

UNIVERSIDADE DE RIO VERDE - UniRV
FACULDADE DE BIOLOGIA E QUÍMICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - LICENCIATURA E BACHARELADO

**ALTERAÇÕES ERITROCITÁRIAS EM GIRINOS NEOTROPICAIS:
RESERVA AMBIENTAL E ÁREA AGRÍCOLA DE CERRADO**

Richelle Sousa Modesto

Orientador: Prof. MS. Rinneu Elias Borges

**Artigo de Trabalho apresentado à Faculdade de
Biologia e Química da UniRV- Universidade de
Rio Verde, como parte das exigências para a
obtenção do grau de bacharel em Ciências
Biológicas.**

RIO VERDE – GOIÁS

2017

ALTERAÇÕES ERITROCITÁRIAS EM GIRINOS NEOTROPICAIS: RESERVA AMBIENTAL E ÁREA AGRÍCOLA DE CERRADO

Richelle Sousa Modesto¹
Rinneu Elias Borges ²

RESUMO

Os anfíbios são animais sensíveis a mudanças ambientais, portanto são bons modelos para estudo de qualidade ambiental. O mercado brasileiro de agrotóxicos vem crescendo ano a ano, e esses químicos são considerados, atualmente, como um dos motivos do declínio populacional de anfíbios. O objetivo do presente trabalho foi identificar alterações eritrocitárias em larvas de anuros provenientes de duas áreas distintas, quanto a conservação. Foram avaliadas seis espécies (*Physalaemus cuvieri*, *Scinax fuscovarius*, *Dendropsophus minutus*, *Dermatonotus muelleri*, *Boana albopunctatus*, *Leptodactylus labyrinthicus* e *Leptodactylus fuscus*), dentro destas espécies foram analisados 10 indivíduos, o qual foram quantificados 1000 eritrócitos para cada indivíduo, totalizando 10.000 eritrócitos por espécie. A contagem das células sanguíneas (núcleos micronucleados, reniforme, segmentados, binucleados, bilobulados, brotos, anucleadas, apoptóticas e apenas para descrição núcleo em divisão celular) a foto documentação das alterações foram feitas no Microscópio Ótico com a câmera SONY CYBER-SHOT DCS- W690 16.1 MP C/ ZOOM ÓPTICO, na objetiva 100x. Dentre as espécies analisadas não foi evidenciado frequência significativa ($P > 0.05$) de micronúcleo em eritrócitos de girinos coletados em ambiente agrícola (RV) em relação à área preservada (PNE) porém células reniformes tiveram aumento significativo no ambiente antrópico.

Palavras-chave: Micronúcleo, bioindicadores, girinos anuros, antropização.

¹ Acadêmica do curso de Ciências Biológicas Licenciatura e Bacharelado. Universidade de Rio Verde - UniRV.

² Professor Mestre da Faculdade de Biologia da Universidade de Rio Verde – UniRV

INTRODUÇÃO

O bioma Cerrado possui uma das savanas mais diversas do mundo, porém vem perdendo habitat devido à grande incidência da agricultura, pecuária, invasão de espécies exóticas, erosão de solos e degradação da vegetação (KLINK; MACHADO, 2005). Sua riqueza é muito importante devido à alta biodiversidade e endemismo, no entanto desde 1970, é alvo de desmatamentos intensivos para uso agrícola e pecuário, fatores que ocasionaram a extinção de várias espécies de vegetais e animais. (OLIVEIRA et al., 2008).

No mundo existem cerca de 7.638 espécies de Anfíbios, sendo 6.726 representados pelos Anuros, 707 pelos Caudatas e 205 pelos Gymnophionas (FROST, 2017). No Brasil até julho de 2016, foram descritas 1080 espécies de Anfíbios, sendo 1039 representado pelos Anuros, 5 Caudatas e 36 Gymnophionas (LANGONE, 2017).

A bioindicação, no sentido ecotoxicológico, pode ser definida como a utilização de seres vivos para a verificação e avaliação dos efeitos das diversas formas de poluição ambiental (KLUMPP, 2001) e os anfíbios são animais sensíveis essas mudanças ambientais por possuírem uma vida bifásica (aquática e terrestre) e apresentarem características fisiológicas distintas (BLAUSTEIN; KIESECKER, 2002).

Na última década o mercado brasileiro de agrotóxicos se expandiu colocando o país desde 2008, em primeiro lugar no ranking mundial no uso destes produtos (ANVISA, 2013).

Essenciais para equilibrar o ecossistema, os anuros são controladores de insetos e alguns invertebrados (WOEHL,2007), sendo que os mesmos auxiliam no controle de doenças como malária, febre amarela, dengue e outras pelas quais são transmitidas por mosquitos (STTEBINS; COHEN,1995). Além de serem bioindicadores de qualidade ambiental, estão sendo muito utilizados na indústria farmacêutica, apresentando-se importante para a medicina (STTEBINS; COHEN,1995). Por estes motivos os anfíbios são considerados um grupo de animais com grande potencial genotóxicos para diversos estudos com agrotóxicos no meio ambiente (HOWE et al., 2004).

Para analisar efeitos genotóxicos e mutagênicos do DNA, o ensaio de micronúcleo é uma metodologia muito utilizada, devido a sua alta sensibilidade, precisão nos resultados e baixo custo (RUSSO et al., 2004). Micronúcleos são cromossomos inteiros ou partes destes que não foram incorporados dentro do núcleo da célula filha durante a divisão celular (BOMBAIL et al., 2001). Seu tamanho é de um

terço inferior ao núcleo, sua coloração deve ser mais clara ou igual a do núcleo, ele não pode ser refratário ainda não pode tocar no núcleo (CARRASCO et al., 1990).

Dentre a análise de micronúcleo pode-se citar também outras alterações a serem descritas durante o teste como núcleos reniformes, segmentados, binucleados, lobulados, brotos, anucleadas, apoptóticas e apenas para descrição núcleo em divisão celular, pelos quais essas alterações estão sendo observadas em girinos anuros expostos a ambientes contaminantes pelas atividades genotóxicos, mutagênica e citotóxica (LAJMANOVICH et al.,2013).

Diante do exposto esse trabalho tem como objetivo identificar e quantificar alterações eritrocitárias em larvas de anuros coletados em matriz associado a monocultura e cerrado nativo.

MATERIAL E MÉTODOS

7.1- Área de estudo

Os locais de coleta dos girinos foram no município de Rio Verde – Goiás onde predominam as áreas de monoculturas e no Parque Nacional das Emas (Unidade Federal de Conservação Biológica).

O Parque Nacional das Emas localizado no Sudoeste do Estado de Goiás com área de 132.000 hectares abrange os municípios de Mineiros e Costa Rica (Mato Grosso do Sul). O Cerrado desta área é formado por vegetação com formações florestais, campestres e savânicas (ICMBIO, 2004); no município de Rio Verde a vegetação predominante são fragmentos florestais e cultivo de monoculturas (milho e soja).

7.2- Métodos de amostragem

Foram avaliadas na área antropizada 6 espécies (*Physalaemus cuvieri*, *Scinax fuscovarius*, *Dendropsophus minutus*, *Dermatonotus muelleri*, *Leptodactylus labyrinthicus* e *Leptodactylus fuscus*) e na área de reserva ambiental 4 espécies (*Physalaemus cuvieri*, *Scinax fuscovarius*, *Dendropsophus minutus*, *Boana albopunctatus*), dentro destas 10 espécies foram analisados 10 indivíduos, totalizando 100 espécimes analisados. Os animais foram coletados com o auxílio de um puçá, por meio de excursões pela manhã e pela tarde entre 2014 a 2016

Após a coleta, os girinos foram triados e identificados seus estágios larvais, onde foram anestesiados com benzocaína a 5% e posteriormente tendo a cauda seccionada com o auxílio de um bisturi para a realização do esfregaço sanguíneo. Foram feitas duas lâminas por indivíduo, totalizando 200 lâminas, essas foram fixadas em metanol gelado por 20 minutos e secas ao ar livre por um período mínimo de 24 horas. Posteriormente foram coradas com Giemsa a 10% por 20 minutos, após foram lavadas e deixadas a temperatura ambiente para secagem de acordo com THOMAS et al.,2009. Após a secagem foram montadas com bálsamo do Canadá com lamínula 24x60 para posteriores análises.

7.3- Análise Citológica

A frequência de micronúcleos e outras alterações foram avaliadas em 1000 eritrócitos por indivíduo com a objetiva de 100X, totalizando 120.000 eritrócitos. Durante as análises foram registradas as seguintes alterações eritrocitárias: células segmentadas, binucleadas, reniformes, anucleadas, micronucleadas, bilobulada, brotos, apoptóticas e células em divisão A foto documentaçãofoirealizada com auxílio de um microscópio óptico com a câmera (SONY CYBER-SHOT DCS- W690 16.1 MP C/ ZOOM ÓPTICO) acoplada.

7.4- Análise de dados

Os dados foram previamente verificados quanto à normalidade e homogeneidade das variâncias. Quando não apresentou distribuição normal, o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn foi aplicado para verificar a diferença entre frequência de micronúcleo para os ambientes, bem com outras alterações nucleares. One-way ANOVA, com dados transformados em raiz, seguido pelo teste post-hoc de Tukey foi realizado quando avaliamos a soma de todas as alterações eritrocitárias em relação às espécies. Outra ANOVA, porém fatorial foi usada para a relação espécie, ambiente e frequência de alterações nucleares (com dados transformados em raiz para atender a homogeneidade das variâncias). Os MNs e outras alterações eritrocitárias (ANEs) são expressos como média (desvio padrão), relatados com o número de ocorrências em 1000 células. Todas as análises foram executadas no software Statistica7[®], e o nível de significância determinado foi de 95% (P = 0,05).

RESULTADOS

Foram registrados seis tipos de alterações eritrocitárias (**Figura 1**), entretanto não foi evidenciado frequência significativa ($P > 0.05$) de micronúcleo em eritrócitos de girinos coletados em ambiente agrícola (RV) em relação à área preservada (PNE). No entanto células com núcleo reniforme mostrou diferença estatística (1.58 ± 2.82 , $P = 0.05$) para área agrícola comparado ao ambiente preservado. Outras alterações eritrocitárias não demonstraram significância estatística (**Tabela 1**).

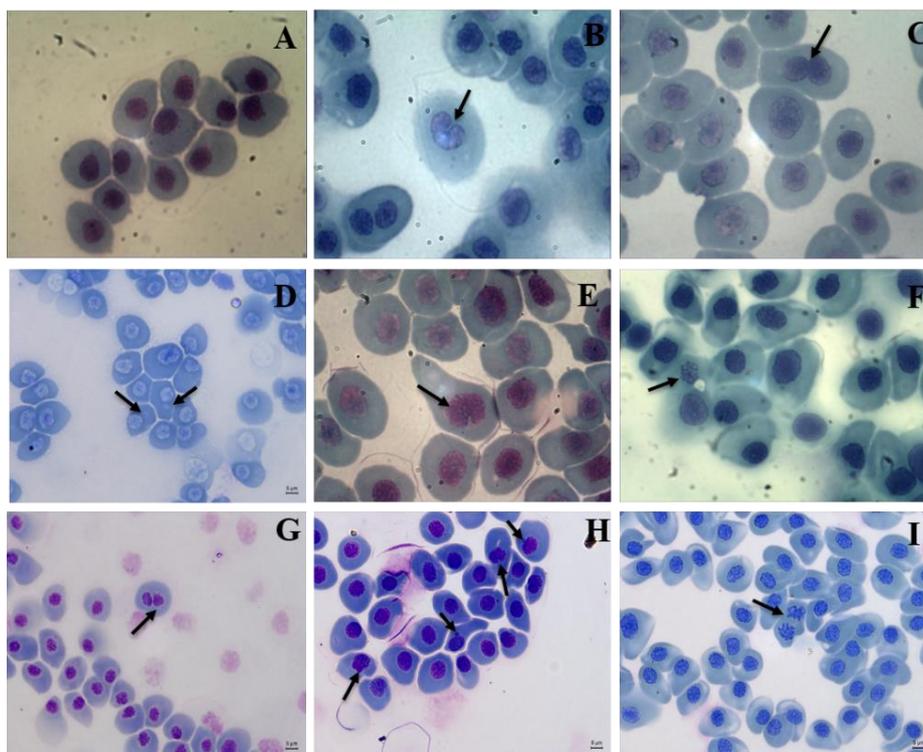


Fig. 1. Células do sangue de girinos de *Dendropsophus minutus* coletados em ambiente antropizados. **A-** Célula Normal; **B-** Célula Reniforme; **C-** Célula Bilobulada; **D-** Células Micronucleadas; **E-** Célula Segmentada; **F-** Célula Apoptótica; **G-** Célula Binucleada; **H-** Células com Brotos e Célula Segmentada e **I-** Divisão Celular.

Tabela 1. Frequência de micronúcleo e anormalidade nucleares observadas em 1000 Eritrócitos de girinos em todos os ambientes.

MN e outras alterações nucleares	Ambiente		Mean±SD	Valor-p
Micronúcleo	PNE	RV	0.23±0.56	0.43
Binucleada	PNE	RV	0.32±0.68	0.14
Reniforme	PNE	RV*	1.58±2.82	0.01*
Anucleada	PNE	RV	0.45±1.56	0.97
Broto nuclear	PNE	RV	0.17±0.46	0.81
Apoptótica	PNE	RV	0.07±0.31	0.95

* $P < 0.05$, indica a diferença estatística entre as anormalidades nucleares.

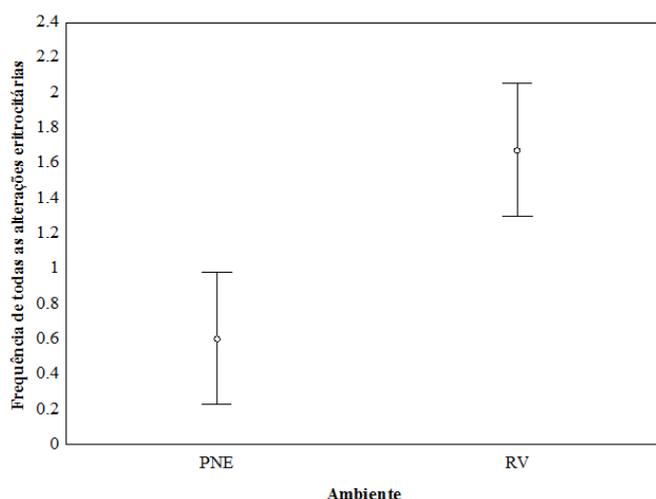
Quando avaliamos em particular a sensibilidade das espécies (*D. minutus*, *P. cuvieri* e *S. fuscovarius*) conforme os sítios amostrados não houve diferença estatística para micronúcleo ($H = 4.83$; $P = 0.43$). Como análise complementar de acordo com Arcaute et al. (2014), agrupamos todas as alterações eritrocitárias e *S. fuscovarius* apresentou sensibilidade para o ambiente agrícola (4.40 ± 2.88 , $P < 0,05$) (**Tabela 2**).

Ainda analisando o agrupamento dessas alterações eritrocitárias nos indivíduos, os dados mostraram uma diferença estatística alta entre os sítios ($F_{1, 54} = 16.340$, $p = 0.00017$) (**Figura 2**).

Tabela 2. Frequência de micronúcleo nas espécies de anuros e soma das alterações nucleares observadas em 1000 eritrócitos.

Espécies	Ambiente	MN	Todas as ANEs
<i>D. minutus</i>	RV	0.40±0.52	3.00±3.89
	PNE	0.20±0.42	1.70±3.06
<i>P. cuvieri</i>	RV	0.60±0.97	4.90±5.32
	PNE	0.20±0.63	0.80±1.40
<i>S. fuscovarius</i>	RV	0	4.40±2.88*
	PNE	0	0.70±1.34

* $P < 0.05$, indica a diferenças estatística entre as anormalidades nucleares.



Outra análise complementar foi realizada entre os ambientes, considerando agora uma amostra maior de animais para ambiente agrícola (*D. minutus*, *P. cuvieri*, *S. fuscovarius*, *D. mulleri*, *L. labyrinthicus* e *L. fuscus*) onde também avaliamos a somatória de todas as alterações eritrocitárias. Uma diferença significativa foi evidenciada para o ambiente agrícola ($F_{5, 54}=6.1069$, $p=0.00015$) (**Figura 3**). Em contrapartida, a área preservada não houve diferença estatística entre as espécies investigadas ($F_{3, 36}=1.5894$, $p=0,20886$) (**Figura 4**).

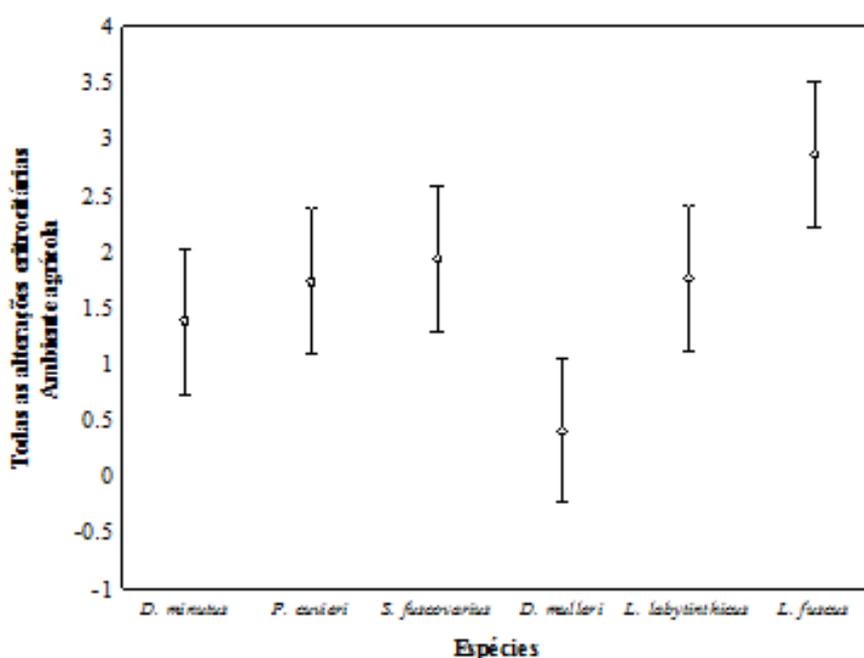


Fig. 3. Análise da sensibilidade das espécies quando agrupado todas as alterações eritrocitárias e avaliado para o ambiente agrícola.

DISCUSSÕES

Estes resultados (**Tabela 2**) assemelham-se com resultados citados por LAJMANOVICH et al (2003) em que demonstraram que anuros (*Pseudis minuta*, *Leptodactylus latrans*, *Hypsiboas pulchellus* e *Rhinella schneideri*) expostos a pesticidas apresentaram efeitos teratogênicos e a presença de micronúcleo devido a exposição pelos pesticidas.

De acordo com GONÇALVES et al (1990) em seus resultados obtidos em um teste com um herbicida mostrou-se várias alterações celulares como micronúcleo, bilobulada, binucleadas, reniformes, segmentadas e apoptóticas em girinos de *Rhinella areranium* semelhante com os resultados obtidos neste experimento (**Figura 3**).

Trabalhando em áreas de mineração de níquel GONÇALVES et al., 2012 nas 32 espécies de anuros analisados três indivíduos apresentaram alterações eritrocitárias como *Proceratophrys goyana*, *Dendropsophus soaresi* e *Leptodactylus leptodactyloides*.

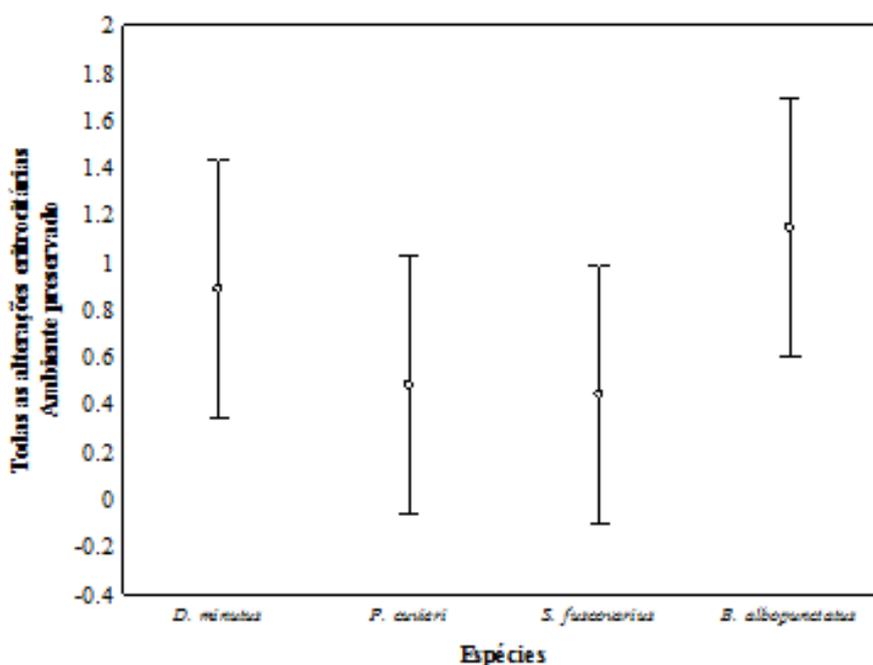


Fig. 4. Análise da sensibilidade das espécies quando agrupado todas as alterações eritrocitárias e avaliado para o ambiente preservado.

Segundo RALPH e PETRAS (1997) realizaram um estudo comparativo entre uma área agrícola e uma reserva natural com as espécies *Rana clamitans* e *R. pipiens*, mostrando que as mesmas sofreram alterações em seus DNAs por conta da exposição ao ambiente com pesticidas e relatou também que na reserva natural houve poucas sensibilidades das espécies analisadas assim como foi observado no presente estudo (**Figura 4**).

Já WOJTASZEK et al. (2004), também utilizando como modelos de estudos as espécies *R. clamitans* e *R. pipiens* demonstrou que as espécies analisadas em ambiente natural tiveram poucas sensibilidades, e estas foram obtidas através da presença de sedimentos, macrófitas aquáticas e próprio pH das poças.

Já GONÇALVES (2015) em um estudo *in situ* com Glifosato - Roundup® (herbicida) mostrou que a espécie de *P. cuvieri* sofreu alterações genômicas em seu DNA assim como observamos em nossos resultados a **(Figura 3)**. GIESY et al. (2000) ressalta que o maior problema em se usar o glifosato nas lavouras é devido a sua grande durabilidade nos ambientes aquáticos, cerca de 70 dias tendo assim mais tempo para causar danos aos animais expostos ao mesmo.

Outros estudos como de MEZA-JOYA et al. (2013) mostraram que a pulverização área de Glifosato não só foi toxica para os girinos nos ambientes aquáticos, mas também como foi para os adultos da espécie *Eleutherodactylus johnstonei*. HUSSEIN et al., 1996; WILHELMS et al., 2005; SOLOMON et al., 2008 mostram que outro problema ambiental é com o herbicida atrazina que vem causando o declínio dos anfíbios, peixes, pássaros e roedores principalmente porque ela atua nas funções hormonais do ser vivo, sendo observado na espécie *R. pipiens*.

Outros pesquisadores citam que a exposição a metais, herbicidas e pesticidas podem resultar em uma grande quantidade de anomalias genotóxica, teratogênicas, mutagênicas e reprodutivas em anfíbios (CAMPANA et al., 2003, YIN Et al., 2008, PELTZER et al., 2008, LIU et al., 2011, NIKOLOFF et al., 2014).

CONCLUSÃO

Diante do exposto, concluímos que espécimes de ambiente agrícola localizado no Município de Rio Verde do domínio cerrado estão mais susceptíveis a alterações nos eritrócitos do que espécimes coletados em ambiente preservado Parque Nacional das Emas. A espécie *S. fuscovarius* apresentou sensibilidade nos ambientes demonstrando ser um bom modelo de bioindicador de qualidade ambiental.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Relatório de Atividades de 2011 e 2012. Brasília: **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**; 2013.

BLAUSTEIN, A.R.; KIESECKER, J.M. 2002. Complexity in conservation: Lessons from the global decline of amphibian populations. **Ecology Letters**, v.5, p. 597-608, 2002.

BOMBAIL, V.; Aw, D.; GORDON, E.; BATTY, J. Application of the comet and micronucleus assay to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. **Chemosphere**, v. 44, p.383-392, 2001.

CLEMENTS, C., RALPH, S., PETRAS, M., 1997. Genotoxicity of select herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using the alkaline single-cell gel DNA electrophoresis (comet) assay. **Environ. Mol. Mutagen.** 29, 277–88.

CAMPANA MA, PANZERI AM, MORENO VJ, DULOUT FN Micronuclei induction in *Rana catesbeiana* tadpoles by the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. **Genet Mol Biol**, n. 26, v.1, 2003.

CARRASCO, K.R.; TILBURY, K. L.; MAYERS, M. S. Assessment os the piscine micronuclei test in situ biological indicator of chemical contaminats effects. **Canadian Journal of Fish. and Aquatic Science**, v. 47, p. 2123-2136, 1990.

FREEMAN, J.L., RAYBURN, a L., 2004. *In vivo* genotoxicity of atrazine to anuran larvae. **Mutat. Res.** 560, 69–78.

FROST, Darrel R. 2017. Amphibian Species of the World: An Online Reference. Version 6.0 (1 de Junho de 2017). Electronic Database accessible at [htt://research.amnh.org/herpetology/amphibian/index.html](http://research.amnh.org/herpetology/amphibian/index.html). **American Museum of Natural History, New York, USA**.

GONÇALVES, M.G; OLIVEIRA, H.P; CARVALHO, W.F; NOMURA, F.; BASTOS, R.P. Análise Mutagênicas de Anuros em áreas de Mineração de Níquel. **Goiânia**, 339, n. 2. P. 115-121, abr/jun.2012.

GONÇALVES, M.W et al. Alterações genômicas e mutagênicas em duas espécies de anfíbios anuros. 2015.

GIESY, J.P., DOBSON, S., SOLOMON, K.R., 2000. **Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide**. Rev Contam Toxicol v.167, p.35– 120.

HOWE, C.; BERRIL, M.; PAULI, B.; HELBING, C.; WERRY, K.; VELDHON, N. Toxicity of Glyphosate-Based Pesticides to Four North American Frog Species. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, n. 8, pp. 1928–

1938, 2004.

HUSSEIN, S.Y., EL-NASSER, M. a., AHMED, S.M., 1996. Comparative Studies on the Effects of Herbicide Atrazine on Freshwater Fish *Oreochromis niloticus* and *Chrysichthyes auratus* at Assiut, Egypt. Bull. **Environ. Contam. Toxicol.** 57, 503–510.

ICMBIO (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade) Plano de Manejo do Parque Nacional das Emas. Brasília 2004;893 p. Disponível em <http://www.icmbio.gov.br/unidadesdeconservaçãoparquenacionaldasemas>.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**. V.1, p. 1. 2005.

KLUMPP, A. Utilização de bioindicadores de poluição em condições temperadas e tropicais. In: N. B. M. Maia, H. L.; Barella, W. (Ed.). Indicadores ambientais: conceitos e aplicações. São Paulo: **Educ/Comped/Inep**, p.77 – 94. Utilização de bioindicadores de poluição atmosférica em condições temperadas e tropicais. 2001.

LAJMANOVICH, R.; LORENZATTI, E.; de la Sierra, P.; MARINO, F.; STRIGHINI, G.; y PELTZER, P.; (2003). Reduction in the mortality of tadpoles (*Physalaemus biligonigerus*, Amphibia: *Leptodactylidae*) exposed to cypermethrin: uptake by aquatic ferns. **Fresenius Environmental Bulletin** v.12, p.1558-1561.

LAJMANOVICH, RC.; JUNGES, CM.; ATTADEMO, AM.; PELTZER, PM.; CABAGNA, M.; BASSÓ, A. Toxicidade individual e mistura de formulações comerciais que contêm glifosato, metsulfuron-metilo, bispiribac-sódio e picloram na *Rhinella arenarum* girinos. **Water Air Soil Poll.**, 224 (2013), pp. 1404-1417.

LANGONE **Herpetologia Brasileira** - Volume 5 - Número 2 - Julho de 2016 (01 de junho de 2017).[http:// www.sbherpetologia.org.br/index.php/anfibios](http://www.sbherpetologia.org.br/index.php/anfibios).

MEZA-JOYA, F.L., Ramírez-Pinilla, M.P., Fuentes-Lorenzo, J.L., 2013. Toxic, cytotoxic, and genotoxic effects of a glyphosate formulation (Roundup®SL-Cosmoflux®411F) in the direct-developing frog *Eleutherodactylus johnstonei*. **Environ. Mol. Mutagen.** V.54, p. 362–73.

NIKOLOFF. N; NATALE G.S.; MARINO, D. Flurochloridone-based herbicides induced genotoxicity effects on *Rhinella arenarum* tadpoles (Anura: Bufonidae). **Ecotoxicol Environ Saf**, n.100, p. 81-275; 2014.

OLIVEIRA, A. M. Flora do cerrado e agricultura familiar: potencialidades e referências ambientais e socioeconômicas. Dissertação (mestrado) **Universidade Católica de Goiás**, Mestrado em Ecologia e Produção Sustentável, 2008.

PELTZER, P.M.; LAJMANOVICH, R.C.; SÁNCHEZ-HERNANDEZ, J.C. 2008 Effects of agricultural pond eutrophication on survival and health status of *Scinax nasicus* tadpoles. **Ecotoxicol Environ Saf**, n.70, p. 97-185, 2008.

RUSSO, C. et al. Assessment of environmental stress by the Micronucleus test and the Comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments. *Ecotoxicology. Environmental Safety*, v. 57, p. 168-174, 2004.

SPARLING, D., LINDER, G., BISHOP, C., KREST, S. (Eds.), 2010. **Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles**, Second Edition. CRC Press.

SOLOMON, K.R., CARR, J. a, DU PREEZ, L.H., GIESY, J.P., KENDALL, R.J., SMITH, E.E., VAN DER KRAAK, G.J., 2008. Effects of atrazine on fish, amphibians, and aquatic reptiles: **a critical review**. *Crit. Rev. Toxicol.* V.38, p.721–72.

STTEBINS, R.C. y COHEN, N.W.1995. A natural history of amphibians. **Princeton University Press**, 316p.

THOMAS, P HOLLAND, N.; BOLOGNESI, C.; KIRSCH-VOLDERS, M.; BONASSI, S.; ZEIGER, E.; KNASMUELLER, S. e FENECHÉ, M.2009. Buccal micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, 4:825.

WANG, RF: ELE, WS. Detecção de poluição das águas por micronúcleos e outras anomalias nucleares ou eritrócitos de girinos (*Bufo bufo andrewsi*). **Zool. Res.**, v.11 (1990), p. 1-5.

WILHELMS, K.W., CUTLER, S. a, PROUDMAN, J. a, Anderson, L.L., Scanes, C.G., 2005. Atrazine and the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in sexually maturing precocial birds: **studies in male Japanese quail**. **Toxicol. Sci.**v. 86, p.152–60.

WOJTASZEK, B.F., STAZNIK, B., CHARTRAND, D.T., STEPHENSON, G.R., THOMPSON, D.G., 2004. Effects of Vision® Herbicide on Mortality, Avoidance Response, and Growth of Amphibian Larvae in Two Forest Wetlands. **Environ. Toxicol. Chem.** 23, 832.

WOEHL JR, G.; WOEHL, E. N. Características dos anfíbios. 1 de março de 2007. Disponível em: http://www.ra-bugio.org.br/anfibios_sobre.php. Acessado em: 31 de março de 2010.

YIN. XH, Liu S.N.; ZHANG. L. 2008. Evaluation of DNA damage in Chinese toad (*Bufo gargarizans*) after in vivo exposure to sublethