa* após exposição ao produto técnico atrazina no primeiro dia de incubação contrasta com observações relatadas em literatura científica, após exposição de outras espécies a este agrotóxico. Walters et al. (2014) injetaram três diferentes concentrações do herbicida atrazina (1000, 100 e 10 μ g/Kg) diluídos em álcool etílico em serpentes da espécie *Thamnophis m. marcianus*. Após atingirem a maturidade sexual e se acasalarem com parceiros advindos do mesmo tratamento, os neonatos foram avaliados quanto a alterações morfológicas. Constataram-se assim modificações na escamação dos filhotes, em especial na contagem de escamas cranianas que ocorreu durante o desenvolvimento embrionário. No entanto, vale ressaltar que essa contaminação ocorreu da mãe para o feto, e não diretamente no próprio embrião, como foi o caso de *P. expansa*.

Apesar de ausência de interferência no presente estudo, diversos trabalhos realizados com peixes, anfíbios, répteis e mamíferos sugerem que a atrazina pode afetar ainda as respostas imunes e alterar o sistema endócrino e respostas neuroendócrinas (ATSDR, 2003). Exposição de anfíbios a atrazina causou uma maior incidências de sapos hermafroditas (Hayes et al., 2002) e alterações no desenvolvimento de gônadas (Tavera-Mendonza et al., 2002). Em peixes, esse herbicida resultou em alterações no comportamento natatório (Steinberg, Lorenz e Lorenz, 1995), distúrbios reprodutivos (Thibaut e Porte, 2004) e alterações fisiológicas e morfológicas de embriões (Wiegand et al., 2008).

Relatos da ocorrência de más formações de outras espécies expostas à contaminantes que não seja a atrazina, corroboram a hipótese de que o tecido ósseo pode ser afetado pelo contato dos organismos a determinados pesticidas. Em codornas, a exposição a parationa metílica através de injeção *in ovo* resultou na ausência de dobradura notocordal no embrião jovem, acarretando encurtamento e contorção da coluna vertebral e defeitos na formação do esterno, costela e tíbia (Meneely e Wyttenbach, 1989). Nesse experimento os ovos foram expostos ao inseticida 48 e 72 horas após o início da incubação. Também foi relatada destruição óssea em frangos de corte provocada pela exposição a monocrotofós, inseticida organofosforado (Garg et al., 2004). Alvarez et al. (1994), em estudo com girinos de rãs expostos a duas concentrações diferentes (0,25 e 1 mg/L) de produto formulado a base de parationa metílica por 14 semanas, verificaram alterações da matriz óssea em coluna vertebral e membros dos animais.

Lind e colaboradores (2004) verificaram composição anormal de ossos de fêmeas juvenis de jacarés americanos (*Alligator mississippiensis*) que viviam em um lago na Flórida (EUA) poluído no passado com pesticidas como o DDT. Por tomografia computadorizada quantitativa periférica, esses autores observaram alterações na composição dos ossos longos dos animais expostos, possivelmente devido ao fato dos contaminantes presentes no lago inibirem a reabsorção óssea natural, resultando em maior aumento da massa óssea dos mesmos.

No presente trabalho foi utilizado como contaminante moléculas de atrazina livres de quaisquer outros compostos. Sabe-se que os agrotóxicos comercializados são constituídos pelo princípio ativo, por compostos inertes e por substâncias que auxiliam na sua dispersão e absorção, os surfactantes. Em estudos de exposição ao produto técnico formulado (CAS1912-24-9,SigmaAldrich,USA) em peixe de água doce (*Rhamdia quelen*) verificou-se que após 96 horas de exposição em três diferentes concentrações (2, 10 e 100 µg/L) os indivíduos apresentaram vacuolização dos hepatócitos com áreas necrosadas em todas as concentrações testadas (Mela et al., 2013). De acordo com os resultados destes autores, verificou-se que a menor concentração permitida pela Agência de Proteção Ambiental foi suficiente para provocar alterações histopatológicas, bioquímicas e fisiológicas nessa espécie.

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, revelou resíduos de atrazina na areia utilizada na incubação de ovos de *P. expansa*, mas não detectou resíduos no conteúdo líquido destes ovos. Por meio de análise da constituição da casca destes ovos, verificou-se ainda que este herbicida, incorporado ao substrato no primeiro dia de incubação artificial, interferiu no teor de fósforo, extrato etéreo e espessura das suas cascas durante a incubação dos ovos (Souza, 2013). Desse modo, é possível inferir que estas moléculas não atravessaram a casca do ovo e o embrião pode não ter recebido a contaminação. Sabe-se que a casca do ovo de Testudines exerce papel fundamental para o embrião, visto que constitui uma fonte de minerais para o embrião durante o desenvolvimento, controla a troca de gases através dos poros e oferece proteção contra a invasão de microorganismos (Kitimasak et al., 2003; Kusuda et al., 2013).

Por meio dos resultados, é possível sugerir que a casca dos ovos de *Podocnemis expansa* serviu como uma barreira de proteção do embrião contra possíveis efeitos teratogênicos causados pelos agrotóxicos. Sabe-se que ovos com

casca rígida são afetados pela umidade do ambiente, no entanto, os mesmos possuem reserva de água fornecida em grande parte, se não exclusivamente, pela progenitora que é variável e praticamente independente do ambiente em que o ovo se encontra (Packard et al. 1981). Essas reservas de água são tão bem isoladas do ambiente pela casca que a variação temporal e espacial do ninho pode ter pouca influência sobre a disponibilidade de água para o embrião, exceto em condições extremas (Lesem e Dmi'el, 1986).

A contaminação dos substratos por agrotóxicos no presente estudo ocorreu apenas uma vez, no início da incubação. Na natureza, no caso de ovos incubados próximos a rios contaminados, uma situação de exposição a agrotóxicos pode ocorrer pontualmente ou durante todo o período de incubação. Desse modo, a contaminação pontual no início deste experimento pode ter sido um motivo da ausência de anomalias nos embriões.

2.4 CONCLUSÃO

A exposição ao produto técnico atrazina, em concentrações até 100 vezes superiores às permitidas pela legislação vigente, não resultam em interferência na ontogenia óssea de embriões de *P. expansa*, quando os produtos são incorporados ao substrato apenas no primeiro dia de incubação artificial dos ovos.

2.5 AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao RAN/ICMBio e ao CEUA/UFU por permitir à realização da pesquisa. Ao pesquisador Paulo Roberto de Jesus Filho pela ajuda na coleta dos ovos. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro e o incentivo ao estudo e à pesquisa.

REFERÊNCIAS

- Alvarez R, Honrubia MP, Herráez MP (1995) Skeletal Malformations Induced by the Insecticides ZZ-APhox® and Folidol® During Larval Development of *Rana perezi*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology v. 28, p. 349-356.

Alves-Júnior JRF, Lustosa APG, Bosso ACS, Balestra RAM, Bastos LF, Miranda LB, Santos ALQ (2012) Reproductive indices in natural nests of giant Amazon river turtles *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) (Testudines, Podocnemididae) in the Environmental Protection Area Meanders of the Araguaia river. *Braz. J. Biol.*, v.72, n. 1, p. 199-203.

Amarante Junior OP, Santos TCR, Brito, NM, Ribeiro ML (2002) Glifosato: propriedades, toxicidade usos e legislação. *Química Nova* (online), v. 25, n. 4, p. 589-559.

Anastassiades M, Lehotay SJ, Stajnbaher D, Schenck FJ (2003) Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of Aoac International*, v. 86, p. 412-431.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta Pública nº 50, de 09 de junho de 2003. D.O.U de 11/06/2003. Disponível em:< [http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP\[4882-2-0\].PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP[4882-2-0].PDF)>. Acesso em 22 set. 2014.

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry (2003) Toxicological Profile for Atrazine. U. S. Centers for Disease Control.

Bataus YSL (1998) Estimativa de parâmetros populacionais de *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) no rio Crixás-açu (GO) a partir de dados biométricos. 1998. 58f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 1998.

Bell B, Spotila JR, Congdon J (2006) High incidence of deformity in aquatic turtles in the John Heinz National Wildlife Refuge. Environmental pollution, Barking, v. 142, p. 457-465.

