



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Abordagens *in situ* e *in silico* no uso das aves para o biomonitoramento ambiental de genotoxicidade em áreas agrícolas no Cerrado

Aluno: Henrique Nazareth Souto

Orientadora: Prof. Dra. Sandra Morelli

Co-Orientador: Prof. Dr. Boscolli Barbosa Pereira

**UBERLÂNDIA - MG
2019**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Abordagens *in situ* e *in silico* no uso das aves para o biomonitoramento ambiental de genotoxicidade em áreas agrícolas no Cerrado

Aluno: Henrique Nazareth Souto

Orientadora: Prof. Dra. Sandra Morelli

Co-Orientador: Prof. Dr. Boscolli Barbosa Pereira

Tese apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Genética e Bioquímica.

**UBERLÂNDIA - MG
2019**

PALAVRAS-CHAVE DO TRABALHO: (agrotóxicos, biomarcadores, genotoxicidade, *Volatinia jacarina*, árvore filogenética, aves Cerrado).

S728 Souto, Henrique Nazareth, 1981-
- Uberlândia: 2019

Orientadora: Sandra Morelli, 1953.
Coorientador: Boscolli Barbosa Pereira, 1986.

Abordagens *in situ* e *in silico* no uso das aves para o biomonitoramento ambiental de genotoxicidade em áreas agrícolas no Cerrado/ Henrique Nazareth Souto. – 2019, 103f.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Genética e Bioquímica.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2019.2138>

Genética. I. Morelli, Sandra, 1953, (Orient.). II. Barbosa Pereira, Boscolli, 1986, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Genética e Bioquímica. IV. Aves como Biomonitoras ambientais de genotoxicidade em fazendas no Cerrado: abordagem *in situ* e *in silico*.

CDU: 575



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

ATA DE DEFESA

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica				
Defesa de:	Tese de Doutorado Acadêmico - nº 14/2019 - PPGGB				
Data:	Vinte e cinco de julho de 2019	Hora de início:	14:00h	Hora de encerramento:	18:00h
Matrícula do Discente:	11523GBI022				
Nome do Discente:	Henrique Nazareth Souto				
Título do Trabalho:	Abordagens <i>in situ</i> e <i>in silico</i> no uso das aves para biomonitoramento ambiental de genotoxicidade em áreas agrícolas no Cerrado.				
Área de concentração:	Genética				
Linha de pesquisa:	Biologia Molecular				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Biomonitoramento <i>in situ</i> da qualidade ambiental de fragmentos florestais adjacentes a culturas de café (<i>Coffea arábica</i>) por meio de ensaios de genotoxicidades em aves.				

Aos vinte e cinco dias do mês de julho de dois mil e dezenove, às 14:00 horas no Bloco 2E, sala 211, Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Prof. Dr. Edimar Olegário de Campos Júnior, Prof. Dr. Edson José Fragiorge, Prof. Dr. Mário Antônio Spanó, Prof. Dr. Robson José de Oliveira Júnior e Profª. Drª. Sandra Morelli, orientador (a) do (a) candidato (a) e demais convidados presentes conforme lista de presença. Iniciando os trabalhos o (a) presidente da mesa, a Profª. Drª. Sandra Morelli, apresentou a Comissão Examinadora e o (a) candidato (a), agradeceu a presença do público, e concedeu o (à) Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do (a) Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica. A seguir o (a) senhor (a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir o (a) candidato (a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais. Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o (a) candidato (a): APROVADO (A). Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Robson José de Oliveira Junior, Membro de Comissão**, em 25/07/2019, às 18:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mário Antônio Spano, Membro de Comissão**, em 25/07/2019, às 18:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Edson José Fragiurge, Usuário Externo**, em 25/07/2019, às 18:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Edimar Olegário de Campos Júnior, Usuário Externo**, em 25/07/2019, às 18:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site
https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1367223** e o código CRC **3BBB10F0**.



Abordagens *in situ* e *in silico* no uso das aves para o biomonitoramento ambiental de genotoxicidade em áreas agrícolas no Cerrado

Aluno: Henrique Nazareth Souto

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof^a. Dr^a. Sandra Morelli

Examinadores: Prof. Dr. Edimar Olegário de Campos Júnior

Prof. Dr. Edson José Fragiorge

Prof. Dr. Mário Antônio Spanó

Prof. Dr. Robson José de Oliveira Júnior

Data da defesa: 25/07/2019

As sugestões da Comissão Examinadora e as normas do PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas

Prof^a. Dr^a. Sandra Morelli

DEDICATÓRIA

À minha família, em especial à minha esposa Líliam Luísa Hordones Soares e às minhas filhas Laura Hordones Souto e Luísa Hordones Souto

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos...

À Professora Doutora Sandra Morelli, orientadora sem igual que muito me incentivou na construção da nossa pesquisa e carreira acadêmica. Seus ensinamentos transcendem a ciência. Com ela aprendi a ser mais calmo, sensato e humano.

Ao meu coorientador Boscolli Barbosa que sempre trouxe ideias e discussões interessantes para nosso trabalho. Por seu companheirismo, amizade e dedicação sem igual.

Ao meu primeiro orientador, Oswaldo Marçal Júnior pelo companheirismo e por me apresentar as aves como objetos de estudo.

À Dra. Celine de Melo pelas dicas e conversas iniciais para a confecção do primeiro projeto que culminaria no desenvolvimento desta tese.

Ao meu coautor, amigo e irmão para todas as horas Doutor Edimar Olegário de Campos Júnior.

Ao meu colega de curso Carlos Fernando Campos pela amizade e contribuições nesse e em outros trabalhos.

À Universidade Federal de Uberlândia e às agências de fomento (CAPES e CNPq) pelos recursos disponibilizados, em especial por minha bolsa de doutorado que, sem ela não seria possível a continuidade da minha formação.

Aos meus pais que com, seus ensinamentos, moldaram meu ser e me conduziram a um caminho pautado nos preceitos da moral e da ética. Por me propiciarem também uma educação familiar sólida e por incentivarem meus estudos na educação básica até minha formação acadêmica superior.

Aos meus irmãos Wesley Nazareth Souto e Leandro Nazareth Souto pela amizade incondicional e amor à família e aos estudos.

À minha amada e eterna esposa Líliam Luísa Hordones Soares por seu amor, amizade e companheirismo e também por entender a importância da educação em nossas vidas.

À população brasileira que com seus impostos financiaram meus estudos e permitiram minha chegada até aqui.

Aos meus professores do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, mestres construtores da ciência, muitas vezes desvalorizados e subestimados por alguns membros da população e do governo atual.

Aos meus colegas de laboratório e curso, foram muitas discussões, ideias e debates produtivos.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem o convite e pelas contribuições e considerações feitas.

Aos meus ex-alunos e auxiliares de campo que muito contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

A todos aqueles que, porventura, não foram aqui citados, mas que fizeram parte, direta ou indiretamente, dessa enorme conquista pessoal e profissional.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diferentes níveis de atuação do biomonitoramento ambiental	3
Figura 2. Crescimento mundial de pesticidas na última década.....	12
Figura 3. Emissão de dióxido de carbono na produção agrícola brasileira no período de 1961 a 2016	14
Figura 4. Formação de micronúcleo no processo de divisão celular.....	16
Figura 5. Etapas do Teste de Micronúcleos.	19
Figura 6. Localização das fazendas próximas à cidade de Monte Carmelo, Minas Gerais, Brasil.....	26
Figura 7. Exemplo da busca e aquisição do COI gene para cada uma das 20 espécies de aves encontradas no presente estudo..	34
Figura 8. A. <i>Volatinia jacarina</i> capturada na área de estudo e ANOVA de uma via da frequência de MN dos indivíduos de <i>Volatinia jacarina</i>	45
Figura 9. A. Eritrócitos de <i>Volatinia jacarina</i> e ANOVA da contagem de MN construída com todas as espécies de aves.....	47
Figura 10. Análise de componentes principais mostrando as variáveis mais correlacionadas com a frequência de MN	48
Figura 11. Correlação de Spearman entre os dados morfométricos das aves ...	50
Figura 12. Correlação de Spearman da Concentração da mistura de agrotóxicos e Frequência de MN.....	56
Figura 13. Medidas das diferenças anatômicas das aves coletadas em fazendas com diferentes tamanhos na cidade de Monte Carmelo, MG, Brasil.....	58
Figura 14. Árvore Filogenética baseada no gene COI para as 20 espécies de aves encontradas no presente estudo.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diferentes substâncias químicas com efeitos genotóxico/clastonênicos ou seus veículos de dispersão e seus respectivos biomonitoras ambientais envolvendo Teste de Micronúcleos (TMN) em diferentes espécies	8
Tabela 2. Agenda de aplicação de agrotóxicos nos três grupos de fazendas (pequenas, médias e grandes) durante os anos de 2015 e 2016	27
Tabela 3. Classes dos agrotóxicos e suas respectivas unidades de concentração * aplicadas nas fazendas de <i>Coffea arabica</i> localizadas em Monte Carmelo, MG, Brasil	30
Tabela 4. Números de acesso ao “Genbank” do “COI gene” e seus respectivos comprimentos (bp) para quase todas as espécies de aves encontradas nas fazendas de diferentes tamanhos localizadas na cidade de Monte Carmelo, Minas Gerais, Brasil.....	34
Tabela 5. Frequência de Micronúcleos nas aves coletadas nas fazendas com diferentes tamanhos localizadas na cidade de Monte Carmelo (MG), Brasil	40
Tabela 6. Tamanho das fazendas, média de micronúcleo, guilda alimentar e estatística descritiva para cada grupo de espécies de aves encontrada nos três grupos de fazendas (pequenas, médias e grandes) localizadas em Monte Carmelo, MG.	43
Tabela 7. Tamanho das fazendas, número médio de micronúcleo e estatística descritiva para todas as espécies de aves comparadas com <i>Volatinia jacarina</i> encontrada nos três grupos de fazendas (pequenas, médias e grandes) localizadas em Monte Carmelo, MG.	46
Tabela 8. Guilda trófica das espécies de aves e comprimentos dos bicos para as espécies de aves coletadas nas fazendas de <i>Coffea arabica</i> localizada na cidade de Monte Carmelo, Minas Gerais, Brasil.....	50
Tabela 9. Análises de Metais Pesados do solo das três classes de fazendas localizadas na cidade de Monte Carmelo, Minas Gerais, Brasil.....	54
Tabela 10. Lista de todos os agrotóxicos usados no ciclo de vida de <i>Coffea arabica</i> durante o ano de cultivo de café e suas classificações toxicológicas	54

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA - Análise de Variância

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento do Ensino Superior

CBRO - Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos

CEUA/UFU - Comissão de Ética no uso dos Animais

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

DDT - Dicloro-Difenil-Tricloroetano

DL50 - Dose letal 50%

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

ha. - Hectares

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

IUCN - União Internacional para a Conservação da Natureza

L - Litros

MN - Micronúcleo

mtDNA - DNA Mitocondrial

NCBI - National Center for Biotechnology Information

Ni - Níquel

PCA - Análise de Componentes Principais

OECD - Organização para a Cooperação de Desenvolvimento Econômico

VRQs - Valores de Referência da Qualidade

TMN - Teste de Micronúcleos

SUMÁRIO

RESUMO.....	xiii
ABSTRACT	xix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. <i>Biomonitoramento ambiental</i>	1
1.2. <i>Aves como biomonitoras do ambiente</i>	4
1.3. <i>Poluição ambiental</i>	11
1.4. <i>Consumo mundial de insumos agrícolas</i>	11
1.5. <i>Micronúcleo (MN) como biomarcador de danos ao DNA</i>	14
1.6. <i>Teste de micronúcleo (TMN)</i>	16
1.6.1. <i>Detecção dos MNs nos eritrócitos na hematopoiese</i>	16
1.6.2. <i>Extração da medula óssea vermelha</i>	18
1.6.3. <i>Preparação das lâminas histológicas</i>	19
1.6.4. <i>Coloração</i>	20
1.6.5. <i>Análise das lâminas histológicas</i>	20
1.6.6. <i>Detecção dos MNs nos eritrócitos no sangue periférico</i>	20
1.6.7. <i>Vantagens da utilização da Técnica de Micronúcleo frente a outras abordagens citogenéticas</i>	21
1.6.8. <i>Comparando espécies: abordagem “in silico” para a continuidade ao princípio da facilidade do teste de micronúcleos</i>	22
2. OBJETIVO GERAL	24
2.1. <i>Objetivos específicos</i>	24
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1. <i>Áreas de estudo</i>	25
3.2. <i>Coleta de dados</i>	31
3.2.1. <i>Aves</i>	31
3.2.2. <i>Comparando as espécies de aves em relação à frequência de MN</i> . 31	31
3.2.3. <i>Amostras de sangue, teste de micronúcleo e coloração das lâminas histológicas</i>	32
3.2.4. <i>Avaliação do Micronúcleo (MN)</i>	32
3.2.5. <i>Análises de solo</i>	33
3.2.6. <i>Construindo a árvore filogenética: protocolo básico</i>	33
3.2.7. <i>Análises estatísticas</i>	38

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
.4.1. Comparando diferentes espécies de aves: abordagem “ <i>in silico</i> ”	59
5. CONCLUSÕES	62
6. REFERÊNCIAS.....	64

RESUMO

As aves têm desempenhado um importante papel como bioindicadoras ambientais sendo que diferentes espécies podem ser úteis devido à sua capacidade de bioacumulação. O teste de micronúcleo é uma técnica usada para avaliar a genotoxicidade e a clastogenicidade de diferentes substâncias sendo considerado também um biomarcador de danos ao DNA. O presente estudo analisou a comunidade de aves do Cerrado, especialmente a eficiência do Tiziú (*Volatinia jacarina*) em responder a contaminação de agrotóxicos *in situ*, em relação a fazendas de café de diferentes tamanhos, localizadas na região sudeste do Brasil. O estudo propõe também uma abordagem *in silico* na construção de uma árvore filogenética, baseada no gene COI, visando sobretudo comparar espécies de aves mais próximas na escala evolutiva. Os objetivos específicos do trabalho foram (a) caracterizar uma coorte da comunidade de aves do Cerrado como indicadoras ambientais associada ao uso de agrotóxicos realizando teste de micronúcleos nos eritrócitos periféricos das aves; (b) analisar se a frequência de micronúcleo está relacionada com a guilda alimentar das aves; (c) verificar relações alométricas entre as aves e a frequência de MN; (d) construir com uma ferramenta da bioinformática, uma árvore filogenética baseada no mtDNA como forma de melhor comparar, em termos evolutivos. As aves foram coletadas em fazendas dentro de três grupos (pequenas, médias e grandes) localizadas em Monte Carmelo, Minas Gerais, Brasil. Todas as fazendas utilizam as mesmas classes de agrotóxicos, mas com um progressivo aumento da concentração ou frequência de aplicação. Amostras de sangue foram coletadas de todos os indivíduos registrados através da veia metatarsal com o auxílio de uma agulha e seringa de tamanhos compatíveis. Em seguida, uma ou duas gotas de sangue foram colocadas na lâmina histológica para realizar as técnicas de coloração. Oitenta e dois indivíduos pertencentes a 21 espécies presentes em 11 famílias foram encontradas em todas as áreas de estudo e foram utilizados para avaliar a frequência de micronúcleos (MN). Duzentos e cinquenta e dois MN foram encontrados em nas áreas de estudo. A contagem média de MN foi de 3/10.000 eritrócitos e, 17,1% de todas as aves não exibiram MN. A média de MN foi de $1,29 \pm 0,69$ nas fazendas pequenas, $2,59 \pm 1,65$ nas fazendas médias e $5,41 \pm 1,34$ nas fazendas de grande porte. As fazendas pequenas contabilizaram 14,3% da frequência de MN, as fazendas médias somaram 27,8% e as fazendas de grande porte 57,9% da frequência de MN. As comparações *in silico* foram realizadas construindo uma árvore filogenética baseada em uma sequência gênica para 20 das 21 espécies amostradas em campo. Sete espécies não apresentaram frequência de MN mas não foi possível descartá-las de serem potenciais biomonitoras. Contrariamente, *Leptotila rufaxilla*, *Volatinia jacarina*, *Galbula ruficauda*, *Gnorimopsar chopi*, *Molothrus bonariensis*, *Passer domesticus*, *Turdus leucomelas* e *Turdus rufiventris* exibiram seis ou mais micronúcleos por 10 mil eritrócitos e são, certamente, espécies com alto potencial de uso ao biomonitoramento ambiental. A frequência de MN nos eritrócitos foi positivamente correlacionada com o uso de uma mistura de agrotóxicos de forma

tamanho-dependente as fazendas de cafés. Mesmo apresentando uma discreta relação negativa entre a frequência de micronúcleos e os dados morfométricos das aves, especialmente o comprimento do bico, não foi encontrada nenhuma correlação estatisticamente significativa. Devido a alta diversidade de espécies de aves encontradas no Brasil, propõe-se uma ferramenta alternativa para agrupar diferentes espécies na mesma análise apenas para auxiliar nas pesquisas que necessitam de uma coleta de dados rápida e econômica, como é o caso do biomonitoramento ambiental usando o teste de micronúcleos, uma vez que um dos princípios da técnica é de ser justamente rápida, barata e o mais simples possível. Portanto, um grande esforço amostral violaria esses princípios. *V. jacarina* foi a espécie mais frequentemente encontrada e exibiu uma resposta sensível a contaminação ambiental. Sendo assim, as aves como biomonitoras permanecem eficientes em detectar poluentes ambientais, especialmente agrotóxicos. *V. jacarina* atuou como um biomonitor sensível exibindo uma resposta área-dependente para os agrotóxicos usados nas fazendas de cafés.

Palavras-chave: agrotóxicos, biomarcadores, genotoxicidade, *Volatinia jacarina*, árvore filogenética, aves do Cerrado.

ABSTRACT

Birds have often played an important role as environmental bioindicators, and different species can be useful due to their bioaccumulating capacity. The micronuclei test is a cytologic technique used for accessing DNA and is a biomarker for damage to DNA. This study analysed the Cerrado avian community, especially the efficiency of the blue-black grassquit (*Volatinia jacarina*) in response to pesticide contamination *in situ* on different-sized coffee farms in southeast Brazil, we proposed an *in silico* approach to build a phylogenetic gene tree based on the COI gene, owing, especially, to compare the species of the birds most related. The specific aims of the work were (a) to feature a set of community of birds of the Cerrado as environmental indicators associated with pesticides uses performing the erythrocytes micronuclei test of the birds; (b) to assess if the micronuclei frequency was related with the trophic guild of the birds; (c) to verify allometric relationships between birds and the MN frequency; (d) to build with bioinformatics tools, a phylogenetic gene tree based on mtDNA with a better way to compare, evolution assumptions. The birds were captured in three group sizes of farms located at Monte Carmelo, Minas Gerais, Brazil. All farms use the same classes of pesticides but with a progressive increase of concentration and frequency of application. Blood samples were collected in all birds collected via the metatarsal vein with a needle and a syringe of appropriate size. After that, one or two drops of blood were smeared on a slide to perform the staining techniques. Eighty-two individuals of 21 bird species belonging to 11 families that were found in all study areas were used to evaluate micronuclei (MN) frequency. Two hundred and fifty-two MN were counted in every area of the study. The MN average count was 3/10,000 erythrocytes, and 17.1% of all bird species exhibited no MN. The average MN was 1.29 ± 0.69 in small farms, 2.59 ± 1.65 in medium farms, and 5.41 ± 1.34 in large farms. Small farms accounted for 14.3% of MN frequency, medium farms 27.8%, and large farms 57.9%. *V. jacarina* was the most abundant species found and displayed a sensitive response to environmental contamination. Pesticides appear to induce MN formation in a dose-dependent way when farms are analysed according to their area. Therefore, biomonitoring birds remains an efficient means to detect environmental pollutants, especially pesticides. *V. jacarina* responds as a sensitive biomonitor, showing a dose-dependent response to pesticides used in coffee farms. Due to the high diversity of birds in Brazil, we propose an alternative tool to cluster different species of birds in the same analysis just to help in researches the need of a cheap and fast data collection, as with the case of environmental biomonitoring using the MN test, as the principle technique, being faster and cheaper than possibly before. Therefore, a huge sample effort would violate these principles. *V. jacarina* was the specie most frequently sampled and showed a sensitive response to environmental contamination. Moreover, birds as biomonitor remain efficient in detection of environmental pollutants, especially pesticides. *V. jacarina* acted as a sensitive biomonitor, showed a size-dependent response to pesticides used in the coffee farms.

Keywords: pesticides, biomarkers, genotoxicity, *Volatinia jacarina*, phylogenetic tree, birds of the Cerrado.

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Biomonitoramento ambiental*

A capacidade de manejo dos ecossistemas está intimamente relacionada com o entendimento que se tem sobre a estrutura e funcionamento das comunidades biológicas bem como dos fatores abióticos que se interagem com as comunidades em determinada área. Há, portanto, diferentes atributos ambientais que devem ser analisados para que haja uma possibilidade de melhor aplicação das teorias ecológicas para intervir da melhor forma possível no ambiente (PRETTI; COGNETTI-VARRIABLE, 2001; BEGON et al., 1996).

Uma importante forma de adquirir conhecimentos ecológicos e sobre potenciais poluidores ambientais de determinada área ou ecossistema consiste em monitorar diferentes parâmetros ambientais. Spellerberg (1991) descreve que monitoramento ambiental implica em mensurar temporalmente diferentes variáveis e processos que estão relacionados com um problema em particular. Ao mensurá-las, portanto, várias ações podem ser tomadas caso haja necessidade de intervenções para melhoraria da qualidade ambiental. Embora seja esclarecedora e útil a coleta de variáveis físico-químicas para realizar o monitoramento ambiental, tais coletas sistemáticas ao longo do tempo tornam o estudo dispendioso economicamente. Outro fator negativo é que a análise de uma variável é estática. Em outras palavras, os parâmetros ali estabelecidos refletem um específico momento no tempo e espaço em que a coleta foi realizada. Então, para verificar quaisquer alterações ou realizar inferências, novas coletas físico-químicas devem ser realizadas mediante repetições da amostra no tempo.

Uma alternativa importante para contornar o problema da estática das análises e diminuir os gastos do monitoramento ambiental é utilizar um monitor biológico do ambiente. Realizar o monitoramento através de um monitor biológico, ou seja, biomonitorar o ambiente consiste na utilização regular e sistemática de um

organismo para avaliar as mudanças ou a qualidade ambiental (CAIRNS; VAN DER SCHALIE, 1980). Outra vantagem da utilização de seres vivos em relação ao monitoramento das variáveis físico-químicas é que, biomonitoras podem (bio)indicar efeitos químicos em concentrações sub-analíticas ou após a exposição aos elementos químicos (PRETTI; COGNETTI-VARRIABLE, 2001).

Os primeiros dados da utilização de indicadores biológicos ou bioindicadores remontam do início do século XVII (MORRISON, 1986) e os trabalhos científicos pioneiros reportados na área avaliaram os movimentos migratórios de animais para promover esclarecimentos sobre as alterações ambientais. Clements (1920) demonstrou que as plantas poderiam ser utilizadas como indicadoras de processos físicos, alterações no solo e outros fatores. Posteriormente, foram determinados, com sucesso, indicadores de qualidade da água (RAPPORT, 1992) e ar, como no caso do “canário na mina” (BURRELL; SIEBERT, 1916), utilizado como bioindicador de concentração de gases tóxicos aos mineradores.

Bioindicadores, portanto, são parâmetros bióticos capazes de avaliar os estados patológicos e fisiológicos de indivíduos ou populações (KUMAR, 2009). Esses indicadores podem então contribuir diretamente para detectar, quantificar e entender o significado de exposições químicas nos ecossistemas (FRY; DUNBAR, 2007). Assim, eles constituem uma das principais ferramentas para avaliar as condições ambientais (NIEMI; McDONNALD, 2004).

Os biomonitoras geralmente detectam variações nas populações, comunidades e até ecossistemas inteiros por meio de uma análise dos próprios indivíduos que as compõem (PRETTI; COGNETTI-VARRIABLE, 2001; CALLISTO; GONÇALVES; MORENO, 2004). Então, qualquer modificação negativa ocorrida em nível específico poderá afetar as populações que as compõe, bem como em alguns casos o ecossistema como um todo (BEGON et al., 1996). Efeitos genotóxicos ocorridos podem levar a diferentes alterações nos indivíduos de determinada população, como, por exemplo, mudanças comportamentais (PEREIRA et al., 2016). Portanto, se as populações podem ser afetadas, mediante desajustes no DNA por atuação de efeitos clastogênicos, os níveis ecológicos superiores também poderão sofrer alterações negativas (Figura 1). Nesse sentido,

quanto mais cedo detectar as mudanças que poderão afetar os indivíduos de determinadas populações mais fácil e efetivo serão as intervenções ao problema ambiental. Uma população inteira não precisa ser extinta localmente para que se tome conhecimento de problemas ambientais.

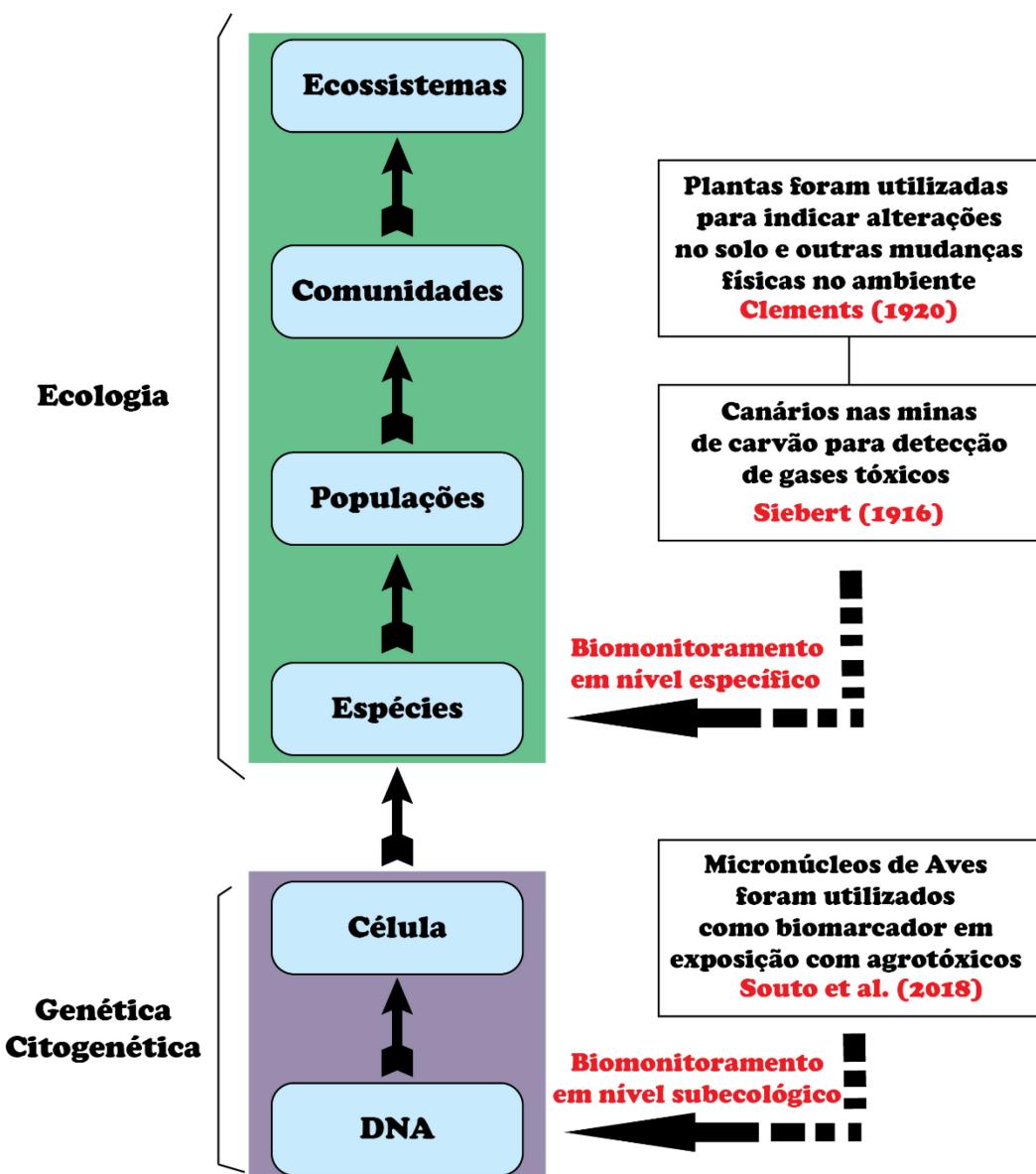


Figura 1. Diferentes níveis de atuação do biomonitoramento ambiental tanto em nível específico, como por exemplo os trabalhos clássicos de Siebert (1916) e Clements (1920) quanto estudos atuando em níveis subecológicos, como por exemplo no estudo de Souto et al. (2018) com biomarcadores genotóxicos.

Há, portanto, como demonstrado acima, diferentes formas de biomonitorar o ambiente em diferentes níveis ecológicos (espécies e populações). No entanto, uma abordagem infraecológica nos últimos dez anos tem sido utilizada para avaliar organismos de diferentes espécies (plantas e animais) e, então, detectar danos ao DNA por meio de ensaios citogenéticos, especialmente o Teste de Micronúcleo - TMN, em plantas (CAMPOS-JÚNIOR; KEER, 2009; PEREIRA, CAMPOS-JÚNIOR E MORELLI, 2013; PEREIRA; MORELLI, 2013; CAMPOS et al., 2015; CAMPOS et al., 2016), peixes (AL-SABIT, 1995; AL-SABIT; METCALF, 1995, ANDRADE et al., 2004, GALINDO; MOREIRA, 2009, MALIK; GANIE, 2011, MORAIS et al., 2016), anfíbios (FERNANDEZ; L'HARIDON, 1992; HATCH; BURTON, 1998; SALEH; ZEYTNOKLU, 2001; MARQUIS et al., 2006), mamíferos (DUTTA; BAHADUR., 2016; TORREZ-BUGARIN, 2014 e aves (STONCIUS, 2003; KURSA; BEZRUKOV, 2007; PINHATTI et al., 2006; SHEBL et al., 2010; BAESSE et al., 2015; SOUTO et al., 2018; BAESSE et al., 2019). Micronúcleos, portanto, são considerados biomarcadores de danos ao DNA correlacionados a exposição à agentes químicos.

As interações entre organismos e ambiente representam um fator-chave na compreensão da relação entre saúde e doenças COLBORN 2006; GOMES et al. 2017). Portanto, a exposição a diferentes classes de agentes estressores interfere e desajusta a homeostasia celular conduzindo o organismo a adaptação, modificações comportamentais ou fisiológicas, ou a morte (BEGON 2007; KUNC 2016).

1.2. *Aves como biomonitoras do ambiente*

As aves têm desempenhado um importante papel como bioindicadores ambientais desde a clássica utilização de canários, utilizados pela primeira vez nas minas de carvão para a detecção de monóxido de carbono (BURRELL; SIEBERT 1916), e predadores como aves de rapina foram analisadas como biocumuladoras de agrotóxicos na década de 60 (MOORE, 1965).

As aves ocupam diferentes níveis tróficos e, em muitos ecossistemas são consideradas predadoras de topo. Sendo assim, podem acumular algumas

substâncias como metais pesados e agrotóxicos advindos de sua alimentação ou por meio da exposição ao ambiente contaminado. De fato, historicamente, o declínio de aves de rapina foi correlacionado com a utilização de inseticidas organoclorados que foram encontrados principalmente na gordura e nos ovos de *Falco peregrinus*, já considerada em risco de extinção, mas atualmente entrou na lista de espécie de menor preocupação pela União Internacional para a Conservação da Natureza - IUCN (WITECK, 1988; BIRDLIFE INTERNATIONAL, IUCN, 2016). A preservação de espécies de topo é importante para a manutenção da integridade do ecossistema uma vez que essas espécies atuam como predador-chave, regulando toda rede de interações (BEGON, 1996).

A biocumulação na natureza ocorre em cascata (MARQUES-JÚNIOR et al., 2009) e, portanto, demanda bastante tempo para ser detectada na cadeia trófica. Da mesma forma, a perturbação de ambientes naturais pode ser avaliada em estudos populacionais que indicam a substituição de espécies raras especializadas por espécies abundantes e generalistas (BEGON, 1996). No entanto, esses estudos demandam grande esforço e tempo. Porém, pesquisas com TMN favorecem uma resposta rápida, o que permitiria entender mais rapidamente algumas alterações ambientais influenciadas, por exemplo, por insumos agrícolas. Assim, a tomada de decisão poderá ser mais rápida, favorecendo programas educativos e de manejo ambiental.

O Brasil abriga uma das maiores biodiversidades de aves do mundo com 1.901 espécies registradas (CBRO, 2014) sendo que, em pouco mais de dez anos, somente o Cerrado contava com 837 (44%) dos registros (SILVA, 1995; CAVALCANTI, 1999; SILVA; BATES, 2002). Nas últimas duas décadas, porém, a extinção tem se tornado um componente forte no Cerrado, segundo colocado em número de espécies ameaçadas e endêmicas ameaçadas (MARINI; GARCIA, 2005), uma vez que quase 80% de sua vegetação foi alterada (MYERS et al., 2000). Sendo assim, todos os esforços devem ser concentrados para preservar o restante do bioma, muitas vezes altamente fragmentado.

Exceto por alguns estudos mais recentes conduzidos no Cerrado do Triângulo Mineiro (BAESSE et al., 2015, 2019; SOUTO et al., 2018), a literatura científica relacionada ao biomonitoramento ambiental utilizando a TMN em aves ainda é relativamente escassa. Além do mais, poucos trabalhos foram realizados no próprio ambiente natural (KURSA; BEZRUOKOV, 2007) que estudaram a *Catharacta maccormicki* e *Larus ridibundus* (STONCIUS, 2003), espécies de aves oceânicas não ocorrentes no Brasil. Pinhatti e colaboradores (2006) estudaram *Ara ararauna* (arara-canindé) em cativeiro na cidade de Novo Hamburgo, RS e Shelb e colaboradores (2010) estudaram galináceos para avaliar o efeito citotóxico da aflatoxina, um dos mutagênicos naturais mais potentes registrados. Portanto, verifica-se uma necessidade de realizar estudos que investiguem a ecotoxicidade de ambientes naturais.

O TMN tem sido utilizado para analisar inúmeras substâncias químicas com potencial genotóxico, como metais pesados e agrotóxicos dispersos diretamente no ambiente por diferentes vias. Nota-se que há inúmeras espécies utilizadas como biomonitoras mas, em especial, existem ensaios com exposições controladas de organismos modelos como é o caso de *Tradescantia pallida* (Tabela 1), espécie de planta herbácea perene nativa do México e muito utilizada em projetos paisagísticos urbanos (MBG, 2019).

Segundo relatório de um estudo conduzido internacionalmente em 1999-2000 por diferentes países ligados a OECD (2002) diferentes espécies são utilizadas como biomonitoras. No entanto, peixes constituem-se no principal grupo, seguido das aves, para a detecção da toxicidade de agrotóxicos. Efeitos genotóxicos e mutagênicos relacionados a exposição por agrotóxicos têm sido relatados no mundo todo.

Em um estudo de revisão sobre a genotoxicidade dos agrotóxicos verificou uma associação positiva entre a exposição ocupacional, portanto crônica, a uma mistura de pesticidas e a presença de aberrações cromossômicas, trocas de cromátides-irmãs e micronúcleos para a maioria dos estudos (BOLOGNESI, 2003). Especificamente no Brasil, Jacobsen-Pereira et al. (2018) verificaram os efeitos da exposição de fazendeiros no sul do Brasil a agrotóxicos e encontraram diferenças estatísticas significativas para danos ao DNA em relação ao grupo controle. O tempo médio de exposição foi de $34,64 \pm 16,09$ anos. Benedetti et al. (2013) e (2018)

analisaram 137 trabalhadores expostos a uma mistura de agrotóxicos em fazendas de soja no Rio Grande do Sul, Brasil e, mais uma vez, demonstraram as propriedades genotóxicas e clastogênicas desse grupo de substâncias.

Tabela 1. Diferentes substâncias químicas com efeitos genotóxicos/clastogênicos ou seus veículos de dispersão e seus respectivos biomonitoros ambientais envolvendo Teste de Micronúcleos (TMN) em diferentes espécies.

Autor(es)	Título do trabalho	Substância ou veículo de dispersão	Biomonitor	n-amostral	Dados do artigo
Campos-Júnior; Kerr (2009)	Teste de micronúcleo com <i>Tradescantia pallida</i> aplicado ao Biomonitoramento da qualidade do ar da cidade de Uberlândia.	Poluição atmosférica	<i>Tradescantia pallida</i>	20 inflorescências por ponto	Horizonte Científico, Uberlândia, v. 3, n. 8, p. 1-18, 2009
Pereira; Campos-Júnior; Morelli (2013)	In situ biomonitoring of the genotoxic effects of vehicular pollution in Uberlândia, Brazil, using a <i>Tradescantia</i> micronucleus assay	Poluição atmosférica	<i>T. pallida</i>	20 inflorescências por ponto	Ecotoxicology and Environmental Safety 87 (2013) 17–22
Udroiu et al. (2014)	Micronucleus Test on <i>Triturus carnifex</i> as a Tool for Environmental Biomonitoring	Poluição aquática	<i>Triturus carnifex</i>	23	Environmental and Molecular Mutagenesis 00:00-00 (2014)
Campos et al. (2015)	Biomonitoring of the environmental genotoxic potential of emissions from a complex of ceramic industries in Monte Carmelo, Minas Gerais, Brazil, using <i>Tradescantia pallida</i>	Metais pesados	<i>T. pallida</i>	25 plantas por área	Journal of Toxicology and environmental health, part A. ISSN: 1528-7394 (Print) 1087-2620 (Online) Journal homepage: http://www.tandfonline.com/loi/uteh20

Campos et al. (2015)	Genotoxic evaluation of the River Paranaíba hydrographic basin in Monte Carmelo, MG, Brazil, by the <i>Tradescantia</i> micronucleus	Metais pesados	<i>T. pallida</i>	20 botões florais por área	Genetics and Molecular Biology, (2015) 38(4): 507-512
Baesse et al. (2015)	Micronucleus as biomarker of genotoxicity in birds from Brazilian Cerrado	Poluição atmosférica, solo e água	Aves	103 indivíduos de 21 espécies diferentes	Ecotoxicology and Environmental Safety 115 (2015) 223–228
Morais et al. (2016)	Assessment of water quality and genotoxic impact by toxic metals in <i>Geophagus brasiliensis</i>	Metais pesados	<i>Geophagus brasiliensis</i>	12 indivíduos por área	Chemosphere 152 (2016) 328-334
Souto et al. (2018)	Biomonitoring birds: the use of a micronuclei test as a tool to assess environmental pollutants on coffee farms in southeast Brazil	Agrotóxicos	Aves	82 indivíduos de 21 espécies diferentes	Environmental Science and Pollution Research (2018) 25:24084–24092

Baesse et al. (2019)	Effect of urbanization on the micronucleus frequency in birds from forest fragments	Poluição atmosférica	Aves	354 indivíduos de 50 espécies diferentes	Ecotoxicology and Environmental Safety (2019) 171:631-637
-------------------------	---	-------------------------	------	---	--

1.3. Poluição ambiental

O uso de componentes químicos nas atividades humanas são fatores de estresse causando impacto considerável em muitas espécies de seres vivos (CHAPA-VARGAS et al., 2010). Dentre as substâncias mais prevalentes em nosso meio encontram-se os agrotóxicos, uma importante classe de agentes estressores nas quais as populações mundiais têm sido cronicamente expostas durante anos.

As alterações ambientais têm sido monitoradas fisicamente, quimicamente, biologicamente ou associando essas categorias. No nível celular, a resposta a um agente estressor ou tóxico ocorre de muitas formas, como uma interferência nas vias de sinalização causando uma alteração na atividade celular, as quais podem ser avaliadas mediante biomarcadores mutagênicos (BAESSE et al., 2015).

1.4. Consumo mundial de insumos agrícolas

Insumo agrícola é qualquer classe de substância destinada a ser utilizada nas etapas da cadeia de produção de alimentos na agricultura. Segundo Larini (1999), há várias definições de classes de substâncias, como é o caso de pesticidas, termo genético relacionado ao combate de qualquer espécie considerada praga; defensivo agrícola, que se remete a defender a planta de algum inimigo natural em potencial; e agrotóxicos relacionando todos os produtos químicos utilizados na agricultura de um modo geral. Por se tratar de definições genéricas e arbitrárias, utilizaremos, ao longo do texto, agrotóxicos e pesticidas como sendo sinônimos.

A agricultura mundial está baseada na utilização, em grande quantidade, de diferentes classes de insumos agrícolas como fertilizantes, agrotóxicos e reguladores de crescimento. Uma grande parte desse material é perdida em várias etapas de sua aplicação. Em condições experimentais, por exemplo, a utilização de um componente na forma de calda mostrou uma perda nas aplicações na ordem de 59% a 76% (CHAIM et al., 1999a). Em culturas com

arroz irrigado, as perdas foram de aproximadamente 50% na aplicação de herbicidas (PESSOA; CHAIM, 1999). Culturas de porte arbustivo apresentam perda de agrotóxicos no solo de 35% a 49% (CHAIM et al., 1999b). Agrotóxicos, metais pesados e nitrogênio são as principais fontes poluidoras do solo (FILIZOLA et al., 2002).

Segundo a Organização de Agricultura e Alimentos das Nações Unidas (FAO, 2019) o uso mundial de pesticidas na última cresceu exponencialmente na última década. Parece ter atingido a estabilidade por volta do ano de 2014 com mais de quatro trilhões de toneladas lançadas no ambiente. O salto foi de aproximadamente 1 trilhão de toneladas/ano em uma década (Figura 2).

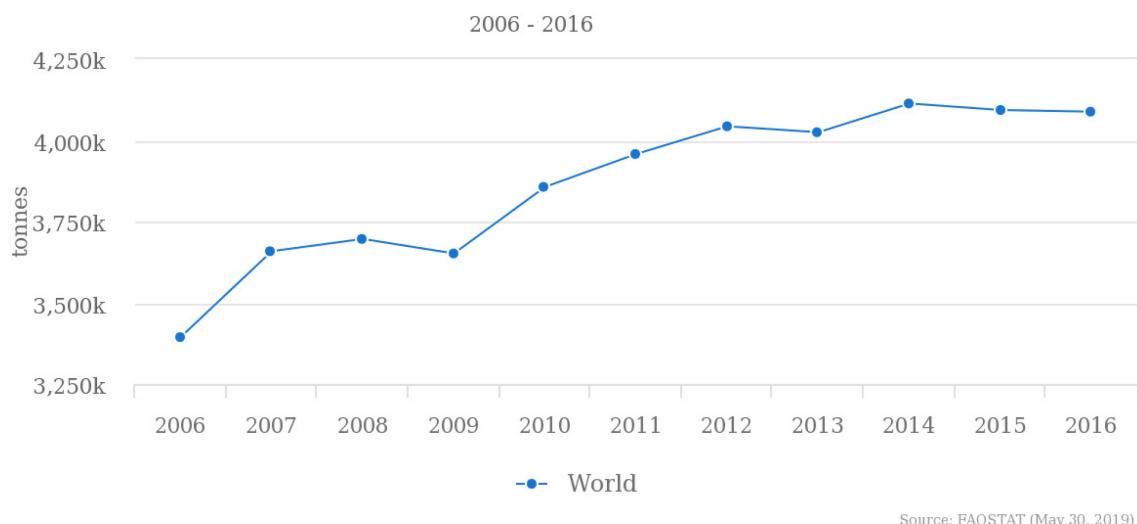


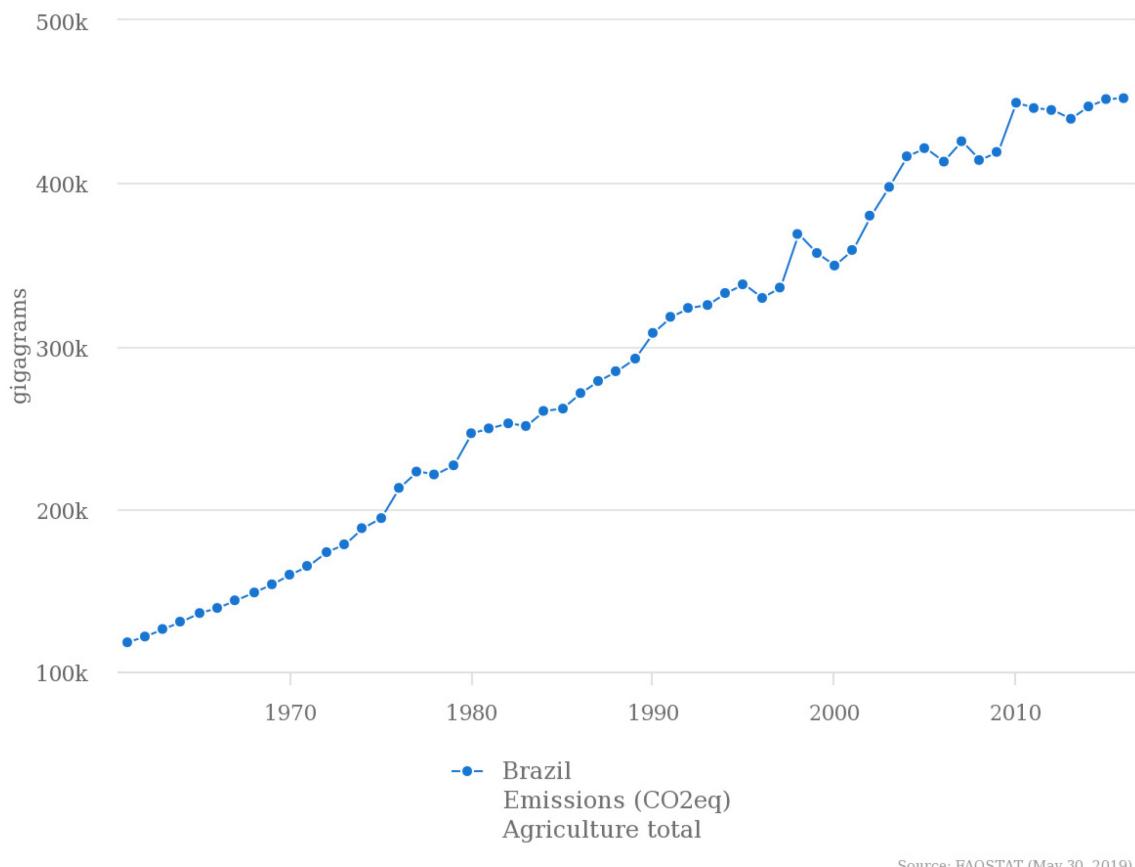
Figura 2. Crescimento mundial de pesticidas na última década. Os valores do eixo “y” indicam consumo em trilhões. O uso médio saltou de pouco mais de 3 trilhões de toneladas/ano para aproximadamente 4 trilhões de toneladas/ano. Fonte: FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations (2019). Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/RP/visualize>> Acesso em: 30 de maio de 2019

Somente a Ásia, fortemente influenciada pela China, contribui com o consumo de mais de dois trilhões de toneladas anualmente (53,9%) do consumo mundial médio, seguido pelas Américas (30,9%), com aproximadamente dois trilhões de toneladas anuais. Sem dúvidas, a maior influência nas Américas é o Brasil, terceiro maior consumidor mundial de pesticidas, com média anual de aproximadamente 339 milhões de toneladas/ano. No entanto, o último ano de

censo (2016) o Brasil consumiu aproximadamente 378 milhões de toneladas (FAO, 2019).

Herbicidas e inseticidas constituem-se nas classes de pesticidas mais utilizadas no Brasil, contando com média anual de aproximadamente 200 milhões e 63 milhões de toneladas, respectivamente. Fungicidas e bactericidas também contam com expressiva utilização, com aproximadamente 43,5 milhões de toneladas/ano. Sendo que, para essas classes de componentes, o Brasil ocupa o primeiro lugar no ranking mundial (FAO, 2019).

As emissões de carbono, de 1961 a 2016, na agricultura brasileira triplicaram nesse período (Figura 3), e sugerem uma crescente ocupação e uso do solo (FAO, 2019). Os efeitos da fragmentação do habitat são extremamente negativos, podendo acarretar perdas importantes na biodiversidade, fragmentação das populações, extinção local e etc. (BEGON et al., 2003).



Source: FAOSTAT (May 30, 2019)

Figura 3. Emissão de dióxido de carbono (CO2 eq) na produção agrícola brasileira no período de 1961 a 2016. Fonte: FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations (2019). Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#compare>> Acesso em: 30 de maio de 2019.

1.5. *Micronúcleo (MN) como biomarcador de danos ao DNA*

Aparentemente o termo que se remete a micronúcleo (MN) apareceu, pela primeira vez, como um termo médico no final do sec. XIX. Howell e Jolly encontraram pequenas inclusões no sangue obtidos de gatos e ratos e perceberam, também, que em pacientes com anemia severa, eles também eram encontrados nos eritrócitos do sangue periférico (HAYASHI, 2016). O termo MN em si aparece, então, na literatura científica, no início da década de 50, para explicar, genericamente, fragmentos do núcleo, em um estudo sobre aberrações cromossômicas induzidas por radiação ionizante na raiz da Leguminosa *Vicia faba* (THODAY, 1951). Ainda no final da década de 50, os MNs foram utilizados como monitores da incidência de radiação gama em *V. faba* (EVANS; NEARY; WILLIAMSON, 1959).

Desde então, os MN têm sido utilizados como biomarcadores de genotoxicidade e instabilidade cromossômica, amplamente reconhecidos, após

protocolos para seus estudos serem mais bem estabelecidos por Boller e Schmid (1970). Desde então, eles têm demonstrado uma plasticidade enorme na utilização em testes de genotoxicidade e clastogenicidade para uma série de substâncias como os recém-elaborados nanomateriais (GONZALES; KIRSCH-VOLDERS, 2016); efeito da exposição à agrotóxicos em seres humanos (JACOBSEN-PEREIRA, et al., 2018; RUIZ-GUZMÁN et al., 2017) e em aves nativas (SOUTO, et al., 2018); e até no biomonitoramento ambiental para uma substância muito conhecida mas pouco estudada como potencial poluidora do meio ambiente como é o caso da cocaína (PAROLINI et al., 2017) ou para uma série de poluentes lançados como efluentes (CAMPOS et al., 2015; MORAIS et al., 2016); poluição atmosférica (CAMPOS et al., 2016); utilização de larvicidas no combate ao mosquito *Aedes aegypti* (PEREIRA et al., 2016), dentre outros.

Os MN originam-se de cromossomos inteiros ou de fragmentos de cromátides (SCHMID, 1973, 1975; NORPPA; FALCK, 2003) durante o ciclo celular (Figura 4). Schmid (1973) e (1975) já tinham descrito que, embora o micronúcleo seja visualizado no final da divisão celular, na telófase, sua formação estaria ligada a retardos nos fragmentos cromossômicos e cromátides cêntricas pela dificuldade dos microtúbulos do aparelho mitótico em se prender apropriadamente no cinetócoro do centrômero (TERRADAS et al., 2010). Assim, em continuidade do ciclo celular, após reformação da carioteca, cromossomos não danificados e fragmentos cêntricos dão lugar a um núcleo filho regular e, os elementos que sofreram retardo também são incluídos na célula-filha formando um ou mais núcleos menores denominados de micronúcleos (SCHMID, 1973, 1975, TERRADAS et al., 2010).

Formação de micronúcleo (Schmid, 1975)

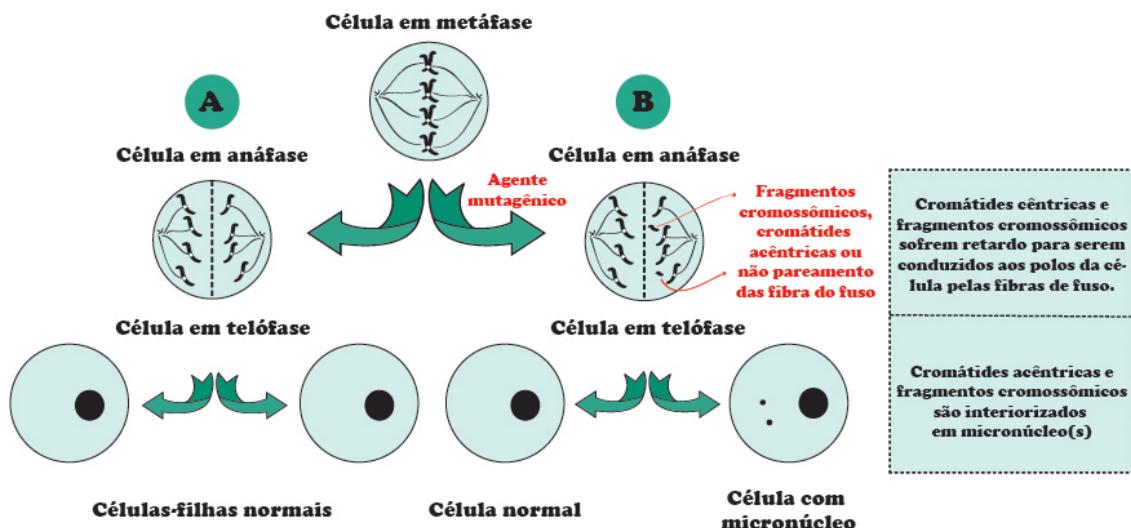


Figura 4. Formação de micronúcleo no processo de divisão celular. Em “A” divisão em duas células-filhas normais e em “B”, na presença de um agente mutagênico a divisão resultou em uma célula normal e em outra com a presença de dois micronúcleos. O procedimento explicado em “B” foi descrito por Schmid (1975). Fonte: Autor.

Os experimentos clássicos de Schmid (1975) com mamíferos (hamster chinês, *Cricetulus griseus* L.) verificaram que o principal grupo de células presentes na medula óssea de mamíferos nas quais os micronúcleos (MN) podem ser mais facilmente evidenciados eram os eritroblastos. No entanto, embora a visualização seja mais difícil e comprometida pela presença de núcleos lobados, os MN também podem ser vistos nos mieloblastos e mielócitos.

Segundo Heddle e Salamone (1981) em mamíferos os eritrócitos maduros não contêm núcleo que são expelidos após sua formação na medula óssea entre 8-12h após sua mitose. Por razões ainda desconhecidas os micronúcleos permanecem no eritrócito, o que facilita sua visualização na célula.

1.6. Teste de micronúcleo (TMN)

1.6.1. Detecção dos MNs nos eritrócitos na hematopoiese

O Teste de Micronúcleo (MNT) *in vivo* (BOLLER; SCHMID, 1970) foi inicialmente concebido para triar agentes químicos com efeitos clastogênicos nos cromossomos (Figura 5). Os primeiros testes foram conduzidos em cobaias (hamster chinês, *Cricetulus griseus* L.), espécie escolhida por apresentar baixo número cromossômico ($2n=22$) o que contribui para diminuir o grau de dificuldade das análises citogenéticas, grande motivador para a utilização do MNT em relação as técnicas anteriores para verificação de clastogenicidade e genotoxicidade.

Os procedimentos técnicos desenvolvidos por Boller e Schmid (1970), Schmid et al. (1971) e Schmid (1975) consistiam em tratar animais, via oral ou intraperitoneal, com substâncias com efeitos clastogênicos, ou desconhecidas, para as quais se deseja verificar se possui efeitos clastogênicos e aneugênicos. Tais tratamentos objetivam submeter a maior população de células à substância testada durante dois ciclos celulares (SCHMID, 1973).

Em condições experimentais, as clássicas formas de testar uma determinada substância consistiam em basicamente três formas de realizar o desenho experimental. A primeira compreendia um único tratamento dose-dependente com uma série de amostras retiradas em diferentes intervalos (HEDLLE, 1973); a segunda em realizar dois tratamentos sendo o primeiro 30h e o segundo 6h antes da extração de uma única amostra (MATTER; SCHMID, 1971) e, por fim, a pesquisador realizava cinco dias de tratamento sendo o último poucas horas antes da amostragem (BRUCE; HEDLLE, 1979). Como verificado posteriormente por Heddle e Salamone (1981) administrações de substâncias no intervalo de 8-12h não surtem efeitos na frequência de micronúcleos nos eritrócitos uma vez que seus núcleos são expelidos após sua formação dentro desse intervalo de tempo. Dessa forma os autores sugeriram mudanças nos protocolos evitando perdas de recursos e tempo. Além disso, eles concluíram que não existe um único tempo responsável por aumentar a sensibilidade do teste para diferentes substâncias. Verificaram também que, como era esperado, para nem todas as substâncias testadas a frequência de micronúcleos

aumentava na mesma taxa e, administrações consecutivas de substâncias aumentava a frequência de micronúcleos e, portanto, a sensibilidade do ensaio, embora existisse casos raros em que duas aplicações reduziram a taxa de micronúcleos.

Posteriormente Heddle e Salamone (1981) começaram a utilizar um protocolo em duas fases envolvendo a retirada de múltiplas amostras. Então a LD_{50%,7} (Dose letal da substância responsável por reduzir em 50% o número inicial de cobaias no experimento no intervalo de 7 dias) era estabelecida e, a primeira fase o tratamento consistia em duas injeções intraperitoneais de uma substância com 24h de intervalo entre elas na mais alta dose possível da substância (80% da LD_{50%,7}) com o intuito de maximizar a resposta da substância. Então as amostras de medula eram coletadas após 48h, 72h e 96h da primeira injeção. Em caso de resposta positiva, comparada com o controle negativo, um segundo teste era realizado. Caso a resposta desse teste fosse igual a do primeiro teste, a substância utilizada era confirmada como positiva para clastogenicidade/genotoxicidade. Em seguida, um terceiro teste, controle negativo era realizado de caráter decisivo para confirmar ou não o efeito positivo da substância.

Desde 1997 o TMN entrou para as Diretrizes da Organização para a Cooperação de Desenvolvimento Econômico (OECD – sigla em inglês) para realização de testes em produtos químicos as quais exibem um conjunto de especificações internacionalmente. Nessas diretrizes o TMN intitulado de Teste de Micronúcleos em Eritrócitos de Mamíferos [tradução livre] é especificado mediante um protocolo baseado nos estudos científicos, em especial nos trabalhos de Schmid e colaboradores desenvolvidos na década de 70 (OECD, 2016).

1.6.2. *Extração da medula óssea vermelha*

Originalmente o TMN foi desenvolvido para avaliar eritrócitos presentes na medula óssea e não na circulação sanguínea (Figura 5), embora o segundo caso tenha sido o método escolhido para avaliar a frequência de MN na presente

tese. A técnica original consiste em tratar as cobaias, extrair a medula óssea, separar os eritrócitos por centrifugação 1.000x/min.) durante cinco minutos, retirar o sobrenatante e preparar a lâmina com as células contidas no corpo de fundo (SCHIMID et al., 1971; SCHMID, 1975).

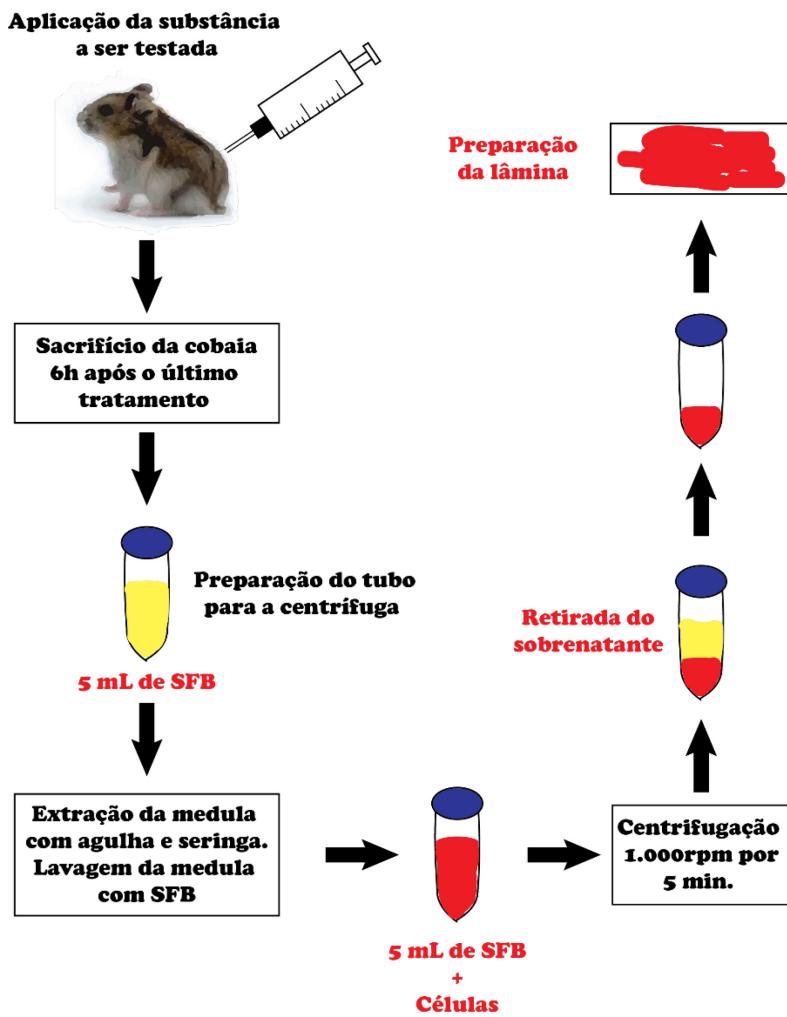


Figura 5. Etapas do Teste de Micronúcleos originalmente proposto por Boller e Schmid (1970) e ajustado posteriormente nos anos seguintes. Fonte: Autor.

1.6.3. Preparação das lâminas histológicas

A lâmina é preparada com uma gota do material que é depositado na porção final de uma lâmina histológica limpa espalhando-o com auxílio de outra lâmina em um ângulo de 45º. O material é então separado para secar a temperatura ambiente.

1.6.4. Coloração

Segundo Schmid (1975) os melhores resultados de coloração são obtidos no dia seguinte da secagem das lâminas histológicas e, caso de coloração no mesmo dia as lâminas podem ser rapidamente flambadas no bico de Bunsen. Em seguida as lâminas são dispostas na bandeja para coloração de lâminas na posição vertical imersas em solução de May-Gruenwald 100% por três minutos, transferidas para a mesma solução diluída com água destilada (1:1) por dois minutos. Em seguida, as lâminas são imersas em solução de Giemsa diluída em água destilada (1:6) por dez minutos, enxaguadas em água destilada, secas em papel filtro, limpas em metanol (porção inferior da lâmina); limpas em xileno por cinco minutos e montadas com a lamínula.

1.6.5. Análise das lâminas histológicas

O primeiro passo para a análise das lâminas histológicas consistia em focar em uma região da lâmina com melhor qualidade onde as células estivessem dispostas mais espalhadas, bem coradas e sem danos aparentes. Então, um total de 2.000 a 5.000 eritrócitos eram examinados (magnificação 1.000x) buscando por micronúcleos, um ou mais por célula. Em condições laboratoriais a ordem de frequência de micronúcleos no controle foi de 3/1.000 e, um número igual para artefatos de várias origens encontrados nas lâminas.

1.6.6. Detecção dos MNs nos eritrócitos no sangue periférico

No início da década de 80 MacGregor, Werl e Gould (1980) realizaram experimentos e perceberam que os MNs, ao contrário do que se esperava, eram encontrados também nos eritrócitos presentes no sangue periférico. Eles perceberam que a incidência de MN nos eritrócitos da corrente sanguínea era um reflexo da extensão da clastogênese na medula óssea. A frequência de MN na corrente sanguínea aumentava um dia após a detecção de aumento da frequência de MN na medula óssea. Então, os autores perceberam que o TMN poderia ser melhorado e, como consequência da utilização do sangue ao invés da medula óssea, o teste também poderia ser simplificado uma vez que uma única gota de sangue poderia prover milhares de células a serem analisadas; repetidas amostras poderiam ser facilmente obtidas de um único animal sem a necessidade de causar muitos danos ou sacrificar a cobaia. O mais interessante é que apenas a preparação da lâmina com a gota de sangue e sua consequente coloração deveria ser realizada sendo, portanto, desnecessárias a remoção do osso, suspensão da medula óssea e a centrifugação para a obtenção dos eritrócitos.

1.6.7. Vantagens da utilização da Técnica de Micronúcleo frente a outras abordagens citogenéticas

Schmid (1973) compara o TMN com um dos testes mais convencionais utilizados para detecção de danos cromossômicos (*metaphase scoring*) descrevendo importantes vantagens. Embora o TMN seja menos específico sua aplicabilidade possui maior rapidez e facilidade na preparação bem como maior confiabilidade na leitura das lâminas histológicas; sensibilidade alta do teste; o teste é independente do cariotípico, diferentes espécies de mamíferos podem ser

comparadas; o teste também é capaz de revelar distúrbios no aparelho mitótico que resulta em perda cromossômica.

1.6.8. Comparando espécies: abordagem “in silico” para a continuidade ao princípio da facilidade do teste de micronúcleos

Como o Brasil abriga uma das maiores biodiversidades de aves do mundo contando com 1.901 espécies registradas (CBRO, 2014) torna-se, um grande desafio estudos populacionais que visem, portanto, a amostragem de apenas uma espécie de ave no ambiente natural. Os trabalhos de Schmid et al. (1971), Schmid (1975) os pioneiros em desenvolver o TMN bem como autores subsequentes até culminar com o protocolo para o teste de micronúcleos em eritrócitos de mamíferos elaborado pela OECD (2016) sugerem, para cobaias, um número de pelo menos cinco indivíduos a serem testados para cada tratamento, número mínimo concordado pela maioria dos autores, inclusive para estudos em ambientes pouco controlados que usaram cinco galinhas (*Gallus domesticus*) por tratamento (SALEH; SARHAN, 2007); média de seis peixes e camundongos analisados (GRISOLIA, 2002) e, estatisticamente possível de realizar comparações matemáticas (GOTELLI; ELLISON, 2004)

Schmid (1973) aponta algumas vantagens da utilização do TMN sendo as principais: (1) a preparação das lâminas para a leitura é fácil, rápida e mais confiável do que os métodos anteriores desenvolvidos; (2) extremamente sensível às substâncias testadas e (3) podendo ser analisadas um número grande de células e, (4) o teste é independente do cariotípico, ou seja, diferentes espécies poderiam ser comparadas facilmente. Heddle (1973), por fim (5) ainda complementa que a facilidade de leitura das lâminas geralmente dispensa um conhecimento aprofundado da técnica em si. Então, a relativa facilidade metodológica do TMN, combinada com a agilidade da confecção das lâminas e a possibilidade da técnica ser aplicada e analisada até mesmo por não especialistas em citogenética conduz, portanto, a um enorme potencial de utilização da técnica. Nesse sentido, sugere-se mais uma ferramenta para o biomonitoramento ambiental, como já tem sido utilizada em muitos casos

importantes de serem retratados (CAMPOS JÚNIOR; KERR, 2005; PEREIRA; MORELLI, 2013; CAMPOS et al., 2015; SOUTO et al. 2018).

A diversidade de espécies dificultaria, portanto, a relativa facilidade da técnica uma vez que se deve empregar um grande esforço amostral para adquirir um número mínimo de indivíduos, da mesma espécie, estatisticamente testáveis. Embora seja possível agrupar o taxa como um todo para realizar comparações, a alternativa mais viável, portanto, baseada em relações evolutivas, seria comparar espécies que sejam mais parentadas entre si, perfeitamente plausível visto que as espécies possuem sempre um ancestral comum e todas derivaram de uma única espécie inicialmente como, brilhantemente demonstrado por Darwin (1859). Esse é o mesmo princípio que justifica a utilização de cobaias não humanas para estudos diversos que extrapolam os resultados para os seres humanos.

A comparação entre as diferentes espécies tem utilizado, nos últimos 50 anos, muito mais dados moleculares, sequências gênicas, proteicas, etc., do que relações baseadas em características anatômicas (SZÖLLOSI et al., 2015) a ponto de se vislumbrar a construção de uma árvore da vida universal, contendo todas as espécies descritas (WOOSE, 2000). Cada gene, portanto, reflete uma única história de vida, mesmo não podendo enxergar todos os passos evolutivos de uma espécie, de certa forma, reflete isso.

Embora inicialmente a construção de árvores filogenéticas objetivavam demonstrar as relações de parentesco entre diferentes espécies por meio de uma topologia de fácil visualização das relações evolutivas (BOS; POSADA, 2005), propõe-se, nessa tese, uma aplicação para o uso da filogenia com a construção de uma árvore filogenética baseada em uma sequência gênica (*gene tree*) como ferramenta para facilitar a comparação de espécies em trabalhos que utilizem testes de micronúcleos como avaliação ambiental, ligando assim as áreas da genética aplicada, evolução e ecologia visando a produção de uma ferramenta rápida e segura para o biomonitoramento ambiental, frente as enormes pressões ambientais ocorridas nos últimos anos.

2. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo geral analisar os efeitos clastogênicos/aneugênicos/genotóxicos dos agrotóxicos utilizados em plantações de café (*Coffea arabica*) sobre as comunidades de aves nativas do Cerrado por meio do teste de micronúcleos em eritrócitos. Testou-se aqui, portanto, a hipótese da resposta das aves frente a exposição aos agrotóxicos: (a) todas as espécies amostradas respondem, produzindo micronúcleos, com a mesma frequência? Há espécies com maior ou menor potencial para biomonitoramento?

2.1. *Objetivos específicos*

- Caracterizar uma coorte da comunidade de aves do Cerrado como indicadoras ambientais associada ao uso de agrotóxicos realizando teste de micronúcleos nos eritrócitos periféricos das aves; testa-se a hipótese de que nem todas as aves têm a mesma potencialidade como biomonitora aos agrotóxicos analisados;
- Investigar a associação entre dados morfométricos das aves e a frequência de micronúcleos; testa-se aqui a hipótese de que com o aumento da frequência de micronúcleos há maior gasto energético pelo sistema circulatório e baço das aves para eliminar as células danificadas, reduzindo alguma característica das aves pelo deslocamento energético e *tradeoff* entre as variáveis;
- Analisar se a frequência de micronúcleo está relacionada com a guilda alimentar das aves; testa-se aqui a hipótese de que aves insetívoras estariam mais sujeitas à contaminação por agrotóxicos do que aves em outros grupos alimentares;
- Analisar a eficiência do tiziú (*Volatinia jacarina*) como biomonitora ambiental; testa-se a hipótese de que, pela grande abundância e

- distribuição da espécie no Brasil, sua facilidade de identificação, a espécie seria boa candidata a ser uma eficiente indicadora ambiental;
- Produzir uma ferramenta da bioinformática, árvore filogenética baseada no mtDNA como forma de melhor comparar, em termos evolutivos, as espécies de aves amostradas produzindo um protocolo que poderia ser realizado em diagnósticos rápidos de avaliação ou simplesmente para melhor entendimento da comunidade amostrada. Em resposta ao maior grau de parentesco evolutivo entre espécies próximas à árvore filogenética; testa-se aqui que essas aves poderiam ser agrupadas para serem analisadas em conjunto quando em abundância menor do que não permite a realização de comparações estatísticas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Áreas de estudo

Nove fazendas de café com características ambientais similares, mas diferentes capacidades produtivas, foram classificadas em três grupos (pequenas, médias e grandes). Elas foram cuidadosamente escolhidas pela presença de características ambientais similares as quais abrigam aves nativas do Cerrado. Todas as nove fazendas eram compostas por um mosaico composto por fragmentos de Cerrado, gramíneas e áreas abertas e/ou de pastagens. As fazendas pequenas não eram maiores do que 20ha, as médias categorizadas entre 20 e 50ha e as fazendas grandes eram maiores do que 50ha de área produtiva. A média de produção de grãos de café dessas propriedades atinge cerca de 50 sacas/ha. As distâncias mínimas e máximas entre as fazendas são de cerca de 3km e 30km respectivamente (Figura 6). As fazendas são certificadas internacionalmente pelo Selo “*Rain Forest*” e, portanto, possuem um programa altamente controlado e cuidadoso de aplicação de agrotóxicos. As mesmas classes de agrotóxicos e protocolos de aplicação são usadas durante o

ano com discretas variações na frequência, concentração, marca e produto (Tabela 2). As concentrações dos agrotóxicos são mensuradas em gramas ou litros. Visando a simplificação das análises estatísticas essas unidades foram agrupadas em “Unidades de Concentração” dos compostos ativos relativos às mesmas unidades de área (ha/ano) (Tabelas 2 e 3). Além disso, as informações coletadas em relatórios e com os fazendeiros e funcionários, bem como as amostras de solo indicam que todas as fazendas estudadas usam agrotóxicos nas plantas, mas, é esperado que fazendas menores usem menos agrotóxicos do que as fazendas maiores seguindo um gradiente de concentração ou de frequência de aplicação. Adicionalmente, quatro pontos amostrais nas áreas urbanas foram escolhidos para testar se as aves visitavam ou cruzavam entre as áreas. Nenhum dos 82 indivíduos previamente marcados nas fazendas (ver Aves na Coleta de Dados) foram avistadas nas áreas urbanas.

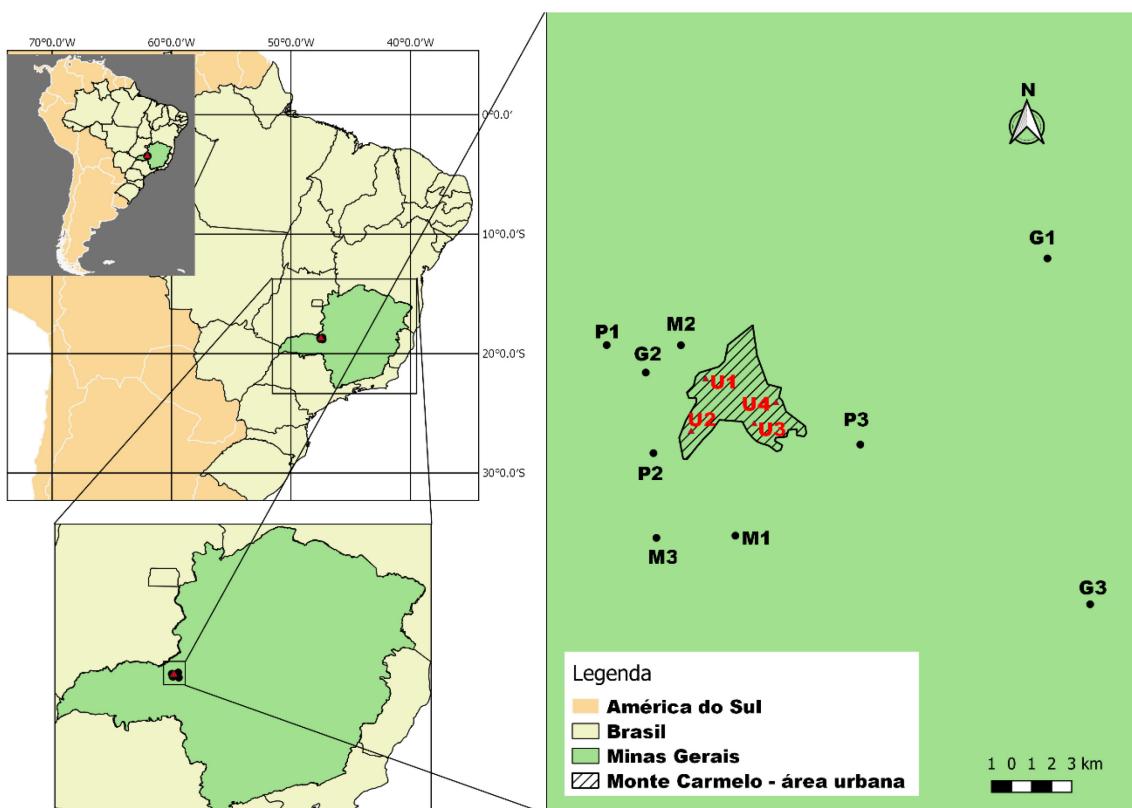


Figura 6. Localização das fazendas próximas à cidade de Monte Carmelo, Minas Gerais, Brasil, onde foram coletadas as amostras de sangue das aves. Três categorias das fazendas foram selecionadas: pequenas (P1, P2 e P3), médias (M1, M2 e M3) e grandes (G1, G2 e G3) e quatro pontos urbanos (U1, U2, U3, e U4) foram escolhidos para observação das bordas das áreas urbanas.

Tabela 2. Agenda de aplicação de agrotóxicos nos três grupos de fazendas (pequenas, medias e grandes) durante os anos de 2015 e 2016

Fórmula do produto	Fazendas	Volume dos compostos ativos (g ha ⁻¹)*	Volume em diluição	Frequência de aplicação/mês	Técnica de aplicação	Mês da aplicação
<i>Tutor, Redshield, ou Supera</i>	Pequenas	900	0.5 L ha ⁻¹	1x	Pulverização manual	
	Médias	900	0.5 L ha ⁻¹	1x	Pulverização manual	Agosto
	Grandes	1100	1 L ha ⁻¹	1x	Pulverização mecânica	
<i>Sulfato de Cobre (Calda Bordalesa)</i>	Pequenas	150	150g ha ⁻¹	1x	Pulverização manual	
	Médias	150	150g ha ⁻¹	1x	Pulverização manual	Janeiro, março e maio

	Grandes	150	15L ha ⁻¹	2x	Pulverização mecânica	
<i>Comet (BASF)</i>	Pequenas	150	5 L ha ⁻¹	1x	Pulverização manual	
	Médias	150	5 L ha ⁻¹	1x	Pulverização manual	Setembro a outubro
	Grandes	200	5 L ha ⁻¹	1x	Pulverização mecânica	
<i>Opera</i>	Pequenas	274.5	500 L ha ⁻¹	1x	Pulverização manual	
	Médias	274.5	500L ha ⁻¹	1x	Pulverização manual	Fevereiro, abril e dezembro
	Grandes	274.5	500L ha ⁻¹	1x	Pulverização mecânica	
<i>Premier</i>	Pequenas	0.7	50 ml plant ⁻¹	1x	Pulverização manual	Fevereiro

	Médias	0.84	50 ml plant ⁻¹	2x	Pulverização manual
	Grandes	0.84	50 ml plant ⁻¹	2x	Pulverização mecânica
<i>Oberon</i>	Pequenas	0.2	400ml ha ⁻¹	1x	Pulverização manual
	Médias	0.2	600ml ha ⁻¹	1x	Pulverização manual
	Grandes	0.5	800ml ha ⁻¹	2x	Pulverização mecânica
<i>Altacor</i>	Pequenas	31.5	4L ha ⁻¹	1x	Pulverização manual
	Médias	31.5	4 L ha ⁻¹	1x	Pulverização manual
					Março e abril

Grandes

31.5

4L ha⁻¹

1x

Pulverização
mecânica

Os dados foram baseados nos relatórios disponíveis nas fazendas

*Recomendação do fabricante.

Tabela 3. Classes dos agrotóxicos e suas respectivas unidades de concentração*/ha./ano aplicadas nas fazendas de *Coffea arabica* localizadas em Monte Carmelo, MG, Brasil

Agrotóxicos	Classe de agrotóxicos	Fazendas pequenas	Fazendas médias	Fazendas grandes
<i>Tutor, Redshield, ou Supera</i>		0.5	0.5	1
<i>Comet (BASF)</i>	Fungicidas	5	5	5
<i>Opera</i>		500	500	500
<i>Premier</i>	Insecticida	50	100	100
<i>Oberon</i>	Insecticida/Acaricida	400	600	1600
<i>Altacor</i>	Insecticida	4	4	4
Soma das concentrações dos agrotóxicos (ha/ano)		959,5	1.209,5	2.210,0

*Unidades de concentração = gramas ou litros

O clima da cidade de Monte Carmelo (18°47'56.98" S; 47°19'3.64" O), Minas Gerais, Brasil, de acordo com a classificação de Köppen-Geiser é tropical savana (Aw) apresentando sazonalidade com chuvas de outubro a abril e uma estação seca de março a setembro (Rosa et al. 1991). Todas as áreas amostradas foram fazendas circundando a cidade de estudo. O cultivo de café (*Coffea arabica*) é realizado de modo convencional nas fazendas.

3.2. *Coleta de dados*

3.2.1. Aves

Após obtidas as autorizações do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) (n°50528-1) e do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFU 120/15 – Anexo 1), as aves foram coletadas com redes de neblina (12 m × 3 m) expostas de seis da manhã às cinco da tarde no período de janeiro a outubro de 2016, quando as aves foram sistematicamente coletadas até atingir sete indivíduos da espécie mais abundante. Cada ave capturada foi classificada ao nível de espécie de acordo com Sigrist (2013). Todos os indivíduos foram marcados com tinta atóxica, com diferentes cores (verde para fazendas grandes, amarelo para as fazendas médias e vermelho para fazendas pequenas) de acordo com Rudkin e Stewart (2003) para confirmar a residência das aves na área de estudo. Além disso, 40h de observação foram realizadas em todos os pontos de coleta bem como nas áreas urbanas. Nenhuma ave marcada em uma área específica foi encontrada em uma área diferente. As aves foram agrupadas segundo o Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (CBRO, 2014). Dados morfométricos (tamanho da ave, comprimento do bico, comprimento da asa, comprimento da cauda) e peso das aves foram realizados segundo Sick (1997).

3.2.2. *Comparando as espécies de aves em relação à frequência de MN*

A espécie de ave mais abundante encontrada na área de estudo, tiziú (*Volatinia jacarina*), foi utilizada separadamente para a realização das análises de micronúcleos e tamanho das fazendas. Todas as demais espécies foram utilizadas em conjunto para comparar a frequência de micronúcleos em relação à *V. jacarina*, e para testar as hipóteses das correlações entre morfometria e frequência de micronúcleos.

3.2.3. Amostras de sangue, teste de micronúcleo e coloração das lâminas histológicas

Amostras de sangue de todos os 82 indivíduos coletados foram retiradas acessando a veia metatarsal com agulha e seringa de tamanho apropriados. Em seguida, uma ou duas gotas de sangue foram colocados diretamente nas lâminas histológicas. Então, o sangue de cada ave era espalhado com o auxílio de outra lâmina a um ângulo de 45° ainda em campo (uma lâmina por ave). As lâminas então foram fixadas com metanol absoluto por 10min e coradas em Giemsa (5%) por 10min e lavadas em água destilada (PALHARES; GRISOLIA 2002). Posteriormente, as lâminas foram analisadas no Laboratório de Citogenética da Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, para coloração.

3.2.4. Avaliação do Micronúcleo (MN)

Para cada lâmina histológica, 10.000 células foram analisadas visando a amostragem dos eritrócitos micronucleados, os quais eram analisados usando um microscópio (Olympus) usando objetiva de 100x e óleo de imersão. Como descrito por Fenech (2000), foram considerados MN estruturas com os seguintes critérios: (a) não deve estar ligado ao núcleo central; (b) deve estar no mesmo plano de foco e com a mesma coloração que o núcleo principal; (c) deve ser de 1/16 a 1/3 de diâmetro do núcleo principal.

3.2.5. Análises de solo

Amostras de solo de cada área foram coletadas e submetidas a um laboratório comercial para detectar traços de agrotóxicos. Essas análises foram realizadas pelo Laboratório Labras localizado em Monte Carmelo (MG). Um grupo de metais pesados foi avaliado como parâmetro para inferir a contaminação do solo, de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), de acordo com a instrução normativa n. 420/2009. Apresenta-se os dados apenas do cobre uma vez que muitos dos agrotóxicos o utilizam como um componente ativo e do níquel, devido ao seu potencial de toxicidade de acordo com Nędzarek et al. (2013) em um estudo com café.

3.2.6. Construindo a árvore filogenética: protocolo básico

De acordo com Hall (2013) para construir uma árvore filogenética são necessários quatro passos básicos: a identificação e obtenção de uma porção específica do DNA ou proteína (Passo 1), alinhar todas as sequências (Passo 2), estimar a árvore filogenética das sequências selecionadas (Passo 3) e apresentar uma árvore filogenética clara e limpa que transmita a informação relevante para o grupo de interesse (Passo 4).

a. Passos 1 e 2: adquirindo a sequência específica para o alinhamento

A busca pela sequência específica de DNA foi realizada no “*National Center for Biotechnology Information*” (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>) onde

foi selecionada uma porção do gene mitocondrial denominado de “*cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene*” (Figura 7), um gene “código-de-barras” utilizado para identificação de espécies. Em seguida, foram baixados do “*Genbank database*” (Tabela 4) para a realização do alinhamento das sequências através do programa Clustal X® (Passo 2).

The screenshot shows the NCBI Nucleotide database interface. The URL is https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KM894406.1. The page title is "Volatinia jacarina voucher 6466685 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial". The sequence details include: Locus KM894406, Definition: Volatinia jacarina voucher 6466685 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial, Accession KM894406, Version KM894406.1, and Source: mitochondrion Volatinia jacarina (blue-black grassquit). The sequence is 621 bp long and is linear. The date is VRT 03-FEB-2015. The right side of the page has sections for "Analyze this sequence", "Related information", and "Recent activity".

Figura 7. Exemplo da busca e aquisição do COI gene para cada uma das 20 espécies de aves encontradas no presente estudo. É mostrado aqui especificamente para *Volatinia jacarina*. “Gene Bank” no “National Center for Biotechnology Information (NCBI), U. S. National Center for Biotechnology Information (NCBI), U. S. National Library of Medicine”. Acesso em maio de 2019.

Tabela 4. Números de acesso ao “Genbank” do “COI gene” e seus respectivos comprimentos (bp) para quase todas as espécies de aves encontradas nas fazendas de diferentes tamanhos localizadas na cidade de Monte Carmelo, Minas Gerais, Brasil.

Espécies de aves	Genbank – Números de acesso	Comprimento linear do DNA
<i>Columbina talpacoti</i>	Columbina talpacoti voucher USNM:Birds:632726 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	652
<i>Leptotila rufaxilla</i>	Leptotila rufaxilla voucher USNM:Birds:623206 cytochrome oxidase	652

	subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	
<i>Crotophaga ani</i>	Crotophaga ani voucher UWBM 70301 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	675
<i>Guira guira</i>	Guira guira voucher USNM:Birds:635973 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	652
<i>Galbula ruficauda</i>	Galbula ruficauda voucher USNM:Birds:572525 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	651
<i>Gnorimopsar chopi</i>	Gnorimopsar chopi voucher USNM:Birds:630111 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	652
<i>Molothrus bonariensis</i>	Molothrus bonariensis voucher SI-B05915 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	678
<i>Mimus saturninus</i>	Mimus saturninus voucher LGEMA-1361 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	727
<i>Zonotrichia capensis</i>	Zonotrichia capensis voucher SCL 142 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	791
<i>Passer domesticus</i>	Passer domesticus voucher SP108 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	648
<i>Thamnophilus doliatus</i>	Thamnophilus doliatus voucher USNM:Birds:625885 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	612
<i>Thamnophilus torquatus</i>	Missing genetic sequence	
<i>Dacnis cayana</i>	Dacnis cayana voucher USNM:Birds:607048 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	648

<i>Tangara sayaca</i>	Thraupis sayaca voucher LGEMA-2829 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	739
<i>Tersina viridis</i>	Tersina viridis voucher USNM:Birds:587821 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	652
<i>Volatinia jacarina</i>	Volatinia jacarina voucher 646887 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	621
<i>Turdus leucomelas</i>	Turdus leucomelas voucher LGEMA-409 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	750
<i>Turdus rufiventris</i>	Turdus rufiventris voucher LGEMA-2819 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	725
<i>Elaenia flavogaster</i>	Elaenia flavogaster voucher KU:O:88201 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	642
<i>Myiozetetes similis</i>	Myiozetetes similis isolate dz3784-Msi_(14) cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial	542
<i>Tyrannus melancholicus</i>	Suiriri suiriri voucher USNM:Birds:630429 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	652

O COI gene foi escolhido uma vez que é parte do DNA mitocondrial (mtDNA) e, portanto, é considerado um bom marcador molecular para realização de inferências filogenéticas (AVISE et al., 1987) visto que o mtDNA evolui rapidamente, cerca de 10x mais rápido do que o DNA nuclear acumulando muito mais diferenças sendo, por esse motivo, altamente empregado em estudos filogenéticos (BROWN et al. 1979). O COI gene também é utilizado como DNA código-de-barras para identificação de espécies incluindo um trabalho extenso que identificou, apenas pela sequência do COI gene 260 espécies de aves norte-americanas (HEBERT et al. 2004).

Posteriormente, o COI gene foi transformado em um arquivo FASTA agrupando as 20 das 21 espécies encontradas no “Genebank” onde foram

transferidas para um arquivo *.txt* para criar um único arquivo para ser alinhado no Mega X®. Todos os arquivos FASTA seguem o padrão:

>KM894406.1 Volatinia jacarina voucher 646685 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial

```
ATAGTAGGCAGTGCCTAAGTCTCCTCATCCGTGCAGAGCTAGGCCAACCCG
GAGCCCTCCTGGGAGACGACCAAGTCTACAAACGTAGTCGTACAGGCCATG
CTTCGTGATAATCTCTTCATAGTTATGCCAATTATAATTGGAGGGTCGGAA
ACTGACTAGTTCCCCTAATAATTGGAGCACCAGACATAGCATTCCACGAATA
AACAAACATAAGCTTCTGACTACTCCCCCATCCTCCTCCTCTCAGCATC
CTCTACAGTTGAAGCAGGAGTCGGTACAGGCTGAACAGTATAACCCCCCACTA
GCTGGCAACCTAGCCCACGCCGGAGCCTCAGTCGACCTCGCAATCTCTCC
CTACATTAGCTGGCATCTCATCAATCCTAGGGCAATTAACTTCATCACTAC
AGCAATCAACATAAAACCCCCCGCCCTCTCACAATACCAAACCCCCCTATTG
TCTGATCCGTCTAATCACTGCAGTCCTGCTACTTCTATCCTCCAGTCCTA
GCTGCAGGCATCACAATACTCCTCACAGACCGTAACCTCAACACCACATTCT
CGACCCCTGCCGGAGGAGGGAGCCAGTCTTATACCAACACCTT
```

b. Passos 3 e 4: Criando a árvore filogenética para análise e comparação das espécies de aves

Para excluir o agrupamento aleatório de diferentes espécies na mesma análise sem um critério evolutivo, após os passos 1 e 2, realizou-se um teste da História Evolutiva (*Evolutionary History*) usando uma Análise de Filogenia Molecular pelo Método de Agrupamento de Vizinhos (*Neighbor Joining - NJ*) com o programa Mega X® para construir uma árvore filogenética (TAMURA et al. 2011).

Como sugerido por Rzhetsky e Nei (1995) o método NJ pode ser utilizado quando o número de sequências dos nucleotídeos analisados for maior do que 10 evitando assim um grande desperdício de tempo computacional. De acordo com

Nei (1996), o NJ é um dos métodos mais aplicados na construção de árvores filogenéticas e usa o princípio da Evolução Mínima, mas aplica taxas evolutivas diferenciais para as espécies ao invés de uma taxa constante como nos métodos elaborados anteriormente a ele.

3.2.7. Análises estatísticas

A média e o desvio padrão foi calculado para todos os grupos. O teste de normalidade (Kolmogorov–Smirnov) foi realizado para determinar se os dados se enquadravam na distribuição normal. Uma vez confirmada a normalidade usou-se uma análise de variância (ANOVA) de uma via para determinar se os valores de MN nos eritrócitos diferiram entre as áreas e entre as guildas alimentares. Um teste de variância não-paramétrico foi realizado para a verificação das correlações entre variáveis morfométricas e frequência de MN. Uma análise de componentes principais (PCA) foi realizada para determinar as variáveis mais importantes entre os dados morfométricos colhidos das aves (tamanho do corpo, comprimento do bico, comprimento da asa, comprimento da cauda e peso) em relação a variável dependente (frequência de MN). Correlações de Spearman foram realizadas com as variáveis morfométricas e a frequência de MN. Considerou-se que valores de probabilidade de $p < 0.05$ indicam diferença estatística significativa entre as variáveis.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Oitenta e duas aves de 21 espécies pertencentes a 11 famílias foram encontradas nas áreas de estudo amostradas para avaliar a frequência de MN que se agruparam entre zero e oito MN/10.000 eritrócitos analisados (Tabela 5). Dados similares de número de famílias foram encontrados por Baesse et al. (2015), em uma pesquisa realizada em um fragmento natural do Cerrado, localizado aproximadamente a 120km das áreas de estudo. Os dados gerais de todas as espécies são importantes para realizar comparações entre a espécie mais

abundante encontrada na área de estudo, *V. jacarina*, checando a resposta de MN e sua eficiência como biomonitora do ambiente influenciada por uso de agrotóxicos.

A frequência de MN foi zero para algumas espécies de aves (Tabela 6) o que não é incomum para aves. No entanto, não foi possível determinar se este é um padrão para as espécies em questão, mesmo comparando com os trabalhos de Zuñiga-Gonzalez et al. (2000) e Baesse (2015, 2019) pois, embora encontrando também aves sem presença de MN, as espécies não foram as mesmas nos locais de estudo. Nesse sentido, potencialmente, todas as espécies de aves encontradas no presente estudo podem ser consideradas como biomonitoras, uma vez que, organismos com aparentemente baixa frequência de MN, provavelmente têm sistema circulatório e baço muito eficientes, que eliminam rapidamente da corrente sanguínea eritrócitos defeituosos (RAMÍREZ-MUÑOZ et al., 1999). Portanto, a menos que esses indivíduos tivessem sido coletados imediatamente após a exposição aguda ao agrotóxico, a frequência de MN não seria detectada. Ao contrário, *Leptotila rufaxilla*, *Volatinia jacarina*, *Galbula ruficauda*, *Gnorimopsar chopi*, *Molothrus bonariensis*, *Passer domesticus*, *Turdus leucomelas* e *Turdus rufiventris* apresentaram seis ou mais MN/10.000 eritrócitos (Tabela 5) sendo, certamente, espécies com alto potencial ao biomonitoramento ambiental como reafirmado por Zúñiga-González et al. (2001) e Polleta et al. (2008) em um estudo estabelecendo a taxa espontânea de MN para aves.

Tabela 5. Frequência de Micronúcleos nas aves coletadas nas fazendas com diferentes tamanhos localizadas na cidade de Monte Carmelo (MG), Brasil

Família	Nome científico	Nome comum	Frequência de MN /10.000		
			Fazendas pequenas	Fazendas médias	Fazendas grandes
Columbidae	<i>Columbina talpacoti</i>	Rolinha-roxa	0	-	-
	<i>Leptotila rufaxilla</i>	Juriti-gemedreira	-	-	6
Cuculidae	<i>Crotophaga ani</i>	Anú-preto	0	3	4, 5
	<i>Guira guira</i>	Anú-branco	1 / 2	0 / 2 / 3	5
Thraupidae	<i>Dacnis cayana</i>	Saí-azul	0 / 2	5	-
	<i>Tangara sayaca</i>	Sanhaçu-cinzento	2	0	-
	<i>Tersina viridis</i>	Saí-andorinha	-	2	-
Tyrannidae	<i>Volatinia jacarina</i>	Tiziú	0 / 1 / 2 / 2 / 2 / 3 / 3	0 / 2 / 2 / 3 / 3 / 3 / 4	3 / 5 / 5 / 5 / 6 / 7 / 8
	<i>Elaenia flavogaster</i>	Guaracava-de-barriga-amarela	0	0	4
	<i>Myiozetetes similis</i>	Bentivizinho	1 / 2 / 3	4 / 4	4 / 5
	<i>Tyrannus</i>	Suiriri	1	3 / 4	4 / 5

melancholicus

Galbulidae	<i>Galbula ruficauda</i>	Ariramba-de-cauda-ruiva	1	0	7
Icteridae	<i>Gnorimopsar chopi</i>	Graúna	0 / 1		6 / 7
	<i>Molothrus bonariensis</i>	Chupim	2	3	8
Mimidae	<i>Mimus saturninus</i>	Sabiá-do-campo	-	1	-
Passeridae	<i>Passer domesticus</i>	Pardal	-	6	5 / 7
Thamnophilidae	<i>Thamnophilus doliatus</i>	Choca-barrada	0	-	3
	<i>Thamnophilus torquatus</i>	Choca-de-asa-vermelha	1	-	-
Turdidae	<i>Turdus leucomelas</i>	Sabiá-barranco	3	5	6
	<i>Turdus rufiventris</i>	Sabiá-laranjeira	4	3	5 / 6
Passerellidae	<i>Zonotrichia capensis</i>	Tico-tico	0	2 / 3	5

Duzentos e cinquenta e dois MN foram encontrados em todas as áreas de estudo, somando todas as espécies. A média, independente da espécie de ave amostrada foi de 3/10.000 eritrócitos e, 17,1% de todas as espécies não exibiram micronúcleos. A média de MN foi de $1,29 \pm 0,69$ nas fazendas pequenas, $2,59 \pm 1,65$ nas fazendas de médio porte, e $5,41 \pm 1,34$ fazendas de grande porte (Tabela 6).

As fazendas pequenas contaram com 14,3% da frequência de MN, as médias com 27,8% e as grandes com 57,0%. Em aves saudáveis de diferentes espécies, mantidas em um zoológico de Guadalajara, México, a média de MN foi de $1,19 \pm 2,13$ (ZUÑINGA-GONZÁLES et al. 2000), similar ao encontrado para fazendas menores. Baesse et al. (2015), em um estudo em quatro fragmentos do Cerrado sob influência do perímetro urbano, descobriu que os fragmentos próximos ao ambiente urbano apresentaram uma média seis vezes maior do que fragmentos naturais. No presente trabalho, a média da frequência de MN (Tabela 6) foi de quatro vezes maior nas fazendas grandes e duas vezes maior nas fazendas médias quando comparadas com as fazendas menores. Resultados estatisticamente significativos ($F = 62.79$, $p < 0.0001$). Então, esses dados corroboram com a hipótese de que áreas maiores dispersam mais agrotóxicos do que áreas menores, afetando, dessa forma, os eritrócitos das aves. A contagem de MN encontrada nas fazendas menores foi similar ao encontrado por Baesse et al. (2015) nos fragmentos de Cerrado fortemente influenciados pelas áreas urbanas. Aparentemente, a influência urbana produz interações negativas semelhantes a das fazendas pequenas. Nesse mesmo estudo, as aves encontradas em fragmentos naturais apresentaram uma média de MN de 0,7, aproximadamente 50% menos que a contagem para as fazendas de pequeno porte.

Tabela 6. Tamanho das fazendas, média de micronúcleo, guilda alimentar e estatística descritiva para cada grupo de espécies de aves encontrada nos três grupos de fazendas (pequenas, médias e grandes) localizadas em Monte Carmelo, MG.

Áreas de estudo	<i>n</i>	Número médio de MN/10.000 ^a	<i>p</i> ^b	Guilda alimentar	<i>n</i>	Número médio de MN/10.000 ^a	<i>p</i> ^b
Fazendas de pequeno porte	28	1,29 ± 0,69		Aves insetívoras	17	2.35 ± 4.44	n.s
Fazendas de médio porte	27	2,59 ± 1,65*	<0,001	Aves granívoras	27	3.15 ± 2.16	n.s
Fazendas de grande porte	27	5,41 ± 1,34*	<0,001	Aves onívoras	38	3.34 ± 2.23	n.s

^a Média ± desvio padrão

^b Probabilidade associada a hipótese nula comparando diferentes áreas e guildas alimentares. Teste paramétrico: ANOVA de uma via.

* Diferença estatisticamente significativa quando comparada com fazendas pequenas.

Molotrus bonariensis, *Galbula ruficauda*, *Passer domesticus*, *Turdus leucomelas* e *V. jacarina* nas fazendas de grande porte apresentaram as mais altas frequências de MN entre as áreas de estudo. Particularmente para *V. jacarina*, foram encontradas praticamente a mesma frequência de MN nos eritrócitos quando comparadas com todos os grupos (Figura 7). Existiu uma clara evidência do aumento da frequência de MN nas fazendas maiores quando comparadas com as fazendas de pequeno e médio porte ($F = 15.61$; $p < 0.0001$). A média de contagem de MN dessa espécie em particular foi similar à encontrada para todos os grupos 3/10.000 eritrócitos, porém, apenas 9,5% das aves não exibiram MN. A média de MN foi de $1,86 \pm 1,07$ nas fazendas pequenas, $2,43 \pm 1,27$ nas fazendas médias, e $5,57 \pm 1,62$ nas fazendas de grande porte. As fazendas pequenas contabilizaram 18,9% da frequência de MN, as fazendas médias 24,6% e as fazendas grandes 56,5%. Após analisar a resposta de *V. jacarina* aos agrotóxicos nas diferentes áreas, a porcentagem de indivíduos sem MN foi mais baixa quando comparada com as demais espécies analisadas simultaneamente (Figura 8). Além disso, a média do número de MN em *V. jacarina* foi mais alta do que a média para todas as espécies nas fazendas pequenas (Figura 9 e Tabela 7). Portanto, esses resultados indicam que *V. jacarina* é uma boa candidata, melhor que a média geral das aves estudadas, para ser uma espécie biomonitora sensível à presença de agrotóxicos.

V. jacarina (Figure 8A) é predominantemente uma dispersora de sementes (FONTOURA; ORSI, 2013) e é uma espécie amplamente distribuída no Cerrado pertencente à família Thraupidae, a qual inclui mais de 170 espécies. Está espécie pode ser encontrada em áreas abertas, pastagens, bordas florestais e áreas antrópicas como fazendas e ambientes urbanos. *V. jacarina* mede cerca de 11cm de comprimento e apresenta dimorfismo sexual. Os machos são predominantemente preto-azulados com coloração por todo o corpo exceto nas regiões axilares, e as fêmeas e juvenis são amarronzados (SICK, 1997; SIGRIST, 2013). Essas características classifica a espécie como boa candidata a biomonitora ambiental (BECKER, 2003).

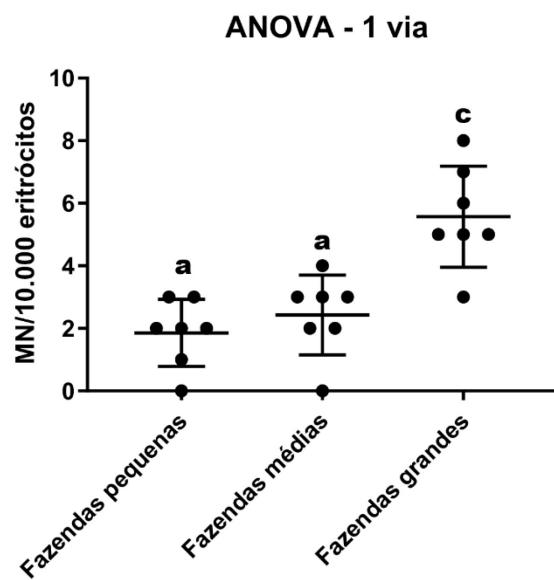


Figura 8. ANOVA de uma via da frequência de MN dos indivíduos de *Volatinia jacarina* encontrados nos três grupos de fazendas estudados localizadas na cidade de Monte Carmelo, Minas Gerais, Brasil ($F = 15.61$; $p < 00001$). Letras similares no interior do gráfico significam que as diferenças significativas não foram alcançadas, o contrário para letras diferentes.

Tabela 7. Tamanho das fazendas, número médio de micronúcleo e estatística descritiva para todas as espécies de aves comparadas com *Volatinia jacarina* encontrada nos três grupos de fazendas (pequenas, médias e grandes) localizadas em Monte Carmelo, MG.

Áreas de estudo	Todas as espécies de aves encontradas nas áreas de estudo	Média de MN/10.000 ^a	p ^b	<i>Volatinia jacarina</i>	Média de MN/10.000 ^a	p ^b
Fazendas de pequeno porte	<i>n</i> = 28	1,29 ± 0,69		<i>n</i> = 7	1,86 ± 1,07	
Fazendas de médio porte	<i>n</i> = 27	2,59 ± 1,65*	<0,001	<i>n</i> = 7	2,43 ± 1,27	=0,0604
Fazendas de grande porte	<i>n</i> = 27	5,41 ± 1,34*	<0,001	<i>n</i> = 7	5,57 ± 1,62*	<0.0001

* Diferença estatística significativa quando comparada com as fazendas de pequeno porte.

^a Média e desvio padrão

^b Probabilidade associada a hipótese nula quando comparadas áreas de diferentes tamanhos.

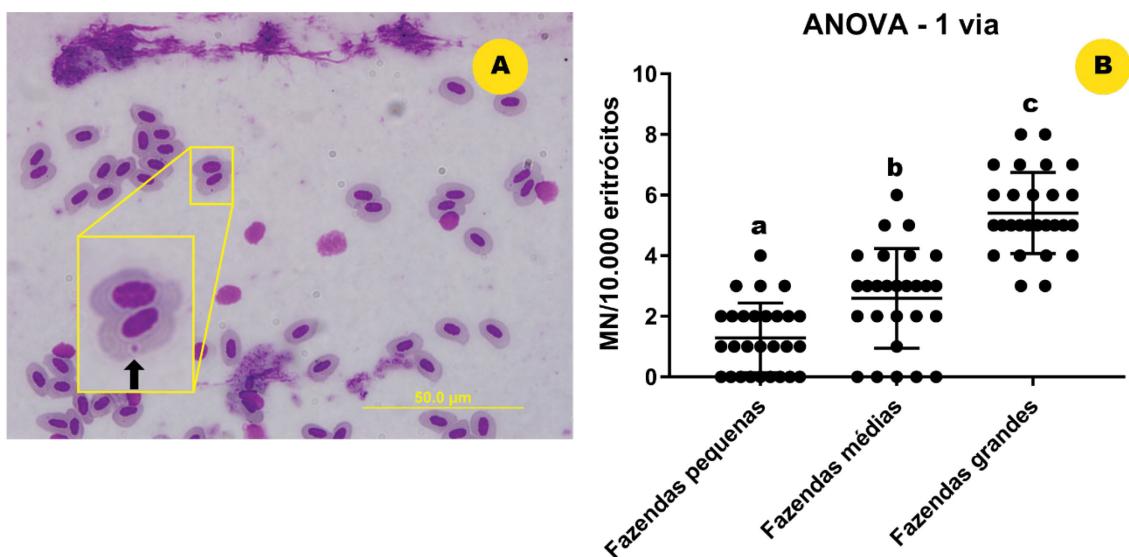


Figura 9. A. Eritrócitos de *Volatinia jacarina* (1,000×) corados com Giemsa (5%); a presença de MN está indicada pela seta. B. ANOVA da contagem de MN construída com todas as espécies de aves encontradas nos três grupos de fazendas localizadas na cidade de Monte Carmelo, Minas Gerais, Brasil ($F = 62.79$; $P < 0.0001$). Letras diferentes no interior do gráfico significam que as diferenças significativas foram alcançadas.

Ao analisar os resíduos da Análise de Componentes principais (PCA) verificou-se que o tamanho da ave foi o principal fator influenciando a frequência de MN, explicando 88,7% da variação relacionado à variável dependente (Frequência de MN) para o teste. Juntos, tamanho da ave e comprimento do bico explicaram quase que 100% da frequência de MN (Figura 10). Portanto, podemos concluir que uma superfície corporal grande aumenta as chances de a ave entrar em contato com os agrotóxicos.

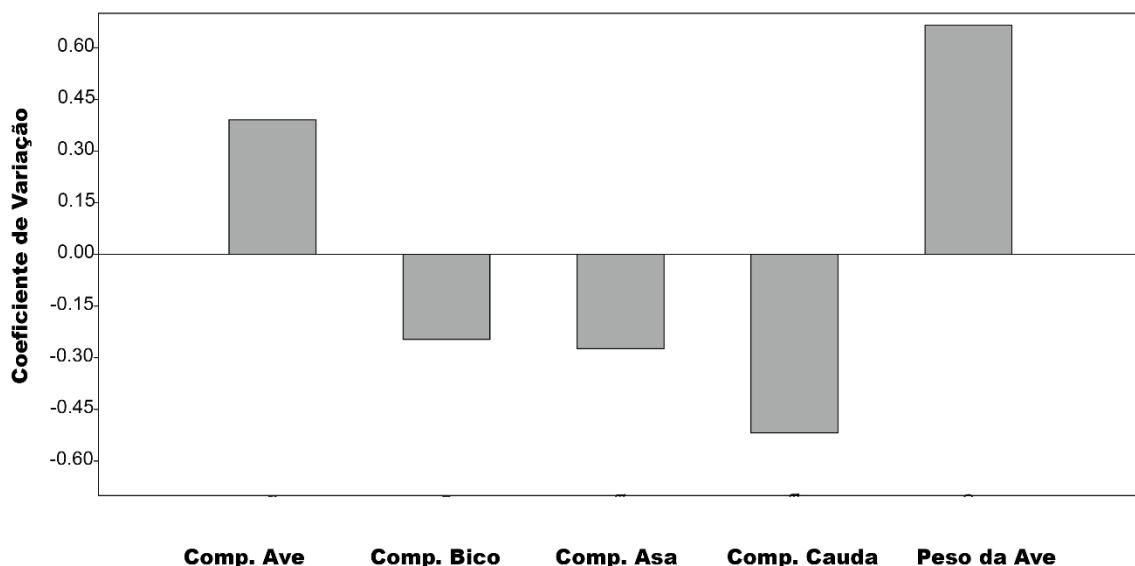


Figura 10. Análise de componentes principais mostrando as variáveis mais correlacionadas com a frequência de MN

Diferentemente do esperado, não foram encontradas correlações evidentes e significativas para nenhuma variável morfométrica coletada. Contudo, o comprimento do bico mostrou uma tendência a ter uma correlação negativa (Figura 11) sugerindo que aves que se alimentam de partículas alimentares menores são mais afetadas pela contaminação por agrotóxicos como é o caso de *Volatinia jacarina*, *Molothrus bonariensis*, *Turdus* sp. e *Tyrannus melancholicus* que alimentam-se de pequenos insetos e sementes menores (Tabela 11).

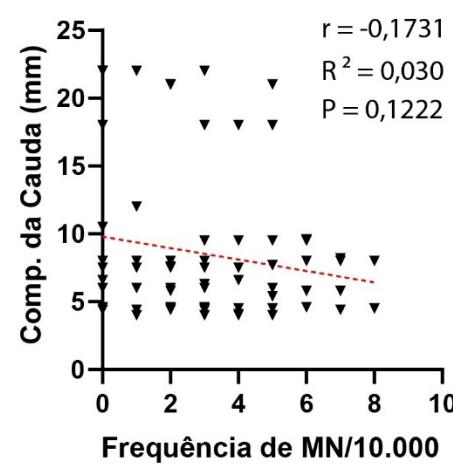
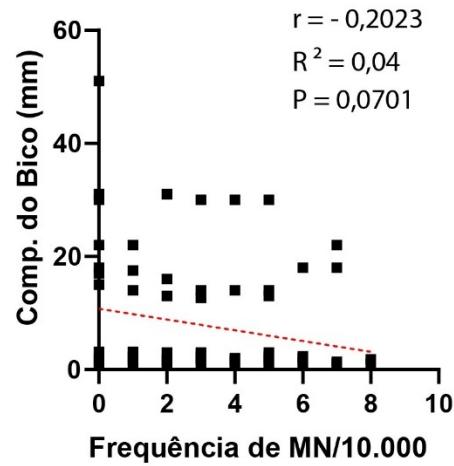
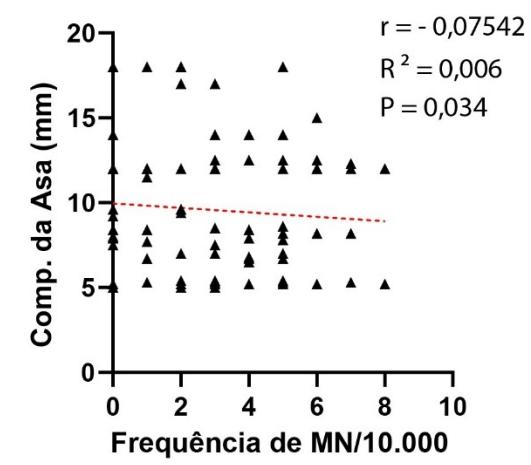
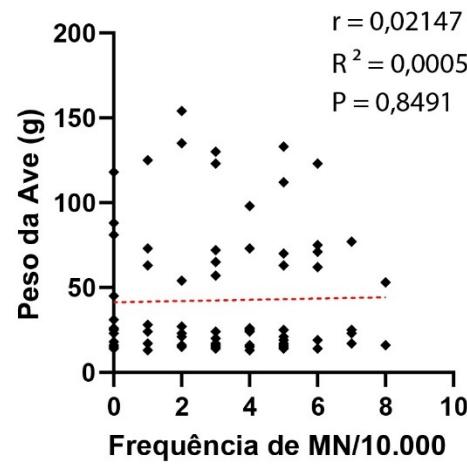
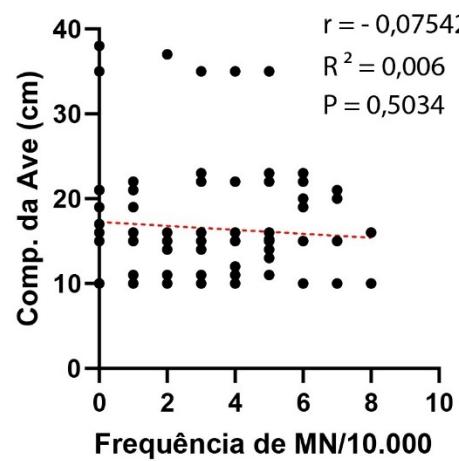


Figura 11. Correlação de Spearman entre os dados morfométricos das aves (comprimento do bico, peso da ave, comprimento da asa, comprimento da ave e comprimento da cauda) relacionado a Frequência de MN coletada para as aves registradas nas fazendas de *Coffea arabica* localizadas na cidade de Monte Carmelo, MG, Brasil.

Tabela 8. Guilda trófica e comprimentos dos bicos para as espécies de aves coletadas nas fazendas de *Coffea arabica* localizada na cidade de Monte Carmelo, Minas Gerais, Brasil.

Família	Nome científico	Nome popular	Guilda trófica	Comprimento do bico (mm)		
				Fazendas de pequeno porte	Fazendas de médio porte	Fazenda de grande porte
Columbidae	<i>Columbina talpacoti</i>	Rolinha-roxa	Granívora	15.0	-	
	<i>Leptotila rufaxilla</i>	Juriti-gemedreira	Granívora	-	-	24.0
Cuculidae	<i>Crotophaga ani</i>	Anú-preto	Onívora	35.0	34.0	35.0
	<i>Guira guira</i>	Anú-branco	Onívora	36.5	36.0	36.0
Thraupidae	<i>Dacnis cayana</i>	Saí-azul	Onívora	31.0	13.0	-
	<i>Tangara sayaca</i>	Sanhaçu-cinzento	Frugívora	21.0		-
	<i>Tersina viridis</i>	Saí-andorinha	Onívora		15.0	
	<i>Volatinia jacarina</i>	Tiziú	Granívora	10.3	10.3	10.1
Tyrannidae	<i>Elaenia flavogaster</i>	Guaracava-de-barriga-amarela	Onívora	18.0	17.0	16.0
	<i>Myiozetetes similis</i>	Bentivizinho	Insetívora	17.3	16.5	
	<i>Tyrannus melancholicus</i>	Suiriri	Onívora	21.5	21.0	19.5
Galbulidae	<i>Galbula ruficauda</i>	Ariramba-de-cauda-ruiva	Insetívora	22.0	20.0	19.0

Icteridae	<i>Gnorimopsar chopi</i> <i>Molothrus bonariensis</i>	Graúna Chupim	Onívora Onívora	17.8 18.0	16.0	23.5 16.0
Mimidae	<i>Mimus saturninus</i>	Sabiá-do-campo	Onívora	-	26.0	-
Passeridae	<i>Passer domesticus</i>	Pardal	Onívora	-	14.0	14.5
Thamnophilidae	<i>Thamnophilus doliatus</i> <i>Thamnophilus torquatus</i>	Choca-barrada Choca-de-asa-vermelha	Insetívora Insetívora	20.0 -	- 21.0	17.0 -
Turdidae	<i>Turdus leucomelas</i> <i>Turdus rufiventris</i>	Sabiá-barranco Sabiá-laranjeira	Onívora Onívora	23.0 25.0	22.0 21.0	22.0 21.0
Passerellidae	<i>Zonotrichia capensis</i>	Tico-tico	Granívora	17.0	14.0	13.0

A relação entre guilda alimentar e frequência de MN também foi testada (Tabela 6). Em relação às fontes potenciais de contaminação, acreditava-se que aves insetívoras estariam sujeitas a maior taxa de contaminação do que aves granívoras ou onívoras uma vez que maior quantidade de insetos estariam prontamente disponíveis após a aplicação dos inseticidas na plantação. Contudo, não foi encontrada uma diferença estatística significativa entre os membros das guildas tróficas analisadas. Portanto, esses dados sugerem uma outra fonte de contaminação principal além do alimento, como ingestão de água ou via ar. Roux e Marra (2007) comprovaram que aves podem ser expostas a metais pesados externamente por contato físico ou internamente via ingestão. Assim sendo, o consumo de água e alimento levaria a um aumento na contaminação por agrotóxicos. Por outro lado, a contaminação via ar teria duas rotas de entradas principais para o interior do organismo da ave: a) via sistema respiratório; b) via contaminação das penas. Dados da PCA sugerem que a contaminação das penas, relativo ao tamanho da superfície corporal, corresponde a quase 100% da variação de MN explicada pelo tamanho das aves e do comprimento dos bicos. Todas as espécies de aves desenvolveram ao longo do tempo um comportamento de limpeza, cuidado e impermeabilização das penas (*preening behavior*) visando a remoção de ectoparasitas, sujeiras e realinhando suas penas para maximizar a performance de voo (SICK, 1997), portanto aumentando seu sucesso reprodutivo (BEGON et al. 2007). Percebe-se, assim que a contaminação das penas por agrotóxicos ou outros produtos químicos não é uma característica visível. Dessa forma, pode não ser comumente registrada por ecólogos em estudos de campo por não ser uma característica visível, mas, sem dúvida pode afetar a sobrevivência, fisiologia e reprodução das aves, bem como o consumo de alimento ou a seleção de habitat. De fato, como demonstrado por Hogstedt (1981), fontes alimentares são os principais fatores limitantes da reprodução e mortalidade das aves. Podemos adicionar então que, o próprio comportamento que foi evolutivamente importante para aumentar o sucesso reprodutivo das aves, tem colocado as aves em risco no mundo moderno.

Sobre a contaminação via pulmões, vale ressaltar que as aves são potencialmente mais propícias à entrada de substâncias nocivas uma vez que possuem um sistema respiratório altamente particular com sacos aéreos que se

estendem para além dos pulmões, estando em contato com o interior de seus ossos pneumáticos (SICK, 1997). Então, tecnicamente a entrada de substâncias é potencializada nesse *taxa*.

Análises indiretas de solo indicaram a presença de metais pesados nas amostras e, com isso, podem confirmar três possíveis agrotóxicos utilizados nas fazendas estudadas: Tutor, Redshield e Supera, além do tratamento antifúngico com sulfato de cobre (Tabelas 9 e 10). Contudo, as análises de solo não indicaram contaminação preocupante de acordo com os Valores de Referência de Qualidade (VRQs) recomendados na resolução do CONAMA n.420 (CONAMA, 2009). Os demais agrotóxicos foram confirmados via relatórios presentes nas fazendas e entrevistas com os fazendeiros e empregados. Bhunya e Jena (1996) demonstraram os efeitos clastogênicos do sulfato de cobre avaliando tanto as aberrações cromossômicas quanto a presença de MN em galinhas (*Gallus domesticus*). Eles encontraram um aumento significativo de MN revelando o potencial de genotoxicidade de CuSO₄ nos sistemas das aves. Gomes et al. (2009) avaliaram o papel da garça-branca (*Ardea albus*) em biomonitorar ecossistemas aquáticos contaminados por mercúrio. Markowski et al. (2013) conduziram um experimento contaminando o alimento com uma solução de acetato de chumbo em níveis subtóxicos e encontraram chumbo nas penas a partir do 15º dia após a exposição. Em geral, os agrotóxicos têm propriedade químicas de alta reatividade atuando no centro de biomoléculas, incluindo DNA, causando danos à sua estrutura (CROSBY, 1992).

Em uma revisão clássica explorando os mecanismos moleculares do níquel (Ni) Cameron, Buchner e Tchounwou (2011) apresentaram o papel do níquel na indução da genotoxicidade em estudos com animais e carcinogenicidade em estudos clínicos. Em baixas concentrações, contudo, o Ni funciona como um micronutriente essencial para os seres vivos. O montante médio da ingestão de Ni na dieta humana, via origens desconhecidas é de cerca de 170 µg.dia⁻¹ e as principais fontes alimentares de Ni na dieta provém de chás, cafés, chocolate, soja,

castanhas, trigo, repolho, espinafre e batata. Para seres humanos a ingestão máxima tolerável de Ni é de $1\text{mg} \cdot \text{dia}^{-1}$, sendo assim, a ingestão de Ni via alimentos é difícil de superar esse valor, por apenas uma via. O presente trabalho demonstrou que fazendas grandes apresentaram concentrações mais altas de Ni do que as demais (Tabela 6), mesmo assim, esta concentração está longe da ingestão máxima tolerável para humanos e, provavelmente, o Ni não tem nenhum efeito sobre a frequência de MN nessas áreas. Em resumo, a detecção de resíduos químicos no solo e o aumento da frequência de MN encontrado nas fazendas, seguindo um gradiente de tamanho de área cultivável indicam tanto o potencial genotóxico dos agrotóxicos quanto a sensibilidade das aves na detecção de compostos xenobióticos.

Tabela 9. Análises de Metais Pesados do solo das três classes de fazendas localizadas na cidade de Monte Carmelo, Minas Gerais, Brasil

Fazendas	Metais pesados	
	Níquel ($\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$)	Cobre ($\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$)
Pequenas	0,13	0,23
Médias	0,10	0,25
Grandes	0,32	0,60

Tabela 10. Lista de todos os agrotóxicos usados no ciclo de vida de *Coffea arabica* durante o ano de cultivo de café e suas classificações toxicológicas

Marca do produto	Princípio ativo	Classificação toxicológica ^a
<i>Fungicidas e/ou Bactericidas</i>		
Tutor, Redshield ou Supera	Cobre ^{b, c}	II
Sulfato de cobre (Calda “Bordalesa”)	Cobre ^{b, c}	II
Comet (BASF)	Piraclostrobina ^b	II
Opera	Epoxiconazol ^b	II
<i>Inseticidas e/ou Acaricidas</i>		

Premier	Neonicotinoide ^b	IV
Oberon	Espiromesifena ^b	III
Altacor	Clorantraniliprol ^b	III

^a Classificação dos agrotóxicos de acordo com a Lei N° 7802/1989. A classificação toxicológica é baseada em testes DL50 e categorizadas como I (extremamente tóxico: DL50 < 5 mg, 1,000 mg de peso), II (altamente tóxico: 50 mg < DL50, 50 mg/1,000 mg de peso), III (moderadamente tóxico: 500 mg < DL50, 5,000 mg/1,000 mg de peso), e IV (baixa toxicidade: DL50 > 5,000 mg, 1,000 mg de peso).

^b Verificado por relatórios e entrevistas nas fazendas

^c Verificado pelas análises de solo

A frequência de MN nos eritrócitos foi positivamente correlacionada de forma significativa com as unidades de concentração dos agrotóxicos ($r = 0.71$; $p = 0.03$) (Figura 12). Esses dados são corroborados por muitos trabalhos realizados com todos os grupos de vertebrados, desde estudo com peixes (ISMAIL et al., 2017), anfíbios (CRUZ-ESQUIVEL; VILORIA-RIVAS; MARRUGO-NEGROTE, 2017), répteis (SCHAUMBURG et al., 2012), aves (SOUTO et al., 2018) e até para seres humanos (DUTTA; BAHADUR, 2016; JACOBSEN-PEREIRA et al., 2018). Portanto, o TMN apresentou-se como um biomarcador efetivo para a detecção da toxicidade de agrotóxicos em todos os membros de vertebrados.

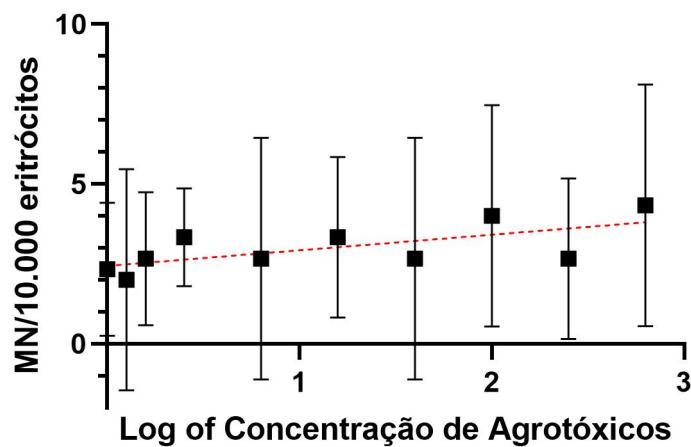


Figura 12. Correlação de Spearman entre Log10 da Concentração da mistura de agrotóxicos e Frequência de MN ($r = 0.71$; $p = 0.03$). Esses cálculos foram realizados após primeiro computar a média par-a-par das réplicas e, então, analisar todas as médias. As barras correspondem ao desvio padrão da frequência de MN.

Uma vez que a frequência foi positivamente correlacionada com a utilização de agrotóxicos, testou-se a hipótese de que o aumento na frequência de MN estaria correlacionado a uma alteração alométrica nas aves. Tal fato é passível de ocorrência uma vez que, para muitas espécies de seres vivos, existe um padrão de troca (*tradeoff*) entre muitas variáveis morfométricas diminuindo, por exemplo, a taxa de crescimento frente a substâncias tóxicas no meio (BEGON et al., 2007). Portanto, com maior gasto energético, por exemplo para eliminar eritrócitos da corrente sanguínea, menos energia estaria disponível para orientar o crescimento das aves. Contudo, mesmo com uma diferença anatômica pequena observada entre as aves das diferentes áreas de estudo, especialmente a diminuição do bico, asa, cauda e comprimento das aves nas fazendas maiores, não foi possível identificar uma variação estatisticamente significativa (Figura 13). Portanto, embora observado um aumento na frequência de MN nas aves encontradas nas fazendas maiores, tal resposta não afetou a morfologia das aves, talvez porque essas alterações na frequência de MN ainda são discretas e iniciais, ou por não ter ocorrido uma exposição crônica desde o nascimento dos indivíduos. Para deixar mais claro, hipotetiza-se aqui que, uma exposição crônica aos agrotóxicos orientaria a um aumento do baço, como verificada a relação por Ramírez-Muñoz et al. (1999).

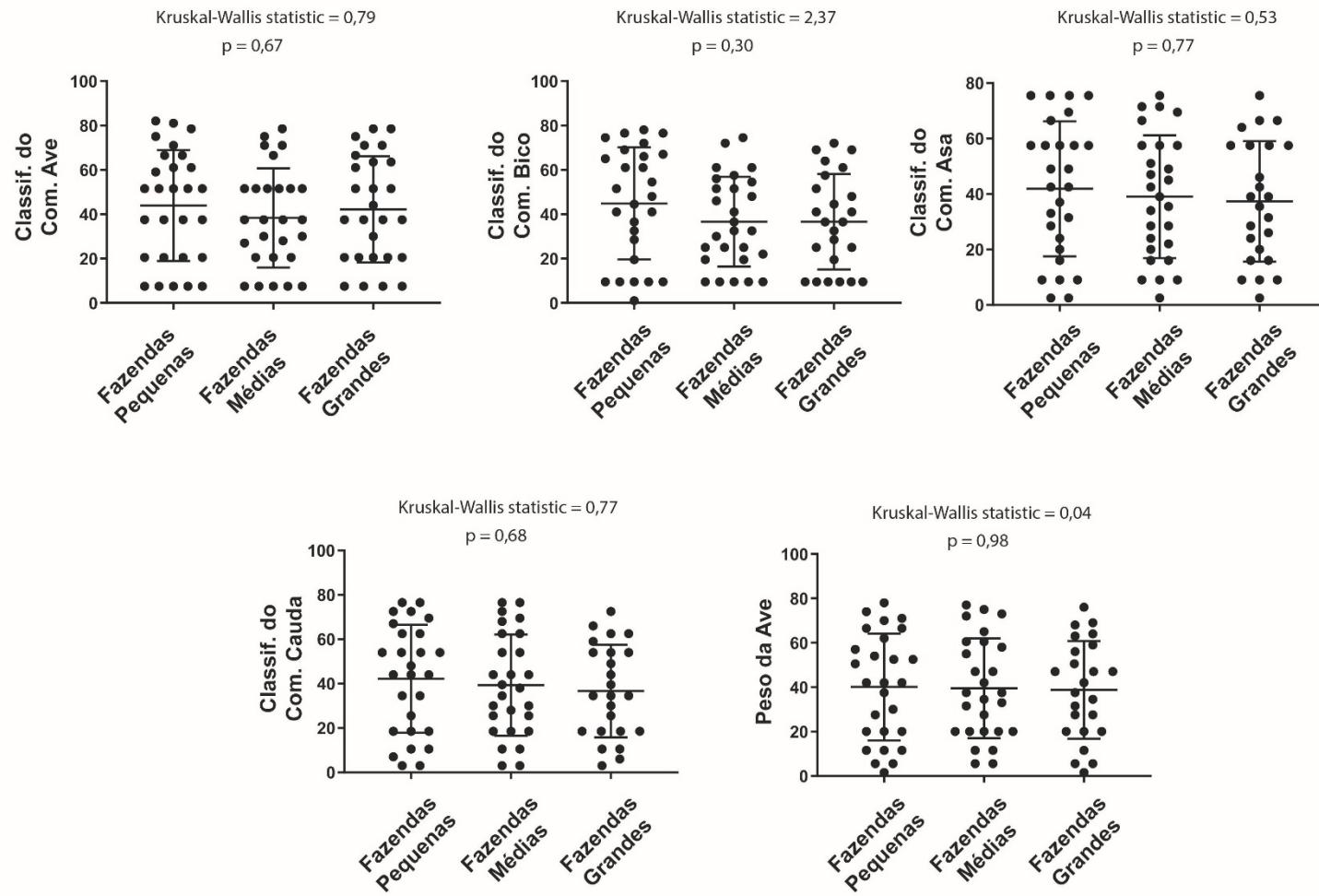


Figura 13. Medidas das diferenças anatômicas das espécies de aves comuns a todas as áreas coletadas em fazendas com diferentes tamanhos na cidade de Monte Carmelo, MG, Brasil. Após o teste de Kruskal-Wallis o comprimento das aves, do bico, asa, cauda e peso das aves foram ranqueados. Os resultados de cada teste são mostrados acima de cada gráfico.

4.1. Comparando diferentes espécies de aves: abordagem “*in silico*”

O Brasil possui uma alta diversidade de aves (n=1.901) de acordo com o Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (CBRO, 2014). Então, mesmo após considerável esforço amostral em campo, provavelmente a coleta de aves apresentará poucos indivíduos distribuídos em diferentes espécies. Para fins estatísticos, o mínimo de três indivíduos pode ser comparado. No entanto, considera-se cinco indivíduos da mesma espécie como um valor razoável para averiguar diferenças entre amostras (GOTELLI; ELLISON, 2011). Uma saída para contornar o potencial problema estatístico seria: a) aumentar significativamente o esforço amostral, quando possível é a melhor saída ou; b) embora o grupo inteiro parece ter se comportado de maneira semelhante a resposta do aumento da frequência de MN frente a exposição por agrotóxicos, comparar espécies mais próximas na escala evolutiva a fim de aumentar o número da amostra seria interessante para fazer comparações pontuais. Tal ferramenta seria interessante de ser utilizada especialmente em protocolos de avaliação rápida do ambiente em projetos que necessitem uma resposta rápida ou que tenham poucos recursos e tempo disponíveis. Portanto, sugere-se como protocolo a criação de uma árvore filogenética que permita a analisar e confrontar espécies mais parentadas para possibilitar comparações pautadas nas relações evolutivas.

O genoma de qualquer organismo vivo parece ser um registro evolutivo de sua história de vida. Portanto, as sequências moleculares tornaram uma estratégia poderosa para verificar as relações evolutivas entre as espécies (ZUCKERKANDL; PAULING 1965) e para todos os taxa de seres vivos de bactérias (OLSEN et al. 1986) a seres humanos e, até mesmo conduziu a uma tentativa de construção de uma árvore universal da vida abrigando todas as espécies de seres vivos conhecidas (WOESE 2000). Surpreendentemente, uma única sequência gênica, começou a ser utilizada, com propostos genealógicos, ainda na década de 1960, como uma técnica promissora na evolução molecular (ZUCKERKANDL; PAULING 1965). Esta técnica é aplicada para avaliar as relações evolutivas entre pares de espécies,

para produzir árvores filogenéticas, que podem ser usadas para estimar as relações entre taxa com seus ancestrais hipotéticos (HALL, 2011).

A árvore filogenética gênica criada revela as seguintes relações entre as espécies (Figura 14). Primeiramente, será analisada a relação de *V. jacarina*, para melhor explicar algumas possibilidades de aplicação da ferramenta. Nota-se que a espécie mais aparentada a *V. jacarina* é a *Thraupis sayaca* (*Tangara sayaca* na nomenclatura atualizada segundo CBRO, 2014). Então, se o autor tivesse optado por agrupar essas espécies em uma mesma análise, de uma forma mais conservadora, então, o número da amostra poderia ser aumentado possibilitando uma melhoria nas análises estatísticas e, consequentemente, nas inferências biológicas. Da mesma forma, *Gnorimopsar chopi* e *Molothrus bonariensis*; *Turdus leucomelas* e *Turdus rufiventris*; *Crotophaga ani* e *Guira guira*; *Columbina talpacoti* e *Letdotila rufaxilla*; e *E. flavogaster* e *Myiozetetes similis* corresponderiam a pares de espécies mais intimamente relacionadas, portanto, passíveis de serem agrupadas nas mesmas análises.

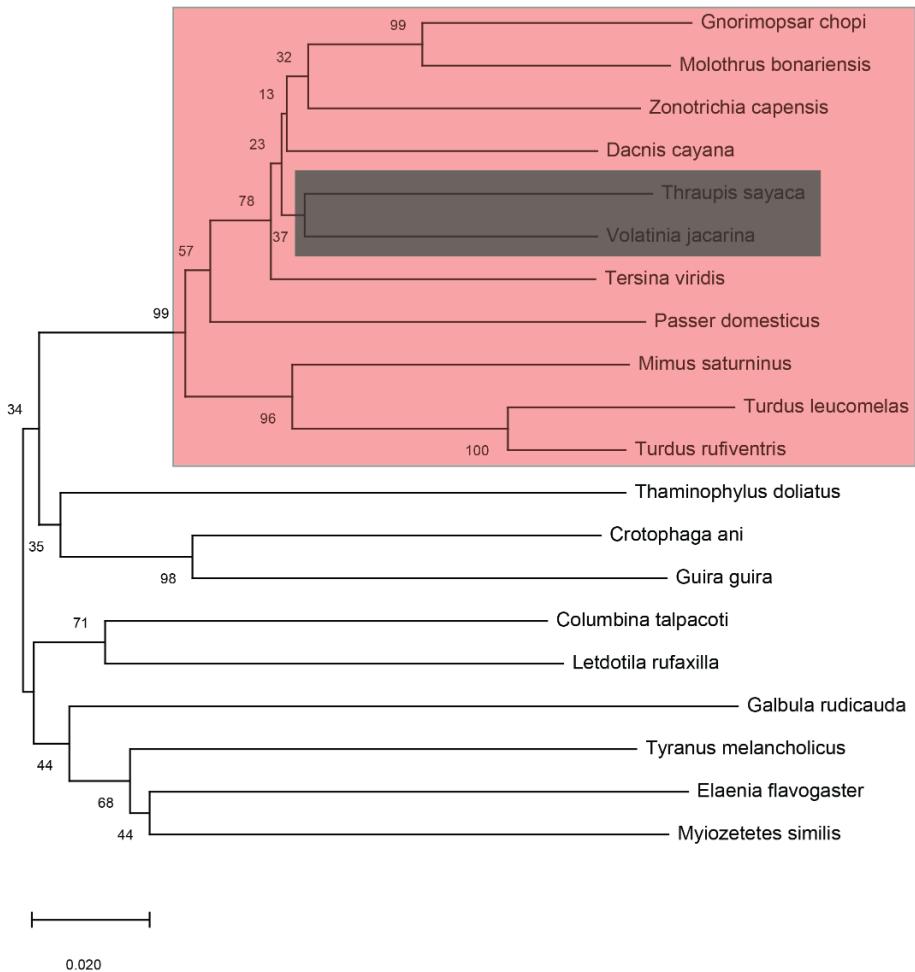


Figura 14. Árvore Filogenética baseada no gene COI para as 20 espécies de aves encontradas no presente estudo. A história evolutiva foi inferida utilizando o Método do Agrupamento de Vizinhos (NJ). A árvore ótima com a soma dos comprimentos dos ramos = 1.51109885 é apresentada. A porcentagem de réplica das árvores na qual o taxa está associado e agrupado no teste de *bootstrap* (500 réplicas) é mostrada junto aos ramos. A árvore está desenhada em escapa, com os comprimentos dos ramos na mesma unidade das distâncias evolutivas usadas para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram computadas usando o método de máxima verossimilhança composta e estão nas unidades do número de substituição da base por sítio. A análise envolveu 20 sequências de nucleotídeos. As posições do códon incluídas foram as 1^{as}+ 2^{as}+3^{as}+não-codificantes. Todas as posições ambíguas foram removidas para cada posição pareada. Teve um total de 791

posições no conjunto de dados finais. As análises evolutivas foram conduzidas no MEGA X®. A análise conservadora é mostrada no retângulo cinza e menos conservativa no retângulo vermelho.

De uma forma menos conservadora, todas as primeiras 11 espécies poderiam ser agrupadas na mesma análise, bem como *Galbula ruficauda*, *Tyrannus melancholicus*, *Elaenia flavogaster* e *Myiozetetes similis*. Vale a pena ressaltar que esta não seria a melhor forma de comparação das espécies uma vez que, basicamente, uma árvore filogenética baseada nos genes não necessariamente é uma árvore filogenética baseada nas espécies (MADDISON 1997). Em outras palavras, uma árvore gênica expressa a história de um fragmento de um gene e não a história de vida de um organismo, mesmo que as duas coisas estejam ligadas (SZÖLLÓSI e DAUBIN 2012), e, cada organismo possui sua história de vida em particular, respondendo de diferentes formas às alterações ambientais (BEGON et al. 2007). No entanto, Nei (1987) verificou que o uso de mtDNA parece produzir árvores filogenéticas muito semelhantes aquelas baseadas nas espécies.

Portanto, sugere-se no presente estudo, a construção de árvore filogenética utilizando um gene específico, especialmente uma sequência de mtDNA para inferir relações evolutivas para melhor compreensão das relações do grupo estudado bem como para, potencialmente comparar espécies mais aparentadas. Esse é um método rápido e fácil de ser produzido. Espera-se também que tal ferramenta seja utilizada para outros *taxa* com alta diversidade biológica, facilitando assim os diagnósticos de avaliação ambiental.

5. CONCLUSÕES

O biomonitoramento ambiental utilizando aves permanece como um meio eficiente para a detecção de poluentes ambientais, incluindo agrotóxicos. *V. jacarina* apresenta uma sensibilidade de resposta interessante como biomonitora, apresentando uma resposta sensível aos agrotóxicos e dependente do tamanho das fazendas de café. A contaminação por agrotóxicos parece estar relacionada com o ar ou o comportamento das aves de limpeza das penas, uma vez que diferentes fontes alimentares não apresentaram diferenças estatísticas, o que rejeitou nossa hipótese previa. Aves generalistas estão mais propícias a

contaminação por agrotóxicos, ao contrário do que se esperava para aves insetívoras.

O cobre parece influenciar a frequência de MN em sinergia com outros agrotóxicos, contrariamente ao níquel, o qual foi encontrado apenas nas fazendas maiores e em baixas concentrações não sendo potencialmente capaz de atingir a ingestão máxima tolerável para os seres humanos.

Áreas de cultivo maiores proporcionam maior possibilidade de dispersão de agrotóxicos o que maximiza a contaminação ambiental verificada pela correlação positiva entre frequência de MN e tamanho das fazendas.

Embora pareça plausível de ocorrência, diminuições alométricas em aves mais afetadas por contaminação não foram estatisticamente comprovadas no presente estudo. No entanto, sugere-se em trabalhos futuros testar mais uma vez essa hipótese.

Comparações por meio de construções de árvores filogenéticas baseadas em sequências de mtDNA possibilitam um melhor entendimento das relações evolutivas do grupo estudado bem como, podem agrupar espécies mais parentadas para serem analisadas em conjunto.

O presente trabalho é pioneiro no estudo da interação de aves e agrotóxicos analisando o potencial genotóxico dessas substâncias *in situ* e apresenta alto potencial para o uso no monitoramento da saúde ambiental.

As abordagens aqui apresentadas possuem alto potencial para serem utilizadas em trabalhos futuros de biomonitoramento ambiental em áreas com poluição por agrotóxicos e demais pesticidas/inseticidas, inclusive no ambiente urbano.

6. REFERÊNCIAS

AI-SABTI, K. An in vitro binucleated blocked hepatic cell technique for genotoxicity testing in fish. **Mutat. Res.**, v.335, p.109-120, 1995. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(95\)90048-9](https://doi.org/10.1016/0165-1161(95)90048-9)

AI-SABTI, K. e METCALFE, C.D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutat. Res.**, v. 343, p.121-135, 1995. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(95\)90078-0](https://doi.org/10.1016/0165-1218(95)90078-0)

ANDRADE, V.M., SILVA, J., SILVA, F.R., HEUSER, V.D., Dias, J.F., YONEAMA, M.L. e FREITAS, T.R. Fish as bioindicators to assess the effects of pollution in two southern Brazilian rivers using the Comet assay and micronucleus test. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 44, p.459-468, 2004. <https://doi.org/10.1002/em.20070>

AVISE, J.C.; ARNOLD, J.; BALL, R.M.; BIRMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J.E.; REEB, C.A.; SAUNDERS, N.C. Intraespecific phylogeography: the bridge between population genetics and systematics. **Annu. Rev. Ecol. Evo. Syst.**, n.18, p.489-522, 1987. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.18.110187.002421>

BAESSE CQ, TOLENTINO VCM, SILVA-MARCOS A, SILVA-ANDRADE A, FERREIRA GA, PANIAGO LPM, NEPOMUCENO JC AND MELO C. Micronucleus as biomarker of genotoxicity in birds from Brazilian Cerrado. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v.115, p.223-228, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.02.024>

BAESSE, C.Q.; TOLENTINO, V.C.M; MORELLI, S.; MELO, C. Effect of urbanization on the micronucleus frequency in birds from forest fragments **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v.171, p.631-637, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.026>

BECKER, PH. Biomonitoring with birds. In: Markert BA, Breure AM, Zechmeister HG (eds) Bioindicators and biomonitoring. Amsterdam: Elsevier Science, Elsevier, 2003, p.677-736.

BEGON M., MORTIMER M., THOMPSON D.J. **De indivíduos a ecossistemas**. 1ed. Artmed Editora: Porto Alegre, RS, 2007, p.752.

BEGON, M., MORTIMER, M.; THOMPSON, D, J. **Population Ecology**: a unfield study of animals and plants. 3 ed. Oxford: Blackwell Science, 1996. <https://doi.org/10.1002/9781444313765>

BENETTI, D.; ALDERETE, B.L.; SOUZA, C.T.; DIAS, J.F.; NIEKRASZEWICZ, L.; CAPPETTA, M.; MARTINEZ-LOPES, W.; da SILVA, J. DNA damage and epigenetic

alteration in soybean farmers exposed to complex mixture of pesticides. **Mutagenesis**, v.33, p.87-95, 2018. <https://doi.org/10.1093/mutage/gex035>

BENETTI, D.; NUNES, E.; SARMENTO, M.; PORTO, C.; SANTOS, C.L.I.; DIAS, J.F.; da SILVA, J. Genetic damage in soybean workers exposed to pesticides: Evaluation with the comet and buccal micronucleus cytome assays **Mut. Res. Gen. Toxicol.**, v.752, n.1-2, p. 28-33, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.01.001>

BHUNYA S.P; JENA, G.B. The evaluation of clastogenic potential of trichloroacetic acid (TCA) in chick in vivo test system. **Mut. Res. Gen. Toxicol.**, v.367, p.253-259, 1996. [https://doi.org/10.1016/S0165-1218\(96\)90085-3](https://doi.org/10.1016/S0165-1218(96)90085-3)

BIRDLIFE INTERNATIONAL. **Falco peregrinus**. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2016: e.T45354964A95143387, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T45354964A95143387.en>>. Acesso em: 06 Junho de 2019.

BOLLER, K.; SCHMID, W. Chemische Mutagenese beim Sauger. Das knochenmarkdes Chinesischen Hamsters als in vivo-testsystem. Haematologischebefunde nach Behandlung mit Trenimon. **Humangenetik**, v.11, p.35-54, 1970. <https://doi.org/10.1007/BF00296302>

BOLOGNESI, C. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. **Mutat Res.**, v.543, n.3, p.251-72, 2003. [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(03\)00015-2](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(03)00015-2)

BOS, D.H.; POSADA, D. Using models of nucleotide evolution to build phylogenetic trees. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 29, p.211-227, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2004.07.007>

BROWN, W.M.; GEORGE JUNIOR, M.; WILSON, A. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.76, n.4, p.1967-1971, 1979. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.4.1967>

BRUCE, W.R.; HEDDLE, J.A. The mutagenic activity of 61 agents as determined by the micronucleus, *Salmonella*, and sperm abnormality assays. **Can. J. Genet. Cytol.**, v.21, p.319-334, 1979. <https://doi.org/10.1139/g79-036>

BURRELL, G., SIEBERT, F. Gases found in coal mines. **Mines circular 14**. Bureau of Mines, US Department of Interior, Washington, D.C, 1916.

CAIRNS, J.; VAN DER SCHALIE. Biological monitoring part I - Early warning systems. **Water Research.**, v.14, n.9, p.1179-1196, 1980. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(80\)90175-X](https://doi.org/10.1016/0043-1354(80)90175-X)

CAMPOS, C.F.; CAMPOS JÚNIOR, E.O.; SOUTO, H.N.; SOUZA, E.F.; PEREIRA, B.B. Biomonitoring of the environmental genotoxic potential of emissions from a complex of ceramic industries in Monte Carmelo, Minas Gerais, Brazil, using *Tradescantia pallida*. **J Toxicol. Environ. Health A**, v.79, n.3, p.123-128, 2016.

<https://doi.org/10.1080/15287394.2015.1118714>

CALLISTO, M.; FERREIRA, W.; MORENO, P.; GOULART, M.; PETRUCIO; M. Aplicação de um protocolo de avaliação rápida da diversidade de habitats em atividades de ensino e pesquisa (MG-RJ). **Acta Lim. Bras.** São Carlos, v. 13, n. 1, p. 91-98, 2002.

CAMERON, K.S.; BUCHNER, V.; TCHOUNWOU, P.B. Exploring the Molecular Mechanisms of Nickel-Induced Genotoxicity and Carcinogenicity: A Literature Review. **Ver. Environ. Health**, v.26, n.2, p.81-92, 2011. <https://doi.org/10.1515/reveh.2011.012>

CAMPOS JUNIOR, E. O.; KERR, W. E. Teste de micronúcleo com *Tradescantia pallida* aplicado ao Biomonitoramento da qualidade do ar da cidade de Uberlândia. **Horizonte Científico**, v.3, n.8, p.1-18, 2009.

CAMPOS, C.F.; PEREIRA, B.B.; CAMPOS JÚNIOR, E.O.; SOUZA, E.F.; SOUTO, H.N.; MORELLI, S. Genotoxic evaluation of the River Paranaíba hydrographic basin in Monte Carmelo, MG, Brazil, by the *Tradescantia* micronucleus. **Genet. Mol. Biol.**, v.38, n.4, p.507-512, 2015. <https://doi.org/10.1590/S1415-475738420150117>

CAVALCANTI, R.B. Bird species richness and conservation in the Cerrado Region of Central Brazil. **Stud. Avian Biol.**, v.19, p.244-249, 1999.

CBRO - COMITÊ BRASILEIRO DE REGISTROS ORNITOLÓGICOS. **Lista das Aves do Brasil**, 2014. 11^a edição. Disponível em:<<http://www.cbro.org.br/lista.htm>>. Acesso em: 08 de junho de 2019.

CHAIM, A.; CASTRO, V. L. S. S.; CORRALES, F. M.; GALVÃO, J. A. H; CABRAL, O. M. R.; NICOLELLA, G. Método para monitorar perdas de agrotóxicos na cultura de tomate. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v.34, n.5, p.741-747, 1999a. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X1999000500003>

CHAIM, A.; LARANJEIRO, A. J.; CAPALBO, D. M. F. **Bico pneumático eletrostático para aplicação de inseticidas biológicos em floresta de eucalipto**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA (Boletim de Pesquisa, 3), 1999b.

CHAPA-VARGAS, J; MEJÍA-SAAVEDRA, J.; MONZALVO-SANTOS, K; PUEBLA-OLIVARES, F. Blood lead concentrations in wild birds from a polluted mining region at Villa de la Paz, San Luis Potosí, Mexico. **J. Environm. Sci. Health A.**, v.45, n.1, p.90-98, 2010. <https://doi.org/10.1080/10934520903389242>

CLEMENTS, F.E. Plant indicators: the relation of plant and communities to process and practice. **Carnegie Inst. Whas. Publ.**, p.290-388, 1920. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.28569>

CLIFTON, M. Air Pollution. **Proc. R. Soc. Med.**, n.57, v.7, p.615-618, 1964. <https://doi.org/10.1177/003591576405700736>

COLBORN, T. A case for revisiting the safety of pesticides: a closer look at neurodevelopment. **Environ. Health Perspect.**, v.114, p.10-17, 2006. <https://doi.org/10.1289/ehp.7940>

CRUZ-ESQUIVEL, A.; VILORIA-RIVAS, J.; MARRUGO-NEGRET, J. Genetic damage in *Rhinella marina* populations in habitats affected by agriculture in the middle region of the Sina River, Colombia. **Environ Sci Pollut Res.**, v.24, p.27392-27401, 2017. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0134-8>

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente, 2009. Resolução nº 420, 28 de Dezembro de 2009. Ministério do Meio Ambiente. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=620>>. Acesso em: 25 de setembro de 2017.

CROSBY D.G. Pesticides as environmental mutagens. In: FLECK RA, HOLLANDER A (eds) Genetic toxicology: an agricultural perspective. Plenum Press, New York, pp 201-218. 1982. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-4352-3_18

DARWIN, C. **On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life.** London: John Murray (1^aed.), 1859. ISBN 978-1-4353-9386-8. Disponível em: <<http://darwin-online.org.uk/content/frameset?itemID=F373&viewtype=text&pageseq=1>>. Acesso em: 17 de junho de 2019.

DUTTA, S.; BAHADUR, M. Cytogenetic analysis of micronuclei and cell death parameters in epithelial cells of pesticide exposed tea garden workers. **Toxicol. Mech. Methods.**, 2016. DOI: 10.1080/15376516.2016.1230917. <https://doi.org/10.1080/15376516.2016.1230917>

EVANS, H.J.; NEARY, G. WILLIAMSON, J.F.S. The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma rays on *Vicia faba* roots and the effect of oxygen, II. Chromosome damage: the production of micronuclei, **Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.**, v.1, n.3, p.216-229, 1959. <https://doi.org/10.1080/09553005914550311>

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutat. Res.**, v.455, p.81-95, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00065-8](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00065-8)

FERNANDEZ, M., L'HARIDON, J. Influence of lighting conditions on toxicity and genotoxicity of various PAH in the newt *in vivo*. **Mutat. Res.** v. 298, p. 31-41, 1992. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(92\)90026-V](https://doi.org/10.1016/0165-1218(92)90026-V)

FILIZOLA, H.F.; PESSOA, M.C.P.Y.; GOMES, M.A.F.; SOUZA, M.D. Contaminação dos solos em áreas Agrícolas. IN: MANZATTO, C. V.; FREITAS JUNIOR, E. de; PERES, J. R. R. (Ed.). Uso agrícola dos solos brasileiros. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2002. 174 p. cap. 7, p. 79-86.

FONTOURA, P.M.; ORSI, M.L. Ecological partitioning of three Columbidae species in northern Paraná, southern Brazil. **Biota Neot.**, v.3, p.0-6, 2013. <https://doi.org/10.1590/S1676-06032013000300005>

FRY, T. e DUNBAR, M. R. A review of biomarkers used for wildlife damage and disease management, IN: Proceedings of the Wildlife Damage Management Conference, v. 12, p. 217–222, 2007.

GALINDO, T.P. e MOREIRA, L.M. Evaluation of genotoxicity using the micronucleus assay and nuclear abnormalities in the tropical sea fish *Bathgobius soporator* (Valenciennes, 1837) (Teleostei, Gobiidae). **Gen. Mol. Biol.** v. 32, n. 2, p. 394-398, 2009.

<https://doi.org/10.1590/S1415-47572009000200029>

GOMES, A.I.; VIEIRA, J.L.F.; PINHEIRO, M.C.N; MARCELIANO, M.L.V. A first evaluation on the use of *Ardea albus* feathers as bioindicators of mercury burden in Amazonian ecosystems. **Acta Amaz.**, v.39, n.4, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672009000400025>

GOMES, A.R.; JUSTINO, C.; ROCHA-SANTOS, T.; FREITAS, A.C.; DUARTE, A.C.; PEREIRA R. Review of the ecotoxicological effects of emerging contaminants to soil biota. **J. Environm. Sci. Health A.**, v.52, n.10, p.1-16, 2017.

<https://doi.org/10.1080/10934529.2017.1328946>

GONZALES, L; KIRSCH-VOLDERS, M. Biomonitoring of genotoxic effects for human exposure to nanomaterials: The challenge ahead. **Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.**, v.768, p.14-26, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.03.002>

GOTELLI, N.J.; ELLISON, A.M. **Princípios de Estatística em Ecologia**. Artmed: São Paulo, SP. 2004. 527p.

GRISOLIA, C.K. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides **Mutat. Res.**, v.518, p.145-150, 2002. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(02\)00086-4](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(02)00086-4)

HALL, BG. **Phylogenetic trees made easy: a how-to manual**. 4th ed. Sunderland (MA): Sinauer Associates, 2011.

HATCH, A.C.; BURTON, G.L. Effects of photoinduced toxicity of fluoranthene on amphibian embryos and larvae. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.17, n.9, p.1777-1785, 1998. <https://doi.org/10.1002/etc.5620170918>

HAYASHI, M. The micronucleus test—most widely used in vivo genotoxicity test. **Genes and Environment**, v.38, p.2-6, 2016. <https://doi.org/10.1186/s41021-016-0044-x>

HEBERT, P.D.N.; STOECKLE, M.Y.; ZEMLAK, T.S.; FRANCIS, C.M. Identification of Birds through DNA Barcodes. **Plos Biol.**, v.2., n.10, p. 1-7. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020312>

HEDDLE, J.A. A rapid in vivo test for chromosomal damage. **Mutat. Res.**, v.18, p.187-190, 1973. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(73\)90035-3](https://doi.org/10.1016/0027-5107(73)90035-3)

HEDDLE, J. A., SALAMONE, M.F., HITE, M., KIRKHART, B., MAVOURNIN, K., MACGREGOR, J.G. e NEWELL, G.W. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. **Mutat. Res.** v. 123, p. 61-118, 1983. [https://doi.org/10.1016/0165-1110\(83\)90047-7](https://doi.org/10.1016/0165-1110(83)90047-7)

HEDDLE, J.A. A rapid in vivo test for chromosomal damage. **Mutat. Res.**, v.18, p. 187-190, 1973. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(73\)90035-3](https://doi.org/10.1016/0027-5107(73)90035-3)

HEDDLE, J.A.; SALAMONE, M.F. The Micronucleus Assay. I. in vivo. IN: Stich H.F., San R.H.C. (eds) Short-Term Tests for Chemical Carcinogens. Topics in Environmental Physiology and Medicine. New York: Springer, p.505-510.

HOGSTEDT, G. Effect of additional food on reproductive success in the magpie (*Pica pica*). **J Anim Ecol.**, v.50, p.219-229, 1981. <https://doi.org/10.2307/4041>

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION. Annual report, 2017. Disponível em: <http://www.ico.org/trade_statistics.asp>. Acesso em: 25 de setembro de 2017.

ISMAIL, M.; KHAN, Q.M.; ALI, R.; ALI, T.; MOBEEN, A. Genotoxicity of chlorpyrifos in freshwater fish *Labeo rohita* using Alkaline Single-Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay. **Drug Chem. Toxicol.**, v.37, n.4, p. 466-471, 2014. <https://doi.org/10.3109/01480545.2014.887093>

JACOBSEN-PEREIRA, C.H.; SANTOS, C.R.; MARASLIS, F.T.; PIMENTAL, L.; FEIJÓ, A.J.L.; SILVA-IOARA, C.; MEDEIROS, G.S.; ZEFERINO, R.C.; PEDROSA, R.C.; MALUF.

S.W. Markers of genotoxicity and oxidative stress in farmers exposed to pesticides. **Ecotoxiol. Environ. Saf.**, v.148, p. 177-183, 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.10.004>

KOSKIMIES, P. Birds as a tool in environmental monitoring. **Ann. Zool. Fennici**, v.26, p.153-166, 1989.

KUMAR, M. S., "Biomarkers of disease in medicine," **Curr. Trends Sci.**, p. 403–417, 2009.

KUNC, H.; MCLAUGHLIN, K.; ROUVEN, S. Aquatic noise pollution: implications for individuals, populations, and ecosystems. **Proc. R. Soc. London, Ser. B.**, v.283, n.1836, p.1-8, 2016. <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.0839>

KURSA, M; BEZRUKOV, V. Helth status of an Antarctic top predator: micronuclei frequency and White blood cell differentials in the South Polar Skua (*Catharacta maccorminck*). **Polarforschung**. v. 37, n. 1, p. 1-5, 2007.

LANDRES, P.B. Ecological uses of vertebrate indicators species: a critique. **Conserv. Biol.**, v.2, p.1-13, 1998.

LARINI, L. (Ed.). **Toxicologia dos praguicidas**. São Paulo: Editora Manole, 1999. 230p.

MACGREGOR, J.T.; WEHR, C.M.; GOULD, D.H. Clastogen-induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: The basis of an improved micronucleus test. **Environ. Mutagen.**, v.2, n.4., p.509-514, 1980. <https://doi.org/10.1002/em.2860020408>

MADDISON, W.P. Gene trees in species trees. **Syst. Biol.**, v.46, p. 523-536, 1997.
<https://doi.org/10.1093/sysbio/46.3.523>

MALIK, M. e GANIE, F. A. Genotoxic effects of organophosphate insecticide thiometon in some exotic fishes of Kashmir. **Inter. J. Pharm. Sci. Rev. Res.**, v. 8, n. 1, p.101-104, 2011.

MARINI MA, GARCIA FI. 2005. Conservação de aves no Brasil. **Megadiversidade**, v.1, p.95-102, 2005.

MARKOWSKI, M.; KALIŃSKI, A.; SKWARSKA, J.; WAWRZYNIAK, J.; BANBURA, M; MARKOWSKI, J.; ZIELINSKI, P.; BANBURA, J. Avian feathers as bioindicators of the exposure to heavy metal contamination of food. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v.91, p.302-305, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00128-013-1065-9>

MARQUES-JÚNIOR, A.N., MORAES, R.B.C., MAURAT, M.C. Poluição Marinha. **IN:** PEREIRA, R.C., SOARES-GOMES, A. (Org.) Biologia Marinha. 2. ed. Rio de Janeiro: Interciênciia, 2009. p. 505-528.

MARQUIS, O., MILLERY, A., GUITTONNEAU, S. e MIAUD, C. Toxicity of PAHs and jelly protection of eggs in the common frog *Rana temporaria*. **Amphibia-Reptilia**, v. 27, p. 472-475, 2006. <https://doi.org/10.1163/156853806778189945>

MATTER, B.; SCHMID, W. Trenimon-induced chromosomal damage in bone marrow cells of six mammalian species, evaluated by the micronucleus test. **Mutat. Res.**, v.12, p.417-425, 1971. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(71\)90092-3](https://doi.org/10.1016/0027-5107(71)90092-3)

MBG - MISSOURI BOTANICAL GARDEN. Disponível em:
<<http://www.missouribotanicalgarden.org/PlantFinder/PlantFinderDetails.aspx?kempercode=c137>>. Acesso em: 8 de junho de 2019.

MOKARIZADEH, A.; FARYABI, M.R.; REZVANFAR, M.A.; ABDOLLAHI, M. A comprehensive review of pesticides and the immune dysregulation: mechanisms, evidence and consequences. **Toxicol. Mechan. Methods**, v.25, n.4, p.258-278, 2015. <https://doi.org/10.3109/15376516.2015.1020182>

MONZALVO-SANTOS K, TORRE MCA, CHAPA-VARGAS L, CASTRO-LARRAGOITIA J, RODRÍGUEZ-ESTRELLA R. Arsenic and lead contamination in soil and in feathers of three resident passerine species in a semi-arid mining region of the Mexican plateau. **Proc. R. Soc. London, Ser. A.**, v.51, n.10, p.825-832, 2016. <https://doi.org/10.1080/10934529.2016.1181451>

MOORE, N.W. Pesticides and birds: a review of the situation in Great Britain in 1965. **Bird Study**, v.12, n.3, p.222-252, 1965. <https://doi.org/10.1080/00063656509476102>

MORAIS, C.R.; CARVALHO, S.M.; ARAÚJO, G.R.; SOUTO, H.N.; BONETTI, A.M.; MORELLI, S.; CAMPOS JÚNIOR, E.O. Assessment of water quality and genotoxic impact by toxic metals in *Geophagus brasiliensis*. **Chemosphere**, v.152, p. 328-334, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.03.001>

MORISSON, M.L. Bird populations as indicators of environmental changes. **Curr. Ornithol.**, v.3, p.429-451, 1986. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6784-4_10

MYERS N; MITTERMEIER R.A.; MITTERMEIER, C.G.; da FONSECA, G.A.B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v.403, p.853-858, 2000.
<https://doi.org/10.1038/35002501>

NĘDZAREK, A.; TÓRZ, A.; KARAKIEWICZ, B.; CLARK, J.S.; LASZCZYŃSKA, M.; KALETA, A.; ADLER, G. Concentration of heavy metal in coffee. **Acta Biochim. Pol.**, v.60, n.4, p.623-627, 2013. https://doi.org/10.18388/abp.2013_2031

NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. New York: Columbia University Press, 1987.
<https://doi.org/10.7312/nei-92038>

NEI, M. Phylogenetic analysis in molecular evolutionary genetics. **Annu Rev Genet.**, v.30, p.371-403, 1996. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.30.1.371>

NIEMI, G.J. e MCDONALD, M.E. Application of ecological indicators. **Ann. Rev. Ecol. Evol. Syst.**, v. 35, n. 1, p. 89-111, 2004. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.35.112202.130132>

NORPPA H, FALCK, G.C. What do human micronuclei contain? **Mutagenesis**, v.18, n.3, p.221-233, 2003. <https://doi.org/10.1093/mutage/18.3.221>

NOSS, R.F. Indicators for monitoring biodiversity: a hierarchical approach. **Conserv. Biology**, v.4, p.355-364, 1990. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.1990.tb00309.x>

OECD - Organization for Economic Cooperation and Development. **Persistent, Bioaccumulative and Toxic Pesticides in OECD Member Countries. Part A: Report and**

Annexes 1, 3 and 4 Part B: Contains Annex 2, which is available only on the Internet. 2002. Disponível em: <<https://www.oecd.org/chemicalsafety/pesticides-biocides/pesticides-testing-assessment.htm>>. Acesso em: 8 de junho de 2019.

OECD - Organization for Economic Cooperation and Development. **Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4**. OECD Publishing, Paris 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1787/9789264264762-en>>. Acesso em: 05 de junho de 2019.

OLAYEMI, O.A.; TAIWO, A.A.; JAGUN, J.A. Micronucleus as a biomarker of genotoxicity in village weaver bird (*Ploceus cucullatus*). **World's Vet. J.**, v.4, n.4, p.48-53, 2014. <https://doi.org/10.5455/wvj.20141045>

OLSEN, G.J.; LANE, D.J.; GIOVANNONI, S.J.; PACE, N.R. Microbial Ecology and Evolution: a ribosomal RNA approach. **Ann. Rev. Microbiol.**, v.40, p.337-65, 1986. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.40.100186.002005>

PALHARES, D; GRISOLIA, CK. Comparison between the micronuclei frequencies of kidney and gill erythrocytes in tilapia fish, following mitomycin C treatment. **Gen. Mol. Biol.**, v.25, n.3, p.281-284, 2002. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572002000300005>
PAROLINIM M. GHILARDI, A.; TORREC.D.; MAGNI, S.; PROSPERI, L.; CALVAGNO, M.; DEL GIACCO, L.; BINELLI, A. Environmental concentrations of cocaine and its main metabolites modulated antioxidant response and caused cytogenotoxic effects in zebrafish embryo cells. **Environ. Pollut.**, v. 226, p.504-514, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.04.046>

PEREIRA, B.B.; CAIXETA, E.S.; FREITAS, P.C.; SANTOS, V.S.V.; LIMONGI, J.E.; CAMPOS JÚNIOR, E.O.; CAMPOS, C.F.; SOUTO, H.N.; RODRIGUES, T.S.; MORELLI, S. Toxicological assessment of spinosad: Implications for integrated control of *Aedes aegypti* using larvicides and larvivorous fish. **J. Toxicol. Environ. Health, Part A**, v.79, n.12., p. 477-481, 2016. <https://doi.org/10.1080/15287394.2016.1176974>

PEREIRA, B.B.; MORELLI, S. **Teste de micronúcleos com Tradescantia [livro eletrônico]**: fundamentos, aplicações e orientações técnicas para ensaios de biomonitoramento da qualidade ambiental. Ed. Fucamp, 2013.

PESSOA, M. C. P. Y.; CHAIM, A. Programa computacional para estimativa de uniformidade de gotas de herbicidas aplicados por pulverização aérea. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v. 34, n. 1, p. 45-56, 1999. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X1999000100007>

PEREIRA, B.B.; CAMPOS JÚNIOR, E.O.; MORELLI, S. In situ biomonitoring of the genotoxic effects of vehicular pollution in Uberlândia, Brazil, using a Tradescantia micronucleus assay. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v.87, p.17-22, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.10.003>

PINHATTI, V.R., ALLGAYER, M.C., BREYER, A.S., PEREIRA, R.A. e JULIANA-SILVA. Determinação de danos basais no DNA de araras canindé (*Ara ararauna*) através do Teste de Micronúcleos: uma ferramenta na avaliação da saúde animal e seu uso no biomonitoramento da poluição ambiental. **Act. Sci. Vet**, v. 34, n. 6., p. 313-317, 2006.

<https://doi.org/10.22456/1679-9216.15552>

POLLACK, L.; ONDRASEK, N.; CALISI, R.M. Urban health and ecology: the promise of an AVIAN biomonitoring tool. **Curr. Zool.**, n.63, p.205-212, 2017.

<https://doi.org/10.1093/cz/zox011>

POLLETA, G.L.; LARRIERA, A.; KLEINSORGE, E.; MUDRY, M.D. *Caiman latirostris* (broad-snouted caiman) as a sentinel organism for genotoxic monitoring: Basal values determination of micronucleus and comet assay. **Mutat. Res. Fund. Mol. M.**, v.650, n.2, p.202-209, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.12.001>

PRETTI, C.; COGNETTI-VARRIABLE, A.M. The use of biomarkers in aquatic biomonitoring: the example of esterases. **Aquatic. Conser.: Mar. Freshw. Ecosyst.**, v.11, p. 299 – 303, 2011. <https://doi.org/10.1002/aqc.457>

RAMÍREZ-MUÑOZ, M.P.; ZUÑIGA, G.; BUGARÍN, O.T.; PORTILLA, E.; GARCÍA-MARTINEZ, D.; RAMOS, A.; CANTÚ, J.M.; SÁNCHEZ-CORONA, J. Evaluation of the Micronucleus Test in Peripheral Blood Erythrocytes by Use of the Splenectomized Model. **Labor. Ann. Sci.**, v.49, n.4, p.418-20, 1999.

RAPPORT, David J. Evolution of indicators of ecosystem health. IN: *Ecological indicators*. Springer US, 1992. p. 121-134. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4659-7_9

ROSA, R.; LIMA, S.C.; ASSUNÇÃO, L.W. Abordagem preliminar das condições climáticas de Uberlândia (MG). **Socied. Nat.**, v.3, n.5, p.91-108, 1991.

ROUX, K.E.; MARRA, P.P. The presence and impact of environmental lead in passerine birds along an urban to rural land use gradient. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v.53, p.:261-268, 2007. <https://doi.org/10.1007/s00244-006-0174-4>

RUDKIN, C.; SEWART, G.D. Behaviour of hens in cages: A pilot study using video tapes. A report for the Rural Industries Research and Development Corporation (RIRDC). **Queensland**, v.40, p.102, 2003.

RZHETSKY, A.; NEI, M. Theoretical Foundation of the Minimum-Evolution Method of Phylogenetic Inference. **Mol. Biol. Evol.**, v.10, n.5., p. 1073-1095, 1993.

RUIZ-GUZMÁN, J.A; GÓMEZ-CORALES, P.; CRUZ-EZQUIVEL, A.; MARRUGO-NEGRENTE, J.L. Cytogenetic damage in peripheral blood lymphocytes of children exposed to pesticides in agricultural areas of the department of Cordoba, Colombia. **Mutat. Res. Gen. Toxicol. Environ. Mutag.**, v.824, p.25-31, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2017.10.002>

RZHETSKY, A; KUMAR, S; NEI, M. Four cluster analysis: a simple method to test phylogenetic hypotheses. **Mol. Biol. Evol.**, v.12, p.163-67, 1995.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040185>

SALEH, K. e SARHAN, M. Clastogenic analysis of chicken farms using micronucleus test in peripheral blood. **J. Applied Sci. Res.**, v. 3, p.1646-1649. 2007.

SCHAUMBURG, L.G.; POLETTA, G.L.; SIROSKI, P.A.; MUDRY, M.D. Baseline values of Micronuclei and Comet Assay in the lizard *Tupinambis merianae* (Teiidae, Squamata). **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v.84, p.99-103, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.06.023>

SCHIMID, W.; ARAKAKI, D.T.; BIESLAU, A.; CULBERTSON, J.C. The Chinese Hamster Bone Marrow as an in vivo Test System I. Cytogenetic Results on Basic Aspects of the Methodology, Obtained with Alkylating Agents, **Humangenetik**, v.11, p.103-118, 1971.
<https://doi.org/10.1007/BF00393791>

SCHMID, W. Chemical Mutagen Testing on in vivo Somatic Mammalian Cells. **Agents Actions**, v.3, n.2., p.77-85, 1973. <https://doi.org/10.1007/BF01986538>

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutat. Res.**, v.31.p.9-5, 1975.
[https://doi.org/10.1016/0165-1161\(75\)90058-8](https://doi.org/10.1016/0165-1161(75)90058-8)

SHEBL, M.A., NAGLAA, A.H. e MOTAWE, H.F.A. Genotoxic studies of yeast cell wall (YCW) and hydrated sodium calcium aluminosilicate (HSCAS) on DNA damage and chromosomal aberrations induced by aflatoxin in Broiler. **J. Am. Sci.** v.6, n.6, p.961-967, 2010.

SICK, H. **Ornitologia Brasileira**, 1st ed. Editora Nova Fronteira, 1997, 912p.

SIGRIST, T. **Guia de campo Avis Brasilis**: avifauna brasileira, 1st ed. São Paulo: Avis Brasilis, 2013.

SILVA, J. M.; BATES, J. M. Biogeographic patterns and conservation in the South American Cerrado: A tropical savanna hotspot. **Bioscience**, v.52, p.225-233, 2002.
[https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2002\)052\[0225:BPACIT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2002)052[0225:BPACIT]2.0.CO;2)

SILVA, J.M.C. **Birds of the Cerrado Region, South America. Steentrupia**, v.21, n.2, p.69-92, 1995.

SOUTO, H.N.; CAMPOS JÚNIOR, E.O.; CAMPOS, C.F.; RODRIGUES, T.S.; PEREIRA, B.B.; MORELLI, S. Biomonitoring birds: the use of a micronuclei test as a tool to assess environmental pollutants on coffee farms in southeast Brazil. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, v.25, p.24084-24092, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2466-4>

STONCIUS, D. Spontaneus micronuclei in embryos of the Black-headed Gull (*Larus ridibundus*, L.) populations. **Ekol.**, v.1, p.63-66, 2003. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(03\)00092-5](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(03)00092-5)

SZÖLLÓSI, G.J.; DAUBIN V. Modeling gene family evolution and reconciling phylogenetic discord. **Methods Mol. Biol.**, v.856, p.29-51, 2012. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-585-5_2

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance,

and Maximum Parsimony Methods. **Mol. Biol. Evol.**, v.28, p.2731–2739, 2011.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msr121>

TEBOURBI, O.; SAKLY, M.; RHOUMA, K.B. Molecular mechanisms of pesticides toxicity.
IN: Stoycheva M (ed) Pesticides in the modern world: pests control and pesticides exposure and toxicity assessment, InTech, 2011, p. 289-332. ISBN 978-953-307-457-3.

TEMPLE, S.A. Can Birds be indicators of Environmental Hazards? **The Passenger Pigeon**, v.50, n.4, p.311-313, 1988.

TERRADAS M, MARTIN M, TUSELL L, GENTESCA, A. Genetic activities in micronuclei: is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell? **Mutat Res.**, v.705, n.1, p.60-67, 2010.
<https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2010.03.004>

THODAY, J.M. Radiation induced chromosome breakage, desoxyribose-nucleic acid synthesis and the mitotic cycle in root-meristem cells of *Vicia faba*. **New Phytologist**, v.53, n.3, p.511-516. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1954.tb05257.x>

TORREZ-BUGARIN, O., ZAVALA-CERNA, M.G., NAVA, A., GARCIA-FLORES, A. e RAMOS-IBARRA, M.L. Potential use, limitations and basic procedures of micronuclei and nuclear abnormalities in buccal cells. **Disease Marks**, p.13, 2014. doi: 10.1155/2014/956835. <https://doi.org/10.1155/2014/956835>

UDROIU, I; VIGNOLI, L.; BOLOGNA, M.A.; D'AMEN, M.; SALVI, D.; RUZZA, A.; ANTOCCIA, A.; TANZARELLA, C. Micronucleus test on *Triturus carnifex* as a tool for environmental biomonitoring. **Environ. Mol. Mutag.**, v.56, n.4, p.412-417, 2014.
<https://doi.org/10.1002/em.21914>

UEKER, M.E.; SILVA-MONTEIRO, V.; MOI, G.P.; PIGNATI, W.A.; MATTOS, I.E.; SILVA-CÂNDIDO, A.G. Parenteral exposure to pesticides and occurrence of congenital malformations: hospital-based case-control study. **BMC Pediatrics**, v.16, n.125, p.1-7, 2016. <https://doi.org/10.1186/s12887-016-0667-x>

VAN DER MARK, M.; VERMEULEN, R.; NIJSSEN, P.C.G.; MULLENERS, W.M.; SAS, A.M.G.; LAAR, T.V.; BROUWER, M.; HUSS, A.; KROMHOUT. H. Occupational exposure to pesticides and endotoxin and Parkinson disease in the Netherlands. **Occup. Environ. Med.**, v.71, p.757–764. 2014. <https://doi.org/10.1136/oemed-2014-102170>

VAN MAELE-FABRY, G.; LANTIN, A.C.; HOET, P.; LISON, D. Childhood leukaemia and parental occupational exposure to pesticides: a systematic review and meta-analysis. **Cancer Causes Control**, v.21, n.6, p.787-809, 2010. <https://doi.org/10.1007/s10552-010-9516-7>

WITECK, A.J. **Dados preliminares sobre *Falco peregrinus* na cidade de Rio Grande/RS.** Anais do III Encontro Nacional de Anilhadores de Aves. São Leopoldo, RS, 1988, p. 117-119.

WOOSE, C.R. Interpreting the universal phylogenetic tree. **PNAS**, v.97, n.15, p.8392-8396. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.15.8392>

ZUCKERKANDL, e.; PAULING, L. Molecules as Documents of Evolutionary History. **J. Theoret. Biol.**, v.8, p.357-366, 1965. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(65\)90083-4](https://doi.org/10.1016/0022-5193(65)90083-4)

ZÚÑIGA-GONZÁLEZ, G.; TORRES-BUGARÍN, O.; ZAMORA-PÉREZ, A.; GOMEZ-MEDA, B.C.; RAMOS-IBARRA, M.L.; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ S.; GONZÁLEZ-RODRIGUEZ, A.; LUNA-AGUIRRE, J.; RAMOS-MORA, A.; ONTIVEROS-LIRA, D.; GALLEGOS-ARREOLA, M.P. Differences on the number of micronucleated erythrocytes among young and adult animals including humans. Spontaneous micronuclei in 43 species. **Mutat. Res.**, v.494, p.161-167, 2001. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(01\)00180-2](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(01)00180-2)

ZUÑINGA-GONZALES, G.; TORRES-BUGARÍN, O.; LUNA-AGUIRRE, J.; GONZALES-RODRIGUEZ, A.; ZAMORA-PERES, A.; GÓMEZ-MEDA, B.C.; VENTURA-AGUILAR, A.J.; RAMOS-IBARRA, M.L.; RAMOS-MORA, A.; ORTÍZ, G.G.; GALLEGOS-ARREOLA, M.P. Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 54 animal species (mammals, reptiles and birds): Part two. **Mutat. Res.**, v.467, p.99-103, 2000. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(00\)00021-8](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(00)00021-8)

ANEXO I



Universidade Federal de Uberlândia

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)

Rua Ceará, S/N - Bloco 2T, sala 113 – CEP 38405-315

Campus Umuarama – Uberlândia/MG – Ramal (VoIP) 3423;

e-mail:ceua@propp.ufu.br; www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL N° 066/18 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 120/15

Projeto Pesquisa: "Análise de micronúcleos em aves no biomonitoramento de fragmentos florestais do cerrado"

Pesquisador Responsável: Sandra Morelli

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

SITUAÇÃO: SOLICITAÇÃO DE ADENDO APROVADA.

ALTERAÇÕES APROVADAS: Alteração de período de vigência (De: 01/01/2016 a 01/06/2018 - Para: 01/01/2016 a 01/06/2019).

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 07 de maio de 2018.

Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão

Coordenador da CEUA/UFU

ANEXO II

Artigo Científico

Periódico: **Environmental Science Pollution Research**

Fator de impacto: **2.914**

Biomonitoring birds: the use of a micronuclei test as a tool to assess environmental pollutants on coffee farms in southeast Brazil

Henrique Nazareth Souto¹  & Edimar Olegário de Campos Júnior¹ & Carlos Fernando Campos¹ & Tamiris Sabrina Rodrigues¹ & Boscolli Barbosa Pereira² & Sandra Morelli¹

Received: 21 March 2018 / Accepted: 31 May 2018
Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Abstract

Birds have often played an important role as environmental bioindicators, and different species can be useful due to their bioaccumulating capacity. The micronuclei test is a cytologic technique used for accessing DNA and is a biomarker for damage to DNA. This study analysed the Cerrado avian community, especially the efficiency of the blue-black grassquit (*Volatinia jacarina*) in responding to pesticide contamination in situ on different-sized coffee farms in southeast Brazil. The micronuclei test was used in erythrocytes of birds. Eighty-two individuals of 21 bird species belonging to 11 families that were found in all study areas were used to evaluate micronuclei (MN) frequency. Two hundred fifty-two MN were counted in every area of study. The MN average count was 3/10,000 erythrocytes, and 17.1% of all bird species exhibited no MN. The average MN was 1.29 ± 0.69 in small farms, 2.59 ± 1.65 in medium farms, and 5.41 ± 1.34 in large farms. Small farms accounted for 14.3% of MN frequency, medium farms 27.8%, and large farms 57.9%. *V. jacarina* was the most abundant species found and displayed a sensitive response to environmental contamination. Pesticides appear to induce MN formation in a dose-dependent way when farms are analyzed according to their area. Therefore, biomonitoring birds remain an efficient means to detect environmental pollutants, especially pesticides. *V. jacarina* responds as a sensitive biomonitor, showing a dose-dependent response to pesticides used in coffee farms.

Keywords Pesticides . Biomarker . Erythrocytes micronuclei test . *Volatinia jacarina*

Introduction

Interactions between organisms and the environment represent a key factor in understanding the relationship between health and diseases (Colborn 2006; Gomes et al. 2017). Therefore, exposure to different classes of stressor agents disrupts cell homeostasis, driving the organism to adaptation, changes in physiology and behaviour, or death (Begon 2007b; Kunc et al. 2016).

Responsible editor: Philippe Garrigues

* Henrique Nazareth Souto
henriquenazareth@hotmail.com

¹ Department of Genetics and Biochemistry, Universidade Federal de Uberlândia, Avenida Pará, 1920, Campus Umuarama, Jardim Umuarama, Bloco 2E - Sala 244, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil

² Institute of Geography, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil

Published online: 09 June 2018

The use of chemical compounds in human activities has caused many impacts on animal species (ChapaVargas et al. 2010). Environmental

changes have been monitored physically, chemically, biologically, or by mixing these categories. Birds have often played an important role as environmental bioindicators since canaries were first used in mines (Burrell and Siebert 1916) and top bird predators such as hawks and seabirds were assessed as bioindicators of pesticide accumulation in the 1960s (Moore 1965). Bird species are useful due to their bioaccumulating capacity (Kursa and Berzukov 2007; Monzalvo-Santos et al. 2016), varied species and long lifespan, which help in the understanding of the effects of environmental stresses over time (Becker 2003; Pollack et al. 2017).

Pesticides form an important class of stressor agents, to which the world population has been chronically exposed over the years. At the cellular level, responses to toxic and stressor agents have occurred in multiple forms, such as interference in signalling pathways caused by alterations in cell activity, which have been assessed by means of mutagenic biomarkers (Baesse et al. 2015).

Brazil ranks in first place in pesticide use worldwide (Brasil 2016). This fact is directly associated with the high output capacity of different crops, such as coffee, once that crop is subjected to permanent pest control. In fact, the Brazilian coffee output, reported by the International Coffee Organization (2017), is higher than the yield of Asia and Oceania together.

The micronuclei test (MNT) is a cytologic technique developed by Heddle (1973) and Schmid (1975) and has been used to assess the captive bird response to stressors (GomezMeda et al. 2006) and the toxicological effects of heavy metal contamination on birds (Gomes et al. 2017; Markowski et al. 2013; Olayemi et al. 2014) and after mitomycin-C treatment (Gomez-Meda et al. 2006). Therefore, the presence of micronuclei (MN) in the cell is considered as a biomarker of damage to DNA.

This paper analyses the mutagenic effects in bird communities, especially efficiency of the blue-black grassquit (*Volatinia jacarina*) in responding to pesticide contamination in situ in different-sized coffee farms surrounding the city of Monte Carmelo, Minas Gerais, southeast Brazil. We tested the following hypotheses: (a) Different species of birds in certain locations respond in the same way to an environmental disturbance. To test this hypothesis, we determined whether we can use (a) different bird species instead just one to evaluate the response of MN erythrocytes in the presence of pesticides; and (b) *Volatinia jacarina* can be used as a good biomonitoring bird.

Material and methods

Study areas

Three coffee farms with similar environmental characteristics but different productive capacities were categorised into three group sizes (small, medium and large). They were carefully chosen for to the presence of similar environmental characteristics were grouped for sample wild birds of the Cerrado. All nine farms were composed of a mosaic of fragments of Cerrado and grassland. Small farms were scaled at up to 20 ha, medium farms between 20 and 50 ha, and large farms greater than 50 ha of productive area. The average coffee output of these farms reaches about 50 sacks/ha. The minimum and

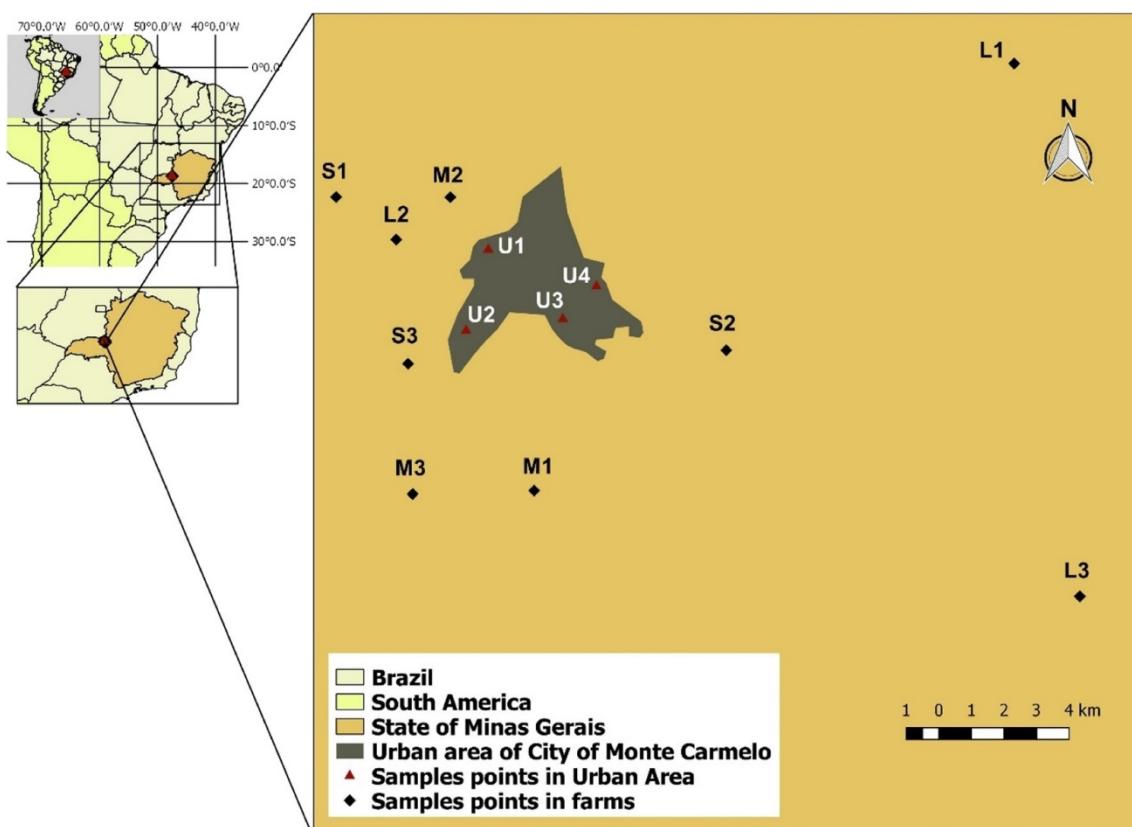


Fig. 1 Farm locations near the City of Monte Carmelo, Minas Gerais, M3), and Large (L1, L2, and L3) and four urban points (U1, U2, U3 and Brazil, where blood samples were collected from birds. Three categories U4) were chosen as points of observation at the borders of urban areas of farms were selected: small (S1, S2, and S3), medium (M1, M2, and

maximum distances between two farms are about 3 and 30 km, respectively (Fig. 1). The farms have an

International Stamp Rain Forest Certification and thus a carefully controlled pesticide programme. The same classes of pesticides and application protocol are used throughout the year, with little variation in frequency, concentration, brand, and manufacture (Table 1). Furthermore, information collected from farmers and soil analyses indicated that all farms in this study use pesticides on coffee crops, but it is expected that small farms have fewer amounts of pesticides than do large farms, following a concentration gradient or application frequency. Additionally, four sample points in urban areas were chosen to test whether birds visited or crossed these areas. None of 82 birds marked on the farms (see Birds in Data collection) was seen in urban areas.

The climate of the City of Monte Carmelo ($18^{\circ} 47' 56.98''$ S; $47^{\circ} 19' 3.64''$ W), Minas Gerais, Brazil, according to Köppen–Geiser classification is Aw tropical and savanna, showing seasonality with rain from October to April and a dry season from March to September (Rosa et al. 1991). All sample areas are farms surrounding the city of this study. Coffee (*Coffea arabica*) is cultivated with conventional growing techniques on these farms.

Data collection

Birds

After gaining authorisation from the Institute of Environmental and Natural Resources (IBAMA) (n°50528-1) and the Ethics Committee on the use of Animals in Research (CEUA/UFU 120/15), birds were collected with mist nets ($12\text{ m} \times 3\text{ m}$) exposed from 6 a.m. to 5 p.m. from January to the end of October

2016, when birds were systematically collected, reaching upwards of seven individuals of the more abundant species. Every bird species captured was identified at the species level according to Sigrist (2013). All individuals were marked with non-toxic paint, with a different colour (green for small areas, yellow for medium areas and red for large areas for each study area) according to Rudkin and Stewart (2003) to confirm the residence of birds in the study area. Additional observations (40 h) were performed at all sample points searching for marked birds. No birds marked in a specific study area were found in a different area. Birds were grouped according to the Brazilian Committee of

Table 1 Pesticide application schedule in three groups of farms (small, medium, and large) through the years 2015 and 2016

Formulated product	Farms	Volume of active compound (g ha ⁻¹)*	Volume in syrup	Frequency of application/ month	Application technique	Month of application
Tutor, Redshield, or Supera	Small	900	0.5 L ha ⁻¹	1×	Manual spraying	August
	Medium	900	0.5 L ha ⁻¹	1×	Manual spraying	
	Large	1100	1 L ha ⁻¹	1×	Mechanised spraying	
Copper sulfate (syrup BBordaleza [^])	Small	150	150 g ha ⁻¹	1×	Manual spraying	January, March and May
	Medium	150	150 g ha ⁻¹	1×	Manual spraying	
	Large	150	15 L ha ⁻¹	2×	Mechanised spraying	
Comet (BASF)	Small	150	5 L ha ⁻¹	1×	Manual spraying	September and October
	Medium	150	—	1×	Manual spraying	
	Large	200	5 L ha ⁻¹	1×	Mechanised spraying	
Opera	Small	274.5	500 L ha ⁻¹	1×	Manual spraying	February, April and December
	Medium	274.5	—	1×	Manual spraying	
	Large	274.5	500 L ha ⁻¹	1×	Mechanised spraying	
Premier	Small	0.7	50 ml plant ⁻¹	1×	Manual spraying	February
	Medium	0.84	50 ml plant ⁻¹	2×	Manual spraying	
	Large	0.84	50 ml plant ⁻¹	2×	Mechanised spraying	
Oberon	Small	0.2	400 ml ha ⁻¹	1×	Manual spraying	August and September
	Medium	0.2	600 ml ha ⁻¹	1×	Manual spraying	
	Large	0.5	800 ml ha ⁻¹	2×	Mechanised spraying	
Altacor	Small	31.5	4 L ha ⁻¹	1×	Manual spraying	March and April
	Medium	31.5	4 L ha ⁻¹	1×	Manual spraying	
	Large	31.5	4 L ha ⁻¹	1×	Mechanised spraying	

Data based on reports available in the farms

*Manufacturer's recommendation

Ornithological Records (CBRO) in Brazilian Portuguese (CBRO 2015).

Comparing bird species

The most abundant species found in the study area, the blueblack grassquit (*Volatinia jacarina*), was used separately to perform analysis with MN number and farm size. All other bird species were used together to compare MN number with *V. jacarina*, and we performed an analysis to test the hypothesis of the birds' body part correlations.

Blood samples, micronuclei tests, and staining

For birds on farms, blood samples were collected from 82 individuals via the metatarsal vein with needle drilling, and one or two blood drops were placed directly onto slides. Then, fresh blood samples of each bird were smeared onto slides in the field (one slide per bird). Subsequently, the slides were taken to the Cytogenetics Laboratory of the Federal University of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil, for staining. The slides were fixed with absolute methanol for 10 min and stained in aqueous Giemsa (5%) for 10 min and washed with distilled water (Palhares and Grisolia 2002).

Evaluation of micronuclei

For each slide, 10,000 cells were analysed to count micronucleated erythrocytes, which were analysed using a binocular microscope (Olympus) with a 100 \times oil-immersion lens. As described by Fenech (2000), we considered MN according to the following criteria: (a) they should not be linked to the main nucleus; (b) they should be in the same plane of focus with the same colour as the main nucleus; and (c) they should be one tenth to one third the diameter of the main nucleus.

Soil analysis

Soil samples from each area were collected and submitted to a commercial laboratory to detect indirect traces of pesticides. These analyses were performed in the Labras Laboratory located in Monte Carmelo, Minas Gerais, Brazil. A set of heavy metals was assessed as a parameter to ascertain soil contamination, according to guidelines of the Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) in accordance with normative resolution n. 420/2009. We show soil data of just copper, as

Table 2 Species of birds included in the current study grouped by family in three classes of study area (small farms; medium farms; large farms) located in Monte Carmelo, Minas Gerais, Brazil. The bird classification was based on the Brazilian Committee of Ornithological Records (CBRO 2015)

Family	Species of bird	Common name	Small farms	Medium Farms	Large Farms
Columbidae	<i>Columbina talpacoti</i>	Ruddy Ground-Dove	1	–	–
	<i>Leptotila rufaxilla</i>	Grey-fronted Dove	–	–	1
Cuculidae	<i>Crotophaga ani</i>	Smooth-billed Ani	1	1	2
	<i>Guira guira</i>	Guira Cuckoo	2	3	1
Galbulidae	<i>Galbula ruficauda</i>	Rufous-tailed Jacamar	1	1	1
Icteridae	<i>Gnorimopsar chopi</i>	Chopi Blackbird	2	–	2
	<i>Molothrus bonariensis</i>	Shiny Cowbird	1	1	1
Mimidae	<i>Mimus saturninus</i>	Chalk-browed Mockingbird	–	1	

Passerellidae	<i>Zonotrichia capensis</i>	Rufous-collared Sparrow	1	2	1
Passeridae	<i>Passer domesticus</i>	House Sparrow	—	1	2
Thamnophilidae	<i>Thamnophilus doliatus</i>	Barred Antshrike	1	—	1
	<i>Thamnophilus torquatus</i>	Rufous-winged Antshrike	1	—	—
Thraupidae	<i>Dacnis cayana</i>	Blue Dacnis	2	1	—
	<i>Tangara sayaca</i>	Sayaca Tanager	1	1	—
	<i>Tersina viridis</i>	Swallow Tanager	—	1	—
	<i>Volatinia jacarina</i>	Blue-black Grassquit	7	7	7
Turdidae	<i>Turdus leucomelas</i>	Pale-breasted Thrush	1	1	1
	<i>Turdus rufiventris</i>	Rufous-bellied Thrush	1	1	2
Tyrannidae	<i>Elaenia flavogaster</i>	Yellow-bellied Elaenia	1	1	1
	<i>Myiozetetes similis</i>	Social Flycatcher	3	2	2
	<i>Suiriri suiriri</i>	Suiriri Flycatcher	1	2	2
	<i>Sum of collected birds</i>		28	27	27

Table 3 Sample size, number of micronuclei, feeding guild, and descriptive statistic for every species of bird found in the three group sizes sampled: small farms, medium farms, and large farms

Areas of study	n	Average number of MN/10,000 ^a	p ^b	Feeding guild	n	Average number of MN/10,000 ^a	p ^b
Small farms	28	1.29 ± 0.69	< 0.0001	Insectivorous birds	17	2.35 ± 4.44	= 0.3049
Medium farms	27	2.59 ± 1.65*	< 0.05	Granivorous birds	27	3.15 ± 2.16	
Large farms	27	5.41 ± 1.34*	< 0.05	Omnivorous birds	38	3.34 ± 2.23	

^a

Average ± standard deviation

^b Probability associated to the null hypothesis comparing different areas and feeding guilds. Parametric tests: one-way ANOVA

*Statistically significant difference when compared with small farms

some pesticides use it as an active compound, and nickel, because of its potential toxicity according to Nędzarek et al. (2013) in a study with coffee.

Statistical analysis

Statistical normality analysis (Kolmogorov-Smirnov) was performed to determine whether the data were in a normal distribution. Once verified, the data normality used a oneway analysis of variance (ANOVA) to determine whether the MN value in erythrocytes differed between areas and between feeding guild. A principal component

analysis (PCA) was performed to determine the most important correlation between MN and the dependent variables in birds (body size, bill length, wing length and tail length). Thus, we performed a Pearson correlation of the principal component found by PCA. This study considered a probability value of $p < 0.05$ to indicate a statistically significant difference between samples.

Results and discussion

Eight-two individuals of 21 bird species belonging to 11 families were found in all study

areas and were used to evaluate MN frequency (Table 2). Similar data of the number of bird families were found by Baesse et al. (2015), who worked in a natural fragment of Cerrado located approximately 120 km away from our areas of study. These general data of all species of birds analysed together were important to make comparisons between the most abundant species found in this study and comparing them the MN response of *V. jacarina* and its efficiency as biomonitor of landscapes influenced by pesticide use.

Two hundred fifty-two MN were scored in all study areas, summarising all species of birds together. The MN average, regardless of bird species and sampling area, was 3/10,000 erythrocytes, and 17.1% of all bird species exhibited no MN. The average MN was 1.29 ± 0.69 in small farms, 2.59 ± 1.65 in medium farms,

Fig. 2 a *Volatinia jacarina* trapped in study area. b One-way ANOVA data
ANOVA of MN frequency of *Volatinia jacarina* species found in three sizes of farms in the City of Monte Carmelo, Minas Gerais, Brazil ($F = 15.61$; $p < 0.00001$). Similar letters inside the graph area mean no statistical significance between groups; unlike different letters

and 5.41 ± 1.34 in large farms. Small farms accounted for 14.3% of MN frequency, medium farms 27.8%, and large farms 57.9%. In healthy birds of different species kept in a Guadalajara Zoo, the average MN count/ 10,000 erythrocytes was 1.19 ± 2.13 (Zuñiga-González et al. 2000), similar to our finding for small farms. Baesse et al. (2015), in a study on four Cerrado fragments under the influence of an urban perimeter, discovered that fragments near an urban environment showed a six-fold greater MN average compared to fragments away from urban influence. In our work, the average and standard deviation of MN frequency per area (Table 3) were statistically significantly fourfold higher in large farms and two-fold higher in medium farms

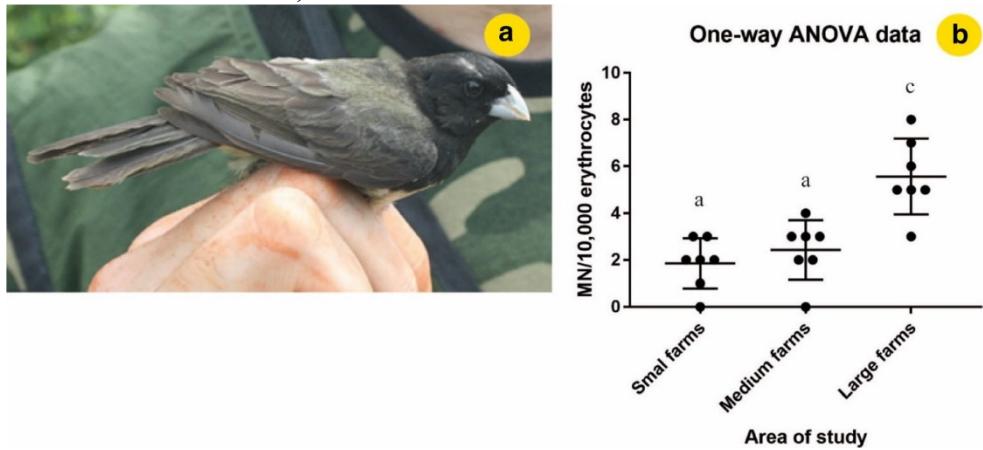
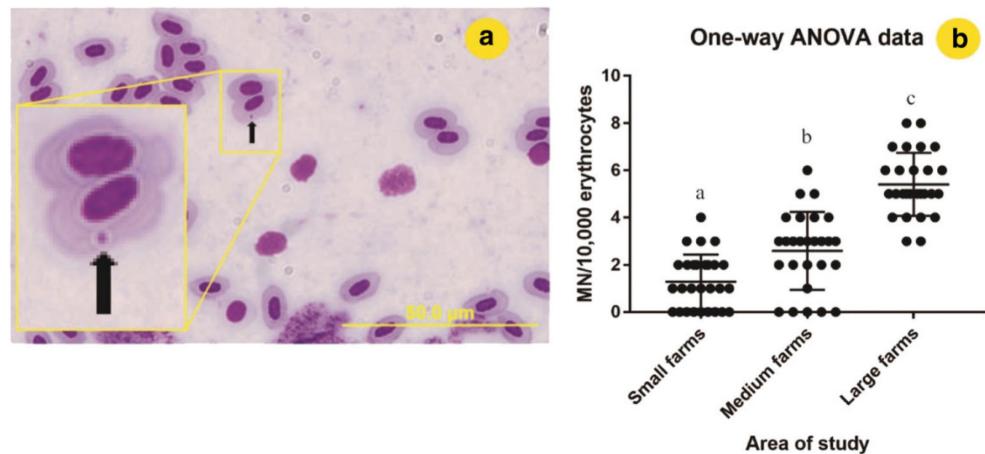


Fig. 3 a Erythrocytes of *Volatinia jacarina* (1000 \times) coloured with Giemsa; the presence of MN is indicated by arrows. b One-way ANOVA of MN constructed with all bird species found in three sizes of farms in the City of Monte Carmelo, Minas Gerais, Brazil ($F = 62.79$; $P < 0.0001$). Similar letters inside the graph area mean no statistical significance between groups; unlike different letters



when compared to small farms ($F = 62.79$, $p < 0.0001$). Thus, these data corroborate the hypothesis that large areas disperse more pesticides than small areas, affecting, in this way, bird erythrocytes. The MN count found in small farms in this study was similar to that found by Baesse et al. (2015) in fragments of Cerrado influenced by urban areas. In this same study, birds in natural fragments showed an MN average of 0.7, approximately 50% less than the count in small farms.

Molotrus bonariensis, *Galbula ruficauda*, *Passer domesticus*, *Turdus leucomelas*, and *V. jacarina* in large farms showed higher frequency of MN among all study areas.

Particularly for *V. jacarina*, we performed a separate statistical analysis and found almost the same MN formation in erythrocytes of these birds when compared to all groups (Fig. 2). There was clear evidence of MN increasing in large farms when we compared small and medium farms ($F = 15.61$; $p < 0.0001$). The average MN count for this species of bird was similar to that found in all groups: 3/10,000 erythrocytes, and only 9.5% of birds exhibited no MN. The average MN was

1.86 ± 1.07 in small farms, 2.43 ± 1.27 in medium farms, and 5.57 ± 1.62 in large farms. Small farms accounted for 18.9% of MN frequency, medium farms 24.6%, and large farms 56.5%. After evaluating the response of *V. jacarina* to pesticides in different areas, the percentage of individuals without MN was lower in *V. jacarina* compared to other species analysed simultaneously (Fig. 3). In addition, the average number of MN in *V. jacarina* was higher than all species in small farms (Fig. 3 and Table 4). Therefore, these results may indicate that *V. jacarina* is a good candidate for a sensitive biomonitor species.

V. jacarina (Fig. 2a) is predominantly a seed disperser (Fontoura and Orsi 2013) and is a widespread bird species that inhabits the Cerrado. It is a common species of the family Thraupidae, which includes more than 170 species. This species can be found in open areas, grasslands, forest edges, and in anthropic areas such as farms and urban environments. *V. jacarina* is about 4.3 in. in length and shows sexual dimorphism. Males are predominantly blue-black with colourful feathering, except in white axillar regions, and females and nestlings are brown (Sick 1997; Sigrist 2013). These characteristics point to the species as a good biomonitor candidate (Becker 2003).

The PCA showed that the size of the bird is the main factor influencing the increased MN frequency, explaining 95% of the relationship with this dependent variable. Together, the size of the bird and the bill length explained almost 100% of MN frequency (Fig. 4). However, the correlation between the size of the birds and the MN count showed no statistical significance ($r = -0.09$, $p = 0.44$). Therefore, we can conclude that a large body surface increases the chance of birds contacting pesticides.

Table 4 Samples size, number of micronuclei, and descriptive statistics for all bird species compared to *Volatinia jacarina* found in the three group sizes sampled: small, medium, and large farms

Areas of study	All species of birds found in area of study	Average number of MN/10,000 ^a	p ^b	<i>Volatinia jacarina</i>	Average number of MN/10,000 ^a	p ^b
Small farms	n = 28	1.29 ± 0.69	< 0.0001	n = 7	1.86 ± 1.07	< 0.0001
Medium farms	n = 27	2.59 ± 1.65*		n = 7	2.43 ± 1.27	
Large farms	n = 27	5.41 ± 1.34*		n = 7	5.57 ± 1.62*	

*Statistical difference when compared to small farms

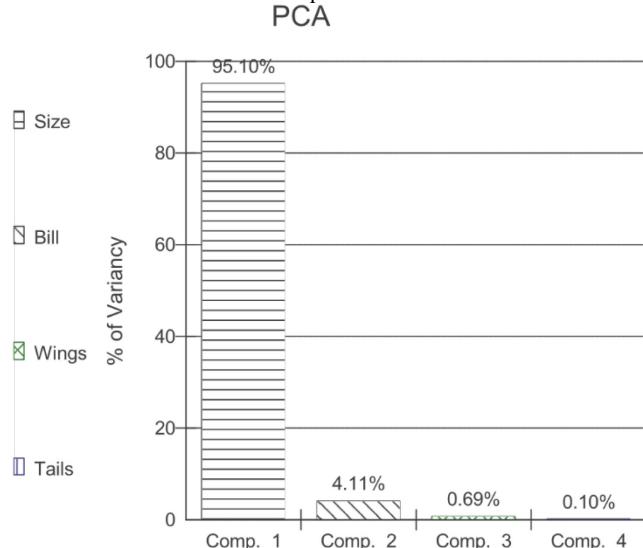


Fig. 4 Principal component analysis showing two major variables correlated with MN frequency

Table 5 Heavy metal analyses of soil of three farm sizes located in the City of Monte Carmelo, Minas Gerais, Brazil

Farms	Heavy metal	
	Nickel (mg dm ⁻³)	Copper (mg dm ⁻³)
Small	0.13	0.23
Medium	0.10	0.25
Large	0.32	0.60

We also tested a hypothesis of the relationship between feeding guild and MN frequency in erythrocytes (Table 3). Regarding the potential sources of pesticide contamination, we believed that insectivorous birds would become more contaminated than granivorous or omnivorous birds, as there would be insects more readily available after pesticide administration in the cropping system. However, we could not find a statistical difference between members of the feeding guilds analysed. Such data suggest another main source of contamination than food, such as water ingestion or via air. Roux and Marra (2007) proved

that birds can be exposed to heavy metals externally by physical contact or internally via ingestion. Therefore, water and food consumption lead to direct contamination by pesticides. On the other hand, air contamination would have two major input routes into bird bodies: (a) the respiratory system and (b) via feather contamination. PCA data suggest feather contamination, as almost 100% of MN variation can be explained by the size and bill length of the birds. Every species of bird developed a preening behaviour to clean and impermeabilise its feathers, removing parasites and dust and aligning its feathers to maximise flight performance (Sick 1997), thereby improving fitness (Begon et al. 2007a). Thus, pesticide contamination is not a visible trait commonly registered by ecologists in field studies, but it can affect the survival, reproduction, or physiology of birds, such as by food consumption or selection of habitat. In fact, as demonstrated by Hogstedt (1981), food resources are the main factor limiting the reproduction and mortality of birds.

Table 6 List of all pesticides used throughout the life cycle of *Coffea arabica* during 1 year of cropping coffee, class, and toxicological classification of pesticide

Formulated product	Class of pesticide	Toxicological classification ^a
Fungicides and/or bactericides		
Tutor, Redshield or Supera	Copper ^{b, c}	II
Copper sulfate (syrup BBordaleza ^A)	Copper ^{b, c}	II
Comet (BASF)	Piraclostrobin ^b	II
Opera	Epoxiconazole ^b	II
Insecticides and/or acaricides		
Premier	Neonicotinoid ^b	IV
Oberon	Espiromesifen ^b	III
Altacor	Clorantraniliprole ^b	III

^a Pesticide classification according to the Brazilian National Law N° 7802/1989. The classification is based on DL50 test and is scored as I (extremely toxic: DL50 < 500 mg, 1000 mg of height), II (highly toxic: 50 mg < DL50, 50 mg/1000 mg of height), III (moderately toxic: 500 mg < DL50, 5000 mg/1000 mg of height), and IV (lowly toxic: DL50 > 5000 mg, 1000 mg of height)

- ^b Verified by interview with farm employees
- ^c Verified by soil analysis

Indirect soil analyses indicated the presence of heavy metal in the samples and can confirm three possible pesticides in this study: Tutor, Redshield and Supera, besides the treatment against mould with copper sulphate (Tables 5 and 6). However, soil analysis indicated no contamination according to reference values of quality (RVQs) recommended in CONAMA normative resolution n.420 (CONAMA 2009). The other pesticides were confirmed by interview with farm employees (Table 6). Bhunya and Jena (1996) proved the clastogenic effects of copper sulphate when evaluating both MN and chromosome aberration in chicks. They found a significant increase in MN counts, revealing the potential genotoxicity of CuSO₄ in the birds' systems. Gomes et al. (2009) demonstrated the role of *Ardea albus* (great egret) in the biomonitoring of aquatic ecosystems searching for mercury contamination. Markowski et al. (2013) conducted an experiment by contaminating food with lead acetate solution at a non-poisonous level and found lead on the feathers on the 15th day of exposure. In general, pesticides have the chemical property of high reactivity acting on the nuclear centre of biomolecules, including DNA, causing DNA damage (Crosby 1982).

In a classic review exploring the molecular mechanism of nickel over time, Cameron et al. (2011) showed the role of nickel in inducing genotoxicity in animal studies, and carcinogenicity in clinical studies. In low concentrations, however, nickel is considered as an essential micronutrient. The average amount of Ni intake in human diet via unknown origin is about 170 µg day⁻¹ and the main known food sources of Ni are tea, coffee, chocolate, soybeans, nuts, oatmeal, cabbage, spinach, and potatoes. For humans the tolerable upper intake level for Ni is 1 mg day⁻¹, so the intake of Ni via food is difficult to achieve by just one pathway. Our work demonstrated that large farms showed higher Ni concentration than the others (Table 5), this concentration being far from the tolerable upper intake for humans and probably has no effect on MN frequency for these areas.

In short, the residual detection of chemicals in the soil and increase of MN frequency found in farms with a crescent area indicate both the genotoxic potential of pesticides and the sensitivity of xenobiotic detection by birds.

Conclusions

Biomonitoring via birds remains an efficient means to detect environmental pollutants, including pesticides. *V. jacarina* responds as a sensitive biomonitor, showing an area size-dependent response to pesticides used on coffee farms. Contamination by pesticides appears to be related to air or feather cleaning behaviour, as food resources showed no statistical difference, rejecting our hypothesis. Contrary to our hypothesis, generalist birds found in the study areas were more likely to be contaminated by pesticides than were insectivorous birds, probably due to their diversified diet. The present work is a pioneer study on bird-pesticide interactions occurring on coffee farms and shows high potential for use in monitoring environmental health. Copper seems to influence MN frequency in synergy with other pesticides, contrary to nickel, which is used only on large farms and in low concentrations until achieve tolerable upper intake level comparing with humans.

Funding information: This research was supported by Coordination of Superior Level Staff Improvement (CAPES).

References

- Baesse CQ, Tolentino VCM, Silva-Marcos A, Silva-Andrade A, Ferreira GA, Paniago LPM, Nepomuceno JC, Melo C (2015) Micronucleus as biomarker of genotoxicity in birds from Brazilian Cerrado. *Ecotoxicol Environ Saf* 115:223–228
- Becker PH (2003) Biomonitoring with birds. In: Markert BA, Breure AM, Zechmeister HG (eds) *Bioindicators and biomonitoring*. Elsevier science. Elsevier, Amsterdam, pp 677–736
- Begon M, Mortimer M, Thompson DJ (2007a) *De indivíduos a ecossistemas*, 1rd edn. Artmed Editora, Porto Alegre, RS, p 752
- Begon MCR, Townsend E, Harper L (2007b) *Ecologia de Indivíduos a Ecossistemas*. 4^aed, Artmed, Porto Alegre
- Bhunya SP, Jena GB (1996) The evaluation of clastogenic potential of trichloroacetic acid (TCA) in chick *in vivo* test system. *Mut Res Gen Toxicol* 367:253–259
- Brasil (2016) Segurança Química: agrotóxicos. <http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/agrotoxicos>. Accessed 25 September 2017
- Burrell G, Siebert F (1916) Gases found in coal mines. *Mines circular* 14. Bureau of Mines. US Department of Interior, Washington, D.C.
- Cameron KS, Buchner V, Tchounwou PB (2011) Exploring the molecular mechanisms of nickel-induced genotoxicity and carcinogenicity: a literature review. *Rev Environ Health* 26(2):81–92
- CBRO – Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (2015). <http://www.cbro.org.br/Piacentini%20et%20al%202015%20RBO.pdf>. Accessed 21 March 2018
- Chapa-Vargas J, Mejía-Saavedra J, Monzalvo-Santos K, Puebla-Olivares F (2010) Blood lead concentrations in wild birds from a polluted mining region at Villa de la Paz, San Luis Potosí, Mexico. *J Environm Sci Health A* 45(1):90–98
- Colborn T (2006) A case for revisiting the safety of pesticides: a closer look at neurodevelopment. *Environ Health Perspect* 114:10–17
- CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente (2009) Resolução n° 420, 28 de Dezembro de 2009. Ministério do Meio Ambiente. <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=620>. Accessed 25 September 2017
- Crosby DG (1982) Pesticides as environmental mutagens. In: Fleck RA, Hollander A (eds) *Genetic toxicology: an agricultural perspective*. Plenum Press, New York, pp 201–218
- Fenech M (2000) The *in vitro* micronucleus technique. *Mutat Res* 455: 81–95
- Fontoura PM, Orsi ML (2013) Ecological partitioning of three Columbidae species in northern Paraná, southern Brazil. *Biota Neot* 3:0–6
- Gomes AL, Vieira JLF, Pinheiro MCN and Marceliano MLV (2009) A first evaluation on the use of *Ardea albus* feathers as bioindicators of mercury burden in Amazonian Ecosystems. *Acta Amaz* 39(4):969–972
- Gomes AR, Justino C, Rocha-Santos T, Freitas AC, Duarte AC, Pereira R (2017) Review of the ecotoxicological effects of emerging contaminants to soil biota. *J Environm Sci Health A* 52(10):1–16
- Gómez-Meda BC, Zamora-Perez AL, Luna-Aguirre J, González-Rodríguez A, Ramos-Ibarra ML, Torres-Bugarín O, BatistaGonzález CM, Zúñiga-González GM (2006) Nuclear abnormalities in erythrocytes of parrots (*Aratinga canicularis*) related to genotoxic damage. *Avian Pathol* 35:206–210
- Heddle JA (1973) A rapid *in vivo* test for chromosomal damage. *Mutat Res* 18:187–190
- Hogstedt G (1981) Effect of additional food on reproductive success in the magpie (*Pica pica*). *J Anim Ecol* 50:219–229
- International Coffee Organization (2017) Annual report. http://www.ico.org/trade_statistics.asp. Accessed 25 September 2017

- Kunc H, McLaughlin K, Rouven S (2016) Aquatic noise pollution: implications for individuals, populations, and ecosystems. *Proc R Soc London Ser B* 283(1836):1–8
- Kursa M, Berzukov V (2007) Health status of an Antarctic top predator: micronuclei frequency and white blood cell differentials in the South Polar Skua (*Catharacta maccorminck*). *Polarforschung* 37:1–5
- Markowski M, Kaliński A, Skwarska J, Wawrzyniak J, Bańbura M, Markowski J, Zieliński P, Bańbura J (2013) Avian feathers as bioindicators of the exposure to heavy metal contamination of food. *Bull Environ Contam Toxicol* 91:302–305
- Monzalvo-Santos K, Torre MCA, Chapa-Vargas L, Castro-Larragoitia J, Rodríguez-Estrella R (2016) Arsenic and lead contamination in soil and in feathers of three resident passerine species in a semi-arid mining region of the Mexican plateau. *Proc R Soc London, Ser A* 51(10):825–832
- Moore NW (1965) Pesticides and birds—a review of the situation in Great Britain in 1965. *Bird Study* 12(3):222–252. <https://doi.org/10.1080/00063656509476102>
- Nędzarek A, Tórz A, Karakiewicz B, Clark JS, Laszczyńska M, Kaleta A, Adler G (2013) Concentration of heavy metal in coffee. *Acta Biochim Pol* 60(4):623–627
- Olayemi OA, Taiwo AA, Jagun JA (2014) Micronucleus as a biomarker of genotoxicity in village weaver bird (*Ploceus cucullatus*). *World's Vet J* 4(4):48–53
- Palhares D, Grisolia CK (2002) Comparison between the micronuclei frequencies of kidney and gill erythrocytes in tilapia fish, following mitomycin C treatment. *Gen Mol Biol* 25(3):281–284
- Pollack L, Ondrasek N, Calisi RM (2017) Urban health and ecology: the promise of an avian biomonitoring tool. *Current Zool* 63:205–212
- Rosa R, Lima SC, Assunção LW (1991) Abordagem preliminar das condições climáticas de Uberlândia (MG). *Socied Nat* 3(5):91–108
- Roux KE, Marra PP (2007) The presence and impact of environmental lead in passerine birds along an urban to rural land use gradient. *Arch Environ Contam Toxicol* 53:261–268
- Rudkin C, Sewart GD (2003) Behaviour of hens in cages: a pilot study using video tapes. A report for the Rural Industries Research and Development Corporation (RIRDC). Queensland 40:102
- Schmid W (1975) The micronucleus test. *Mutat Res* 31:9–15
- Sick, H (1997) *Ornitologia Brasileira*, 1st ed. Editora Nova Fronteira, pp 912
- Sigrist T (2013) *Guia de campo Avis Brasilis: avifauna brasileira*, 1st edn. Avis Brasilis, São Paulo
- Tebourbi O, Sakly M, Rhouma KB (2011) Molecular mechanisms of pesticides toxicity. In: Stoycheva M (ed) *Pesticides in the modern world: pests control and pesticides exposure and toxicity assessment*, InTech, pp 289–332. ISBN 978-953-307-457-3
- Zuñiga-Gonzales G, Torres-Bugarín O, Luna-Aguirre J, GonzalesRodriguez A, Zamora-Peres A, Gómez-Meda BC, Ventura-Aguilar AJ, Ramos-Ibarra ML, Ramos-Mora A, Ortiz GG, Gallegos-Arreola MP (2000) Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 54 animal species (mammals, reptiles and birds): part two. *Mutat Res* 467:99–103