Bortoluzzi EC, Rheinheimer DS, Gonçalves CS, Pellegrini JPR, Maroneze AM, Kurz MHS (2007) Investigation of the occurrence of pesticide residues in rural wells and surface water following application to tobacco. Quim Nova, v. 30, 1872e6.

Braganca I, Placido A, Paiga P, Domingues VF, Delerue-Matos C (2012) QuEChERS: A new sample preparation approach for the determination of ibuprofen and its metabolites in soils. Science of the Total Environment, v. 433, p. 281-289.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional de Meio Ambiente, CONAMA. Resolução CONAMA nº 20, de 18 de Junho de 1986. – In: Resoluções 1986. <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiano1.cfm?codlegitipo=3&ano=1986>. Acessado em: outubro de 2014.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional de Meio Ambiente, CONAMA. Resolução CONAMA nº 357, de 17 de Março de 2005. – In: Resoluções 2005. <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiano1.cfm?codlegitipo=3&ano=2005>. Acessado em outubro 2014.

Carneiro RP, Oliveira FAS, Madureira FD, Silva G, Souza WR, Lopes RP (2013) Development and method validation for determination of 128 pesticides in bananas by modified QuEChERS and UHPLC-MS/MS analysis. Food Control, v. 33, p. 413-423.

Chambers JE, Carr RL (1995) Biochemical mechanisms contributing to species differences in insecticidal toxicity. Toxicology. Amsterdam, v. 105, p. 291-304.

Close B; Banister K, Baumans V, Bernoth E, Bromage N, Bunyan J, Erhardt W, Flecknell P, Gregory N, Hackbarth H, Morton D, Warwick C (1997) Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2. Laboratory Animals, v. 31, p. 1-32.

Cope, OB (1966) Contamination of the Freshwater Ecosystem by Pesticides. Journal of Applied Ecology. v.3, p.33-44.

Crain DA, Guillette JR LJ, Pickford DB, Percival HF, Woodward AR (1998) Sex-steroid and thyroid hormone concentrations in juvenile alligators (*Alligator mississippiensis*) from contaminated and reference lakes in Florida, USA. Environ.Tox. Chem. v. 17, p. 446-452.

Davis DD, Gore UR (1936) Clearing and staining skeleton of small vertebrates. Field Museum of Natural History. v. 4, p. 3 - 15.

De Solla SR, Bishop CA, Pettit KE, Elliott JE (2002) Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls (PCBs) in eggs of red-legged frogs (*Rana aurora*) and northwestern salamanders (*Ambystoma gracile*) in an agricultural landscape. Chemosphere. v. 46, n. 7, p. 1027-1032.

De Solla SR, Martin PA, Fernie KJ, Park BJ, Mayne G. (2006). Effects of environmentally relevant concentrations of atrazine on gonadal development of snapping turtles (*Chelydra serpentina*). EnvironToxicol Chem, 25, 520–26.

Dingerkus G, Uhler L (1977) Differential staining of bone and cartilage in cleared and stained fish using alcian blue to stain cartilage and enzymes for clearing fish. Stain Technology, Baltimore, v. 52, p. 229-232.

Fava J, Gagne JA, Kendall RJ, Lacher JR TE, O'Connor RJ, Orenstein S, Parrish R, Williams BA (1993) Research and development needs. In: Wildlife toxicology and population modeling – integrated studies of agroecosystems. Boca Raton: CRC Press, Inc., 1993, p.557-567.

Ferreira Júnior PD, Castro PTA (2003) Geological control of *Podocnemis expansa* and *Podocnemis unifilis* nesting areas in Rio Javaés, Bananal Island, Brazil. Acta Amaz. v. 33, p. 445-468.

Gamero FU, Arena MV N, Salla RF, Costa MJ (2013) Impacto de diferentes concentrações de glifosato e da formulação comercial Roundup® sobre a força de contração in vitro de girinos de rã-touro. In: IV Congresso Brasileiro De Herpetologia, 2013, Salvador. Anais... Salvador, 2013.

Garg UK, Pal AK, Jha GJ, Jadhao SB (2004) Pathophysiological effects of chronic toxicity with synthetic pyrethroid, organophosphate and chlorinated pesticides on bone health of broiler chicks. *Toxicologic Pathology*. v. 32, p. 364-369.

Ghiselli G, Jardo WF (2007) Interferentes endócrinos no ambiente. *Química Nova*, v. 30, n. 3, p. 695-706.

Giesy JP, Dobson S, Solomon KR. Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide. *Rev Environ Contam Toxicol* (2000) 167:35e120.

Graymore M, Stagnitti F, Allinson G. Impacts of atrazine on aquatic ecosystem (2001) 26:483e495.

Gross TS. (2001a). Determination of Potential Effects of 10 Day Neonatal Exposure of Atrazine on Histological and Hormonal Sex Determination in Incubated American Alligator (*Alligator mississippiensis*) Eggs. Gainesville, FL, USA: University of Florida, Wildlife Reproductive Toxicology Laboratory. No. Number Wildlife-NOVA98.02a. 66 p.

Gross TS. (2001b). Determination of Potential Effects of 10 day Neonatal Exposure of Atrazine on Histological and Hormonal Sex Determination in Incubated Red-eared Slider (*Pseudemys elegans*) Eggs. Gainesville, FL, USA: University of Florida, Wildlife Reproductive Toxicology Laboratory. No. Number Wildlife-NOVA98.02b. 66 p.

Hayes TB, Collins A, Lee M, Mendoza M, Noriega N, Stuart AA, Vonk A (2002) Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. PNAS, v. 99, n. 8, p. 5476-5480.

Hartley WR., White LE, Bollinger JE, Thiagarajah A, Mendler JM, George WJ (2001) History and risk assessment of triazine herbicides in the lower Mississippi River. In: Johnston JJ. Pesticides and Wildlife. Washington, DC: American Chemical Society, p. 225-239.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: uma abordagem ambiental. Brasília, 2010. 84 p.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (2011), Orientação sobre validação de métodos analíticos, Brasil, Coordenação Geral de Acreditação p. 19.

Johnston JJ (2001) Introduction to pesticides and wildlife. In: JOHNSTON, J. J. (Ed.) (Ed.). Pesticides and Wildlife. Washington, DC: American Chemical Society, p. 1-5.

Kitimasak W, Thirakupt K, Moll DL (2003) Eggshell structure of the Siamese narrow-headed softshell turtle *Chitra chitra* nutphand, 1986 (Testudines: Trionychidae). Science Asia. v. 29, p.95-98.

Kreutz LC, Barcellos LJC, Marteninghe A, Santos ED, Zanatta R (2010) Exposure to sublethal concentration on glyphosate or atrazine-based herbicides alters the phagocytic function and increases the susceptibility of silver catfish fingerlings (*Rhamdia quelen*) to *Aeromonas hydrophila* challenge. Fish Shellfish Immunol. v. 29, p. 694-697.

Larson S J, Capel PD, Majewski MS (1997) Pesticides in surface waters: distribution, trends, and governing factors. U. S. Environmental Protection Agency, EPA/600/9-88/005, Washington, 1997.

Leshem A, Dmi'el R (1986) Water loss from *Trionyx triunguis* eggs incubating in natural nests. *Herpetol. J.* v. 1, p. 115-117.

Lind PM, Milnes, MR, Lundberg R, Bermudez D, Örberg J, Guillette LJ Jr. (2004) Abnormal Bone Composition in Female Juvenile American Alligators from a Pesticide-Polluted Lake (Lake Apopka, Florida). *Environmental Health Perspectives*, v. 112, n.3. p. 359-362.

Mandelbaum RT, Allan DL, Wackett LP (1993) Isolation and Characterization of a *Pseudomonas* sp. That Mineralizes the s-Triazine Herbicide Atrazine. *Applied Environmental Microbiology*, Washington, v. 61, n. 4, p. 1451-1457.

Mela M., Guioski IC, Doria HB, Randi, MAF, Ribeiro CAO, Pereira L, Maraschi AC, Prodocimo V, Freire CA, Assis HCS (2013) Effects of the herbicide atrazine in neo tropical cat fish (*Rhamdia quelen*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 93, p. 13–21.

Meneely GA, Wyttenbach CR (1989) Effects of the organophosphate insecticides diazinon and parathion on bobwhite quail embryos: skeletal defects and acetylcholinesterase activity. *Journal of Experimental Zoology*. v. 252, n.1, p. 60-70.

Neuman-Lee LA, Janzen FJ (2011) Atrazine Exposure Impacts Behavior and Survivorship of Neonatal Turtles. *Herpetologica*, v. 67:1, p. 23-30.

Packard GC, Taigen TL, Packard MJ, Boardman TJ (1981) Changes in mass of eggs of softshell turtles (*Trionyx spiniferus*) incubated under hydric conditions simulating those of natural nests. *J. Zool.* v.193, p.81-90.

Reilly JS (2001) Reptiles. In: _____. Euthanasia of animals used for scientific purposes. Adelaide, Australian and New Zealand Council for the Care of Animals in Research and Teaching. p. 83-89.

Salera Junior G. et al., (2009) Avaliação da predação de *Podocnemis expansa* e *Podocnemis unifilis* (Testudines, Podocnemididae) no rio Javaés, Tocantins. Acta Amazonica. v. 39, n.1, p. 207 – 214.

SANCO (2014) Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. , European Union, European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General p. 42.

Schiesari L, Grillitsch B, Grillitsch, H (2006) Biogeographic Biases in Research and Their Consequences for Linking Amphibian Declines to Pollution. Pollution and Amphibian Declines, v.21, n.2, p.465-471.

Steinberg CEW, Lorenz R, Spieser OH (1995) Effects of atrazine on swimming behavior of zebrafish *Brachydanio rerio*. Water Research, 29: 981-985.

Souza, RR (2013) Efeitos da atrazina na composição química e morfologia de cascas de ovos de *Podocnemis expansa* (Testudines, Podocnemididae) incubados artificialmente. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. 52 f.

Tanabe S, Iwata H, Tatsukawa R (1994) Global contamination by persistent organochlorines and their ecotoxicological impact on marine mammals. The Science of the Total Environment. v. 154, p. 163-177.

Tavera-Mendoza L, Ruby S, Brousseau P, Fournier M, Cyr D (2002) Response of the amphibian tadpole *Xenopus laevis* to atrazine during sexual differentiation of the ovary. Environmental Toxicology Chemistry, v. 21, p. 1264-1267.

Thibau RT, Porte C (2004) Effects of endocrine disrupters on sex steroid synthesis and metabolism pathways in fish. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, v. 92, p. 485-494.

Valdes SAC (2010) Avaliação da exposição a agrotóxicos em aves silvestres de vida livre. In: Von Matter S, Straube FC, Accordi I, Piacentini V, Cândido-JR. JF (Eds.) Ornitologia e conservação: ciência aplicada, técnicas de pesquisa e levantamento. Rio de Janeiro: Technical Books Editora, 2010, p. 429-439.

Valenzuela N (2001) Maternal effects on life-history traits in the Amazonian giant river turtle *Podocnemis expansa*. Journal of Herpetology, Athens, v. 35, n. 3, p. 368-378.

Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPF (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environ Toxicol Pharmacol, 13:57e149.

Verdade LM, Michelotti F, Rangel MC, Cullen-Jr L, Ernandes MM, Lavorenti, A (1992) Manejo de ovos de jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) no CIZBAS/ESALQ/USP, in: Verdade LM, Lavorenti A (Eds.) In Anais do I workshop sobre conservação e manejo do jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*).ESALQ/USP, Piracicaba, pp 92-99.

Vieira LG (2008) Ontogenia dos ossos do esqueleto da tartaruga-da-amazônia *Podocnemis expansa* Schweigger, 1812 (Testudines, Podocnemididae). 2008. 152 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008.

Walters AD, Chamberlain K, Ford NB, Placyk-Jr JS (2014) Influence of atrazine on the scalation of Macy's checkered gartersnake, *Thamnophis m. marcianus* (Baird and Girard, 1853) Bull Environ Contam Toxicol, v. 92, n. 1, p. 1-5.

Wiegand C, Krause E, Steinberg C, Pflugmacher S (2001). Toxicokinetics of Atrazine in Embryos of the Zebrafish (*Danio rerio*). Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 49, p. 199-205.

CAPÍTULO 3 – EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À ATRAZINA E AO GLIFOSATO AO LONGO DA INCUBAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO ÓSSEO DE *Podocnemis expansa* (TESTUDINES, PODOCNEMIDAE)

Juliana dos Santos Mendonça^{1*}, Lucélia Gonçalves Vieira¹, Sady Alexis Chavauty Valdes¹, André Luiz Quagliatto Santos¹

¹Laboratório de Ensino e Pesquisa em Animais Silvestres (LAPAS), Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, MG, Brasil.

*Autor para correspondência: ju_smendonca@yahoo.com.br. Rua Piaui, S/N, Campos Umuarama. CEP 38400-902, Av. Jardim Umuarama, Uberlândia, MG - Brasil. Tel: (34)3218-2696.

RESUMO: O Brasil é considerado o maior consumidor de pesticidas do mundo e os herbicidas representam a classe mais utilizada no país. A atrazina e o glifosato, principais representantes destes pesticidas, são encontrados contaminando recursos hídricos de diversos rios brasileiros e estão relacionados a malformações de órgãos viscerais e esqueletos de diversas espécies animais. Dentre os possíveis organismos não alvos, os répteis representam a classe de animais que estão indiretamente afetados pela aplicação dos agrotóxicos, visto a utilização por estes de córregos e rios como habitat natural. Sendo assim, objetivou-se avaliar os possíveis efeitos da exposição aos herbicidas atrazina e glifosato na ontogenia óssea de *Podocnemis expansa*. Ovos foram incubados artificialmente em areia umedecida com água contaminada com atrazina na concentração de 2, 20 ou 200 µg/L e glifosato na concentração de 65, 650 e 6500 µg/L. No grupo controle o substrato foi umedecido com água destilada. Foram realizadas coletas de dois ovos de cada incubadora a cada dez dias até a eclosão. Para análise do desenvolvimento do esqueleto, os embriões foram submetidos às técnicas de diafanização de tecidos moles e coloração dos ossos pela Alizarina red S e das cartilagens por Alcian blue. Os espécimes foram analisados com auxílio de uma lupa estereomicroscópica. As características morfológicas da cartilagem e dos ossos dos embriões coletados foram comparadas com a descrição da ontogenia normal disponível em literatura de

embriões de *P. expansa*. Não foram observadas anomalias na ontogenia óssea dos embriões em nenhum grupo experimental.

Palavras-Chave: Ecotoxicologia, esqueleto, herbicidas, répteis, tartaruga-da-Amazônia

3.1 INTRODUÇÃO

O avanço tecnológico permitiu a evolução de vários setores relacionados à alimentação, saúde e agricultura. No entanto, essas melhorias estão intimamente ligadas com a utilização de compostos quimicamente sintetizados, que apesar de expor homem e meio ambiente, possuem ainda muitas propriedades desconhecidas (Oga, 2003). Atualmente, os contaminantes ambientais que geram os problemas mais graves oriundos da atividade humana são os agrotóxicos. Tendo em vista as características destes compostos e sua persistência na biosfera, esse tipo de poluição pode influenciar as comunidades naturais, acarretando impactos e prejuízos em níveis teciduais e moleculares entre os indivíduos (Berti et al., 2009; Bueno-Guimarães et al., 2001).

Em todo o mundo, o uso de herbicidas para o controle de ervas daninhas têm sido reconhecido como uma prática agrícola. No entanto, seu uso indiscriminado pode ter impactos sobre organismos não-alvos, principalmente em formas de vidas aquáticas e em seu ambiente (Nwani et al., 2010). O Brasil é considerado o maior consumidor de pesticidas do mundo (ANDEF, 2012) e os herbicidas representam a classe mais utilizada no país (IBAMA, 2010a), sendo a atrazina e o glifosato os seus principais representantes empregados em território nacional (IBAMA, 2010b; Cox, 2001).

A atrazina (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina) é mais aplicável em áreas rurais, sobretudo em culturas de milho, sorgo, cana de açúcar, entre outros. Apesar de ser classificada como moderadamente tóxica para espécies aquáticas, este herbicida é um dos agrotóxicos mais detectados em córregos, rios, lagos, represas e águas subterrâneas (Battaglin et al., 2008; Scrubner et al., 2005; Battaglin et al., 2003). Já o herbicida glifosato (N-(fosfonometil)glicina) é, talvez, o mais importante que já foi desenvolvido (World Health Organization, 1994). Devido a sua baixa persistência no solo e sua característica biodegradável, são realizadas

repetidas aplicações do mesmo para o controle de ervas daninhas em diversas culturas. Possui grande destaque no mercado brasileiro, representando 76% do total de herbicidas comercializados (IBAMA, 2009). Consequentemente, grandes quantidades deste pesticida podem entrar em contato com outros organismos (Mitchell et al., 1987; Servizi et al., 1987).

Em 2006 houve o pedido para reavaliação do herbicida a base de glifosato. Atualmente o mesmo está em andamento, de acordo com a Resolução RDC nº 10/2008 (ANVISA, 2014). Após oito anos de pesquisas, o Grupo de Genética e Mutagêneses Ambiental (GEMA) de pesquisadores da Universidade Nacional de Río Cuarto (UNRC), elaboraram um relatório no qual vinculam a utilização do glifosato com alterações genéticas que podem gerar abortos espontâneos, malformações em fetos e câncer (Torres et al., 2006). No entanto, um dos principais empecilhos enfrentados para esta reavaliação são as ações judiciais movidas pelos fabricantes do produtor, a fim de tentar cessar o processo.

A fauna silvestre é exposta a uma grande variedade de condições e produtos químicos sintéticos presentes no ambiente. Estudos ecotoxicológicos já demonstraram que muitos destes compostos podem afetar a sobrevivência das populações de animais silvestres, interferindo na capacidade individual dos organismos, resultando em doenças ou mesmo afetando sua reprodução (Guillette e Crain, 2000). Embora ambientes aquáticos estejam sendo contaminados por uma série de poluentes, pouco se sabe sobre os reais efeitos destes e suas propriedades toxicológicas e riscos a fauna, especialmente aos répteis. Entre estes, a ordem Testudines tem se revelado de grande importância no contexto ecotoxicológico. Representantes desse grupo apresentam-se úteis como indicadores de contaminação química e radioativa por apresentarem ampla distribuição geográfica, variedade de habitats e longevidade (Meyersschöne e Walton, 1994).

A comunidade de Testudines aquáticos amazônicos consistui uma das mais diversas do mundo (Mittermeier, 1978). A espécie *Podocnemis expansa* é uma das principais representantes dessa ordem, sendo considerada o maior Testudines de água doce da América do Sul, atingindo até 107cm de comprimento de carapaça e 90kg (Pritchard, 1979). São animais que sofrem influências ambientais (temperatura, água e trocas gasosas) que interferem tanto no seu desenvolvimento embrionário como também na determinação sexual dessa espécie (Pough et al., 2008; Malvasio, 2001).

Devido a exploração de seus ovos e carne (Pearse et al., 2006) por ribeirinhos que habitam ao longo dos rios, a população de *P. expansa* foi drasticamente reduzida (Moll e Moll, 2004), passando a ser regulamentada no Apêndice II da Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies Ameaçadas (CITES) e listada segundo a IUCN como espécie com baixo risco, no entanto, dependente de programas de conservação (IUCN, 2011). Atualmente, o Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Répteis e Anfíbios, Unidade do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) é o responsável pela realização de projetos de conservação e manejo de Testudines, sendo a *P. expansa*, uma das espécies mais estudadas e protegidas.

Os organismos aquáticos têm sido sucessivamente expostos a uma variedade de contaminantes provenientes, sobretudo da atividade agrícola, tais como metais pesados, hidrocarbonetos, compostos orgânicos e pesticidas (Schnurstein e Braunbeck, 2001). Tendo em vista a escassez de trabalhos referentes à exposição de Testudines e os possíveis efeitos que esses podem ocasionar nesses organismos, objetivou-se verificar os efeitos dos herbicidas atrazina e glifosato no desenvolvimento ósseo de embriões de *P. expansa*, expostos a diferentes concentrações de pesticidas durante o período de incubação artificial.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Coleta dos ovos

Foram coletados, em outubro de 2013, 140 ovos de *P. expansa*, em área de Proteção Ambiental Meandros Rio Araguaia, Brasil ($13^{\circ} 20' 38''$ S e $50^{\circ} 38' 05''$ W) com licença autorizada SISBIO/ICMBio 36957-1/2012. Todos os procedimentos foram submetidos à Comissão de Ética na Utilização Animal da Universidade Federal de Uberlândia e obtiveram parecer favorável sob o registro CEUA/UFU 055/12.

Os ovos foram retirados dos ninhos e acondicionados em sacos plásticos com vermiculita umedecida com água na proporção de 2:1 v/v e transportados em veículo oficial ao Laboratório de Ensino e Pesquisa em Animais Silvestres da Universidade Federal de Uberlândia (LAPAS/UFU) para incubação artificial.

3.2.2 Incubação artificial e exposição aos agrotóxicos

Os ovos foram incubados artificialmente em sete bandejas colocadas em incubadoras de acordo com método de Verdade et al. (1992). Ao longo da incubação, a temperatura no interior das incubadoras foi mantida entre 28 e 31°C e a umidade relativa do ar entre 80 e 100%.

O substrato utilizado para a incubação dos ovos foi areia trazida do local de coleta. Este substrato foi contaminado com o produto formulado atrazina e glifosato em concentrações determinadas tomando como base o limite máximo de 2 μ g/L e 65 μ g/L, aceito para contaminação por atrazina e glifosato, respectivamente, em águas de superfície brasileiras estabelecido pelas resoluções do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) nº 357/2005 e nº 20/1986. Os substratos foram umedecidos diariamente com água destilada pura e contaminada com Atrazina PROOF® nas concentrações de 2, 20 e 200 partes por bilhão (ppb) e com Glifosato Roundup Original®, nas concentrações de 65, 650 e 6500 ppb, obtendo-se assim um grupo controle e seis grupos experimentais. Em cada um dos tratamentos foram incubados 20 ovos de *P. expansa*.

3.2.3 Manipulação dos embriões

O dia de colocação dos ovos nas caixas de incubação foi considerado dia 0. Foram realizadas coletas de dois ovos de cada incubadora a cada dez dias até a eclosão, totalizou-se uma média de 10 ovos coletados por tratamento. Posteriormente à coleta dos ovos, foi realizada eutanásia dos embriões de forma humanitária, conforme determinações legais, e seguindo orientações técnicas específicas. Desta forma, a casca dos ovos foi cortada com tesoura cirúrgica, os embriões foram removidos e, imediatamente, foi administrado pentobarbital sódico (Close et al., 1997), em dose superior a 60mg/Kg, por via intracelomática (Reilly et al., 2001), garantindo a sobredose do anestésico para obtenção de rápida inconsciência do animal seguida de morte por parada respiratória. Após a eutanásia, os embriões foram preservados em formaldeído 3,7%.

3.2.4 Diafanização de tecidos moles e coloração de cartilagens e ossos

Os embriões foram submetidos às técnicas de diafanização de tecidos moles por hidróxido de potássio (KOH) e coloração dos ossos pela Alizarina red S e das cartilagens por Alcian blue, segundo os métodos de Davis e Gore (1936) e Dingekus e Uhler (1977) modificados.

3.2.5 Registro e análise dos dados

Os espécimes foram analisados com auxílio de uma lupa estereomicroscópica (Leica, DM 1000). As características morfológicas da cartilagem e dos ossos dos embriões expostos aos herbicidas foram comparadas com resultados obtidos por Vieira (2008) ao descrever a ontogenia dos ossos do esqueleto de embriões de *P. expansa*.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foram verificadas alterações ósseas e cartilagíneas nos embriões expostos a atrazina e ao glifosato (Figuras 1 e 2). Após a análise desses tecidos por meio da técnica de diafanização e coloração dos ossos e cartilagens, os embriões foram avaliados quanto às características correspondentes ao estágio esperado de desenvolvimento ósseo com base nos estudos de Vieira (2008).

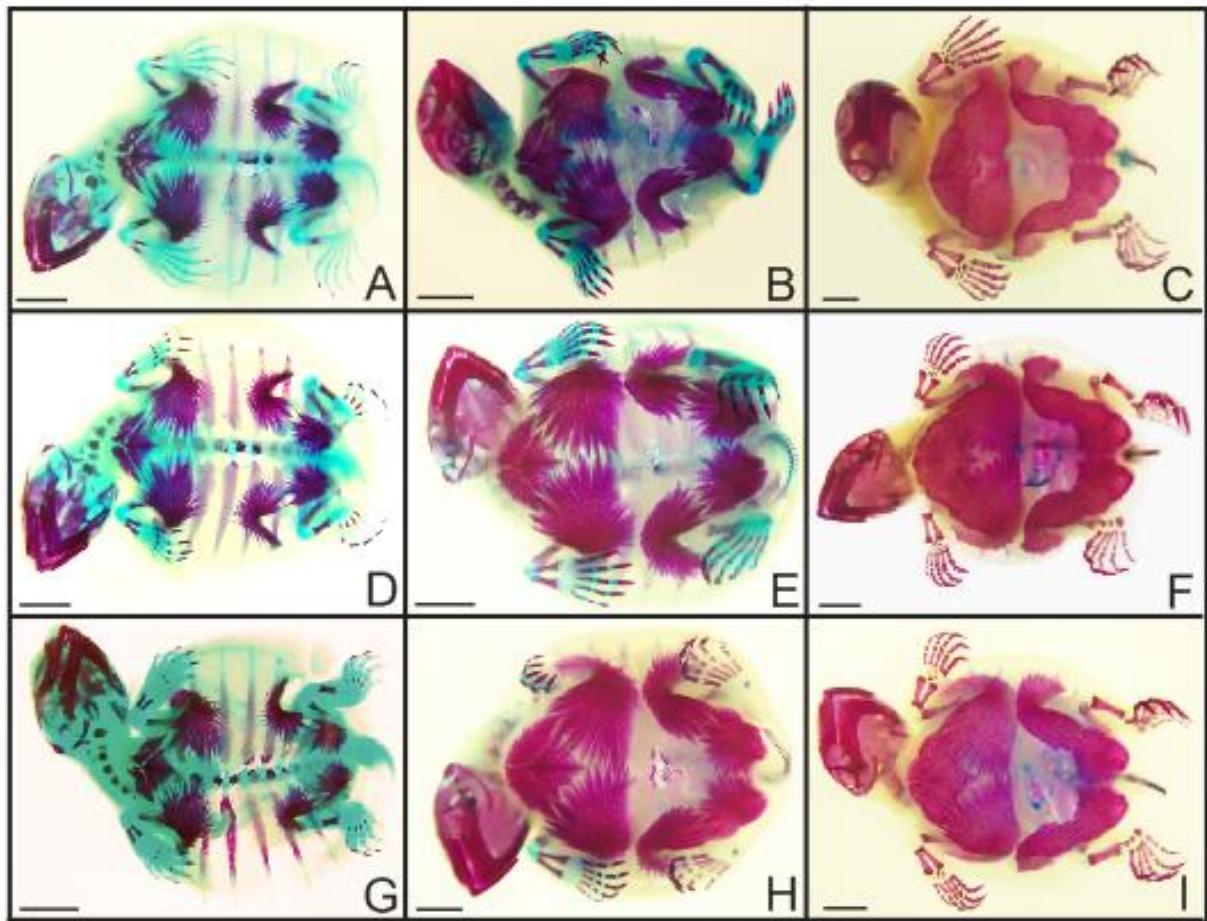


Figura 3-1: Embriões de *Podocnemis expansa* em vista ventral. (A) controle, estágio 17; (B) controle, estágio 21; (C) controle, estágio 23; (D) substrato contaminado com atrazina 200 μ g/L, estágio 17; (E) substrato contaminado com atrazina 2 μ g/L, estágio 21; (F) substrato contaminado com atrazina 2 μ g/L, estágio 23; (G) substrato contaminado com glifosato 65 μ g/L, estágio 17; (H) substrato contaminado com 650 μ g/L, estágio 21; (I) substrato contaminado com glifosato 65 μ g/L, estágio 23. Diafanização por KOH e coloração das cartilagens com azul de alcian e dos ossos com vermelho de alizarina. Escala 5mm.

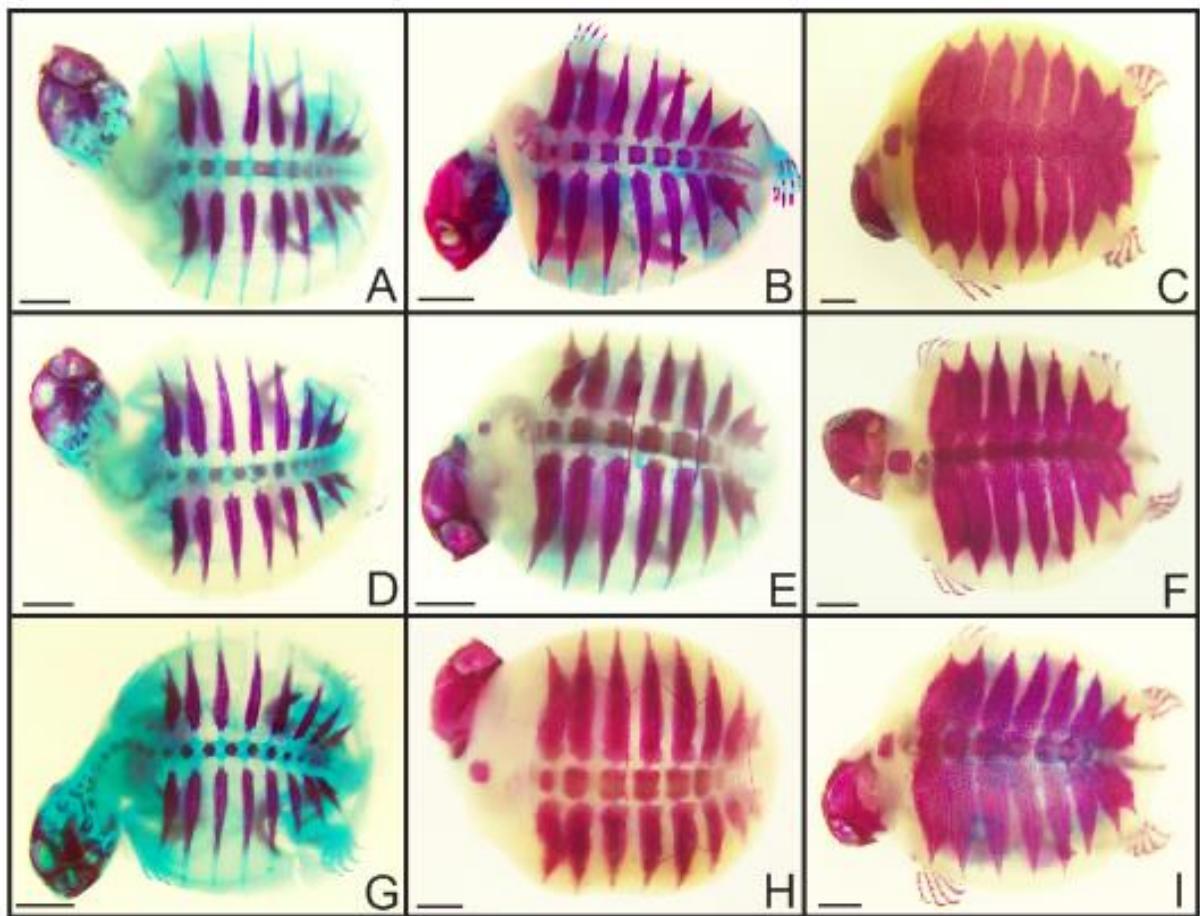


Figura 3-2: Embriões de *Podocnemis expansa* em vista dorsal. (A) controle, estágio 17; (B) controle, estágio 21; (C) controle, estágio 23; (D) substrato contaminado com atrazina 200µg/L, estágio 17; (E) substrato contaminado com atrazina 2µg/L, estágio 21; (F) substrato contaminado com atrazina 2µg/L, estágio 23; (G) substrato contaminado com glifosato 65µg/L, estágio 17; (H) substrato contaminado com 650µg/L, estágio 21; (I) substrato contaminado com glifosato 65µg/L, estágio 23. Diafanização por KOH e coloração das cartilagens com azul de alcian e dos ossos com vermelho de alizarina. Escala 5mm.

Com relação aos agrotóxicos utilizados no presente estudo, verificou-se que tanto a atrazina quanto o glifosato são alvos de muitos estudos, principalmente no que se refere a interferência de sua exposição em seres vivos. A ausência de efeitos adversos em animais expostos a estes contaminantes também são relatados em outras espécies. Le Mer et al. (2013) contaminaram ovos de uma espécie de peixe (*Gasterosteus aculeatus*) em laboratório durante a incubação por cerca de 42 dias, utilizando quatro concentrações dos herbicidas atrazina e glifosato (0,1; 1; 10 e 100 ug/L). Após eclodidos, os alevinos foram avaliados quanto a sua massa (comprimento, peso úmido) e foram realizados testes bioquímicos e histológicos (análise do genótipo e fenótipo). De acordo com esses testes, não foi registrado

qualquer efeito significativo nas fases iniciais desses alevinos causados por esses pesticidas.

Estudos realizados com répteis utilizando a formulação à base de glifosato Roundup® verificaram uma diminuição na contagem de glóbulos brancos, um aumento de anticorpos heterófilos, alterações nas proteínas plasmáticas, além de um efeito negativo sobre o crescimento em jovens jacarés da espécie *Caiman latirostris* (Latorre et al., 2013). Nesse trabalho, indivíduos jovens foram expostos durante dois meses a concentrações de 11 ou 21 mg /L do herbicida em questão e comparados com o grupo controle, sendo essa concentração diminuída progressivamente ao longo do período de exposição para simular a degradação do glifosato na água. Vale ressaltar que nesse estudo os organismos foram expostos diretamente em contato com os agrotóxicos em questão, o que não ocorreu no presente estudo.

Diversos trabalhos são realizados, sobretudo com anfíbios frente à toxicidade de agrotóxicos, sendo um dos motivos o fato da absorção de pesticidas ser mais rápida nesses animais do que em outros vertebrados (Quaranta et al., 2009). Em Relyea (2005) a pulverização direta do glifosato em taxas de aplicação recomendadas nos Estados Unidos, resultaram em 79% de mortes de rãs e sapos juvenis nas primeiras 24 horas de experimento e até 30% em outra pesquisa realizada com anuros colombianos (Bernal et al., 2009). No entanto, sabe-se que nem todos os herbicidas à base de glifosato apresentam riscos imediatos para anfíbios sob condições de campo, pois a mortalidade pode variar entre 0% e aproximadamente 80%, dependendo da sua formulação (Dinehart et al., 2009). Desse modo, assim como a taxa de mortalidade, é possível inferir que, com base na formulação utilizada, efeitos adversos da exposição a esses contaminantes em animais, bem como em *P. expansa*, podem sofrer variações.

Com relação à exposição ao herbicida atrazina, Storrs e Semlitsch (2008) demonstraram que os anfíbios que apresentam menor período larval e consequentemente rápido desenvolvimento são mais suscetíveis a contaminação da atrazina. Outros autores afirmam ainda que a exposição a esse herbicida pode causar hermafroditismo, desmasculinização e má formação no desenvolvimento de gônadas de rãs touro (*Xenopus laevis*) (Hayes et al, 2003; Hayes et al., 2002). Com relação aos efeitos de atrazina em répteis, poucos estudos já foram realizados. De Solla et al. (2006) verificaram mudanças no desenvolvimento gonadal de *Chelydra*

serpentina em resposta a diferentes concentrações de atrazina. Verificou-se ainda que a exposição à atrazina durante o desenvolvimento embrionário de cágados das espécies *Graptemys ouachitensis* e *Graptemys pseudogeographica* inibiu o comportamento de fuga e redução da sobrevivência pós-eclosão (Neuman-Lee e Janzen, 2011). No entanto, não se validou a aptidão física como parâmetros para *P. expansa*.

Outros estudos demonstram ainda efeitos fisiológicos e bioquímicos nos organismos vivos. Os herbicidas glifosato e atrazina afetaram a eficiência da fagocitose de células imunológicas de peixes (*Rhamdia quelen*), apresentando maior suscetibilidade a infecções de bactérias (Kreutz et al., 2010). Após a exposição em concentrações subletais desses pesticidas por 96 horas, os autores relataram uma diminuição significativa do número de células e o índice fagocitário intracelomático foi observado. Esses organismos foram também mais susceptíveis a bactérias patógenas. Estudos de avaliação dos efeitos de embriotoxicidade, fetotoxicidade e potencial teratogênico com atrazina em ratos e coelhos também contrastam com o nosso resultado. O composto foi administrado por via oral em doses de 0, 10, 70 ou 700 mg/kg para grupos de ratos com gestação de 6-15 semanas; e em doses de 0, 1, 5 ou 75mg/kg para coelhos com gestação de 7-19 dias (Infurna et al., 1988). Foram observadas toxicidade materna e fetal nas maiores concentrações tanto em ratos quanto em coelhos, no entanto, não se verificou anomalias teratogênicas em ambas as espécies.

Em estudos de efeitos de toxicidade na reprodução de ratos, onde as progenitoras foram expostas à 500, 750 ou 1000mg/kg por via oral de glifosato formulado, verificou-se alterações como ossificação incompleta do crânio, aumento de fontanelas, bipartição dos ossos interparietais, supraoccipital, ausência de vértebras caudais, costela onduladas e ausência de ossificação dos metatarsos e falanges dos membros pelvino. Foram verificadas alterações em todas as concentrações utilizadas (Dallegrave, 2003). Isso demonstra o poder teratogênico do glifosato, apesar de não ter observado alterações ósseas em *P. expansa*. Nestes animais a casca pode ter formado uma barreira protetora vital.

A casca dos ovos de Testudines tem um papel de extrema importância para o embrião, visto que controla a troca de gases através dos poros, é fonte de minerais para o embrião e oferece proteção (Kusuda et al., 2013; Kitimasak et al., 2003). Tendo em vista a metodologia empregada e os resultados obtidos no presente

estudo, pode-se sugerir que a casca configurou-se em uma importante barreira de proteção para o embrião, não permitindo que os herbicidas utilizados alcançassem o conteúdo interno do ovo. Em outros estudos, referentes a composição química dos ovos de Testudines, verificou-se que a casca confere tão bem o isolamento do embrião a partir do ambiente que nem mesmo a umidade externa pode influenciar no desenvolvimento dos filhotes, a não ser em condições extremas (Lesem e Dmi'el, 1986). Em exposição de ovos de *P. expansa* ao produto técnico atrazina em apenas um único dia em incubação artificial, verificou-se modificações na composição química da casca, referente a teor de fósforo, gordura e espessura, no entanto, não se evidenciou nenhum efeito teratogênico na ontogenia óssea dos filhotes (Souza, 2013).

Com relação a ausência de alterações macroscópicas na ontogenia óssea de *P. expansa* após a exposição aos pesticidas atrazina e glifosato, o presente estudo contrata com a maioria das observações relatadas em literatura científica utilizando outros pesticidas. Em estudos com fêmeas juvenis de *Alligator mississippiensis*, que residem no Lago Apopka, na Flórida, contaminado com DDT, Lind et al. (2004) observaram, por meio de tomografia, maior densidade trabecular em ossos longos, o que sugere que a reabsorção óssea nesses animais foi comprometida por meio de inibição da atividade osteoclástica.

Estudos com malformações em anfíbios e peixes também constataram efeitos teratogênicos. Girinos de rãs (*Rana perezi*) foram mantidos por 14 semanas em água contendo dois níveis letais de inseticidas ZZ-Aphox® (Carbamato) ou Folidol® (Organofosforado) em concentrações de 0,25 e 1mg/L. Essa contaminação resultou em malformações na coluna vertebral e/ou membros dos indivíduos, além de diferença na composição da matriz óssea e presença anormal de vascularização no periôsteo (Alvarez, 1995). Wells e Cowan (1982) verificaram displasia vertebral em peixes expostos ao herbicida Trifluralina. Em experimento realizado em tanques, a espécie *Salmon parr* foi exposta a três doses do contaminante (0,5, 0,25 e 0,01 mg/L) por um período de 16 horas durante dez dias. Exames radiográficos evidenciaram sinais claros de danos vertebrais nesses animais sobretudo os que ficaram em contato com as maiores concentrações. Pela análise desses resultados, é possível verificar que os organismos expostos por esses autores foram colocados em contato direto com os agrotóxicos, alterando assim sua morfologia, o que não se realizou no presente estudo com *P. expansa*.

Malformações ósseas também foram verificadas em recém nascidos de galinhas. Uggini e colaboradores (2010) injetaram inseticidas comerciais em diferentes concentrações em ovos de galinha incubados no dia zero. Após a eclosão, analisou os filhotes vivos e mortos. Os espécimes foram tratados com alizarina e alcian blue para análise dos ossos e cartilagens. Malformações embrionárias foram encontradas no esqueleto axial e apendicular em todas as concentrações utilizadas. Na menor concentração (0,01 µg) os efeitos não foram muito óbvios morfologicamente, mas com o aumento da concentração verificou efeitos mais evidentes como pernas tortas e falanges distorcidas, deformidade no bico, esterno, costela, entre outros. Além desse estudo, outros experimentos com aves corroboram esses achados (Ahmad e Asmatullah, 2007; Anwar, 2003; Rao et al., 1992).

Apesar da contaminação diária utilizando os produtos formulados Atrazina PROOF® e Glifosato Roundup Original®, não se evidenciou alterações no desenvolvimento ósseo de *P. expansa*. No entanto não se pode afirmar que essa exposição não tenha alterado outros padrões, como os fisiológicos, neurológicos ou comportamentais dos indivíduos avaliados, como foram observados e discutidos por outros autores.

3.4 CONCLUSÃO

A exposição aos herbicidas comerciais atrazina e glifosato, em concentrações até 100 vezes superiores às permitidas pela legislação vigente, não resultam em nenhuma anomalia óssea dos embriões de *P. expansa* expostos diariamente aos agrotóxicos, durante a ontogenia.

3.5 AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao RAN/ICMBio e ao CEUA/UFU por permitir à realização da pesquisa. À Omar Teodoro da Silva Júnior pelos herbicidas utilizados neste estudo. A pesquisadora Lilian Freitas Bastos pela ajuda na coleta dos ovos. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro e o incentivo ao estudo e à pesquisa.

REFERÊNCIAS

Ahmad KR, Asmatullah (2007) Teratological effects of Chlorpyrifos in mice. Iranian Jr Toxicol, v.1, p. 91–99.

Alvarez R, Honrubia MP, Herráez MP (1995) Skeletal Malformations Induced by the Insecticides ZZ-APhox® and Folidol® During Larval Development of *Rana perezi*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology v. 28, p. 349-356.

ANDEF - Associação Nacional de Defesa Vegetal (2012) Disponível em:<<http://www.andef.com.br/defensivos>> Acesso em 24 de novembro 2014.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2014). Reavaliação de Agrotóxicos - Resolução RDC nº 10/2008. Disponível em:<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Reavaliacoes+de+Agrotoxicos/W+Reavaliacao+de+Agrotoxicos++Resolucao+RDC+n+10+2008>> Acesso em 26 de novembro 2014.

Anwar K (2003) Cypermethrin, a Pyrethroid induces teratological and biochemical changes in young chick embryos. Pakistan J Biol Sci, v. 6. p. 1698–1705.

Battaglin WA, Thurman EM, Kalkhoff SJ, Porter SD (2003) Herbicides and transformation products in surface waters of the Midwestern United States. J. Am. Water Res. Assoc. v. 39, p. 743–756.

Battaglin WA, Rice CK, Foazio MJ, Salmons S, Barry RX (2008) The occurrence of glyphosate, atrazine, and other pesticides in vernal pools and adjacent streams in Washington, DC, Maryland, Iowa and Wyoming 2005–2006. Environ. Monit. Assoc. v. 155, p. 281–307.

Bernal MH, Solomon KR, Carrasquilla G (2009) Toxicity of formulated glyphosate (Glyphos) and Cosmo-Flux to larval and juvenile Colombian frogs 2. Field and laboratory microcosm acute toxicity. *J Toxicol Env Health A*, v. 72, p. 966–973.

Berti AP, Düsman E, Soares LC, Grassi LEA (2009) Efeitos da contaminação do ambiente aquático por óleos e agrotóxicos. *Sabios: Rev. Saúde e Biol.*, v. 4, n. 1, p. 45-51.

Bishop CA, Brooks RJ, Carey JHNGP, Norstroni RJ, Lean DRS (1991) The case for a causeeffect linkage between environmental contamination and development in eggs of the common snapping turtle (*Chelydra s. serpentine*) from Ontario, Canada. *J Toxicol Environ Health*, v. 33, p. 521-547.

Bueno-Guimarães HM, Ferreira CM, Garcia MLB, Saldiva PHN (2001) Tadpole epithelium test: potential use of *Rana catesbeiana* histopathologic epithelial changes to evaluate aquatic pollution. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, v. 67, p. 202–209.

Close B; Banister K, Baumans V, Bernoth E, Bromage N, Bunyan J, Erhardt W, Flecknell P, Gregory N, Hackbarth H, Morton D, Warwick C (1997) Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2. *Laboratory Animals*, v. 31, p. 1-32.

Cox, C (2001) Atrazine: environmental contamination and ecological effects. *J. Pestic. Reform* 21,12–20.

Crain DA, Guillette JR LJ, Pickford DB, Percival HF, Woodward AR (1998) Sex-steroid and thyroid hormone concentrations in juvenile alligators (*Alligator mississippiensis*) from contaminated and reference lakes in Florida, USA. *Environ.Tox. Chem.*, v. 17, 446-452.

Dallegrave E (2003). Toxicidade reprodutiva do herbicida Glifosato-Roundup® em ratos Wistar. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. 200f.

Davis DD, Gore UR (1936) Clearing and staining skeleton of small vertebrates. Field Museum of Natural History. v. 4, p. 3 - 15.

De Solla SR, Martin PA, Fernie KJ, Park BJ, Mayne G (2006) Effects of environmentally relevant concentrations of atrazine on gonadal development in snapping turtles (*Chelydra serpentina*). Environmental Toxicology and Chemistry, v. 25, p. 520-526.

Dingerkus G, Uhler LD (1977) Enzyme clearing of alcian blue stained whole small vertebrates for demonstration of cartilage. Stain Technol., v. 52, p 229-232.

Dinehart SK, Smith LM, McMurry ST, Anderson TA, Smith PN, Haukos DA (2009) Toxicity of a glufosinate- and several glyphosatebased herbicides to juvenile amphibians from the Southern High Plains, USA. Sci Total Environ, v. 407, p. 1065–1071.

Guillette JR LJ, Gross TS, Masson GR, Matter JM, Percival HF, Woodward AR (1994). Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. Environ. Health Perspect. 102, 680-688.

Guillette LJ Jr, Crain DA, eds. (2000) Environmental Endocrine Disruptors: An Evolutionary Perspective. New York:Taylor & Francis.

Hall RJ, Henry PFP (1992) Assessing effects of pesticides on amphibians and reptiles: status and needs. Herpetol J 2:6571.

Hall RJ, Clark JR DR (1982) Responses of the iguanid lizard *Anolis carolinensis* to four organophosphorus pesticides. Environ Pollut, v. 28, p. 45-52.

Hayes TB, Collins A, Lee M, Mendoza M, Noriega N, Stuart AA, Vonk, A (2002) Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Ecology*, v. 99, p. 5476-5480.

Hayes T, Haston K, Tsui M, Hoang A, Haeffele C, Vonk A (2003) Atrazine induced hermaphroditism at 0.1 ppb in American Leopard Frogs (*Rana pipiens*): Laboratory and field evidence. *Environmental Health Perspectives*, v. 111, p. 568-575.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: uma abordagem ambiental. Brasília, 84 p. 2010a.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil (2009) Disponível em:<
http://www.ibama.gov.br/phocadownload/Qualidade_Ambiental/produtos_agrotoxicos_comercializados_brasil_2009.pdf>. Acesso em 24 de novembro 2014b.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (2010) Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: Uma abordagem ambiental. Rebelo,R.M.(Coord.),Vasconcelos,R.A.,Buys, B.D.M.C., Rezende,J.A., Moraes,K.O.C.,Oliveira,R.P. IBAMA, Brasília.

Infurna, R, Levy B, Meng C, Yau E, Traina V, Rolofson G, Stevens J, Barnett J (1988) Teratological evaluations of atrazine technical, a triazine herbicide, in rats and rabbits. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, v. 24, p. 307-319.

IUCN - International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (2011). IUCN Red List of Threatened Species. Disponível em:<<http://www.redlist.org>> Acessado em 10 nov.2014.

Kitimasak W, Thirakupt K, Moll DL (2003) Eggshell structure of the Siamese narrow-headed softshell turtle *chitra chitra* nutphand, 1986 (testudines: Trionychidae). Science Asia. v. 29, p.95-98.

Kreutz LC, Barcellos LJC, Marteninghe A, Santos ED, Zanatta R (2010) Exposure to sublethal concentration on glyphosate or atrazine-based herbicides alters the phagocytic function and increases the susceptibility of silver catfish fingerlings (*Rhamdia quelen*) to *Aeromonas hydrophilia* challenge. Fish Shellfish Immunol, v. 29, p. 694-697.

Kusuda S, Yasukawa Y, Shibata H, Saito T, Yoshizaki N (2013) Diversity in the Matrix Structure of Eggshells in the Testudines (Reptilia) Zool Sci, v. 30, p. 366–374.

Latorre MA, González ECL, Larriera A, Poletta GL, Siroski PA (2013) Effects of *in vivo* exposure to Roundup® on immune system of *Caiman latirostris*. J Immunotoxicol, v.10, n. 4, p. 349-354.

Le Mer C, Roy RL, Pellerin J, Couillard CM, Maltais D (2013) Effects of chronic exposures to the herbicides atrazine and glyphosate to larvae of the threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). Ecotoxicol Environ Saf, v. 89, p 174–181.

Lesem A, Dmi'el R, (1986) Water loss from *Trionyx triunguis* eggs incubating in natural nests. Herpetol. J. v. 1, p. 115-117.

Lind PM, Milnes, MR, Lundberg R, Bermudez D, Örberg J, Guillette LJ Jr. (2004) Abnormal Bone Composition in Female Juvenile American Alligators from a Pesticide-Polluted Lake (Lake Apopka, Florida). Environmental Health Perspectives, v. 112, n,3, p. 359-362.

Malvasio, A (2001) Aspectos do mecanismo alimentar e da biologia reprodutiva em *Podocnemes expansa* (Schweigger, 1812), *Podocnemes unifilis* (Troschel, 1848) e

P.sex tuberculata (Cornalia, 1809) (Testudines, Pelomedusidae). 199p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas)- Faculdade de zoologia, Instituto de biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo.

Meyers-Schöne L, Walton BT (1994) Turtles as monitors of chemical contaminants in the environment. Reviews of Environmental Contamination & Toxicology, v. 135, p. 93-153.

Mitchell DG, Chapman PM, Long TL (1987) Acute toxicity of Roundup and Rodeo herbicides to rainbow trout, chinook and coho salmon. Bull Environ Contam Toxicol, v. 39, p. 1028-35.

Mittermeier RA (1978) South America's River Turtles: Saving Them by Use. Oryx 14:222-230.

Moll D, Moll EO (2004) The ecology, exploitation and conservation of river turtles. New York: Oxford University Press.420p.

Neuman-Lee, LA, Janzen F (2011) Atrazine exposure impacts behavior and survivorship of neonatal turtles. Herpetologica, p. 67, p. 23-31.

Nwani CD, Lakra WS, Nagpure NS, Kumar R, Kushwaha B, Srivastava SK (2010). Toxicity of the Herbicide Atrazine: Effects on Lipid Peroxidation and Activities of Antioxidant Enzymes in the Freshwater Fish *Channa Punctatus* (Bloch). Int. J. Environ. Res. Public Health, v. 8, p. 3298-3312.

Oga, S (2003) Fundamentos da Ecotoxicologia, 2 ed. São Paulo: Atheneu Editora, 474p.

Olafsson PG, Bryan AM, Bush B, Stone W (1983) Snapping turtles: a biological screen for PCBs. Chemosphere, v. 12, p. 1525-1532.

Pearse DE, Arndt AD, Valenzuela N, Miller BA, Cantarelli V, Sites JW JR (2006) Estimating population structure under non-equilibrium conditions in a conservation context: continent-wide population genetics of the giant Amazon river turtle *Podocnemis expansa* (Chelonia; Podocnemidae). *Molecular Ecology*, v. 15, p. 985-1006.

Pritchard PCH (1979) *Encyclopedia of Turtles*. New Jersey: T.F.H. Publications, 285p.

Pough FH, Heiser JB, Janis CM (2008) *A vida dos vertebrados*. 4.ed. São Paulo: Atheneu Editora. 684p.

Quaranta A, Bellantuono V, Cassano G, Lippe C (2009) Why amphibians are more sensitive than mammals to xenobiotics. *PLoS One* 4:e7699.

Rao JV, Swamy AN, Yamin S, Rao SH, Rahman MF (1992) Teratism induced in the developing chick by RPR-V, an organophosphate. *Food Chem Toxic*, v. 30, p. 945–951.

Relyea RA (2005) The lethal impact of Roundup on aquatic and terrestrial amphibians. *Ecol Appl*, v. 15, p 1118–1124.

Reilly JS (2001) Reptiles. In: _____. Euthanasia of animals used for scientific purposes. Adelaide, Australian and New Zealand Council for the Care of Animals in Research and Teaching. p. 83-89.

Servizi JA, Gordon RW, Martens DW (1987) Acute toxicity of Garlon 4 and Roundup herbicides to salmon, daphnia and trout. *Bull Environ Contam Toxicol*, v. 39, p. 15-22.

Schnurstein A, Braunbeck T (2001) Tail moment versus tail length application of an *in vitro* version of the comet assay in biomonitoring for genotoxicity in native surface waters using primary hepatocytes and gill cells from zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology Environmental Safety*, v. 49, p. 187-196.

Scrubner, EA, Thurman EM, Goolsby DA, Meyer MT, Battaglin WA, Kolpin DW (2005) Summary of significant results from studies of atrazine herbicides and their degradation products in surface water, groundwater, and precipitation in the Midwestern United States during the 1990s. In U.S. Geological Survey Scientific Investigations Report; USGS: Lawrence, KS, USA, pp. 2005–5094.

Souza, RR (2013) Efeitos da atrazina na composição química e morfologia de cascas de ovos de *Podocnemis Expansa* (Testudines, Podocnemididae) incubados artificialmente. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. 52 f.

Storrs, S, Semlitsch R (2008) Variation in somative and ovarian development: Predicting susceptibility of amphibians to estrogenic contaminants. General and Comparative Endocrinology, v. 156, p. 524-530.

Tavera-Mendoza L, Ruby S, Brousseau P, Fournier M, Cyr D (2002) Response of the amphibian tadpole *Xenopus laevis* to atrazine during sexual differentiation of the ovary. Environmental Toxicology Chemistry, v. 21, p. 1264-1267.

Torres FM, Urroz MBGC, Ovando HG, Anchordoqui IW, Vera LU, Hand IBLH, Abrate NG (2006) Evaluation of genotoxicity of the herbicide glyphosate quantitatively measured by the comet assay and micronucleus formation in treated mice. Theoria, v. 15, n. 2, p. 53-60.

Uggni GK, Patel PV, Balakrishnan (2010) Embryotoxic and Teratogenic Effects of Pesticides in Chick Embryos: A Comparative Study Using Two Commercial Formulations. Environmental Toxicology, p. 166-174.

Verdade LM, Michelotti F, rangel MC, Cullen-Jr L, Ernandes MM, Lavorenti, A. (1992) Manejo de ovos de jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) no CIZBAS/ESALQ/USP, in: Verdade LM, Lavorenti A (Eds.) In Anais do I workshop sobre conservação e manejo do jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*).ESALQ/USP, Piracicaba, pp 92-99.

Vieira LG (2008) Ontogenia dos ossos do esqueleto da tartaruga-da-amazônia *Podocnemis expansa* Schweigger, 1812 (Testudines, Podocnemididae). 2008. 152 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008.

Willingham E (2001) Embryonic exposure to low dose pesticides: effects on growth rate in the hatchling red-eared slider turtle. Journal of Toxicology and Environmental Health, v. 64, p. 257–272.

Wells DE, Cowan AA (1982) Vertebral dysplasia in salmonids caused by the herbicide trifluralin. Environmental Pollution (Series A), v. 29, p. 249-260.

Winne CT, Hopkins WA (2006) Influence of sex and reproductive condition on terrestrial and aquatic locomotor performance in the semi-aquatic snake. Functional Ecology, v. 20, p. 1054-1061.

World Health Organization (1994) Glyphosate. Environmental Health Criteria. Publication No 159, Geneva, Switzerland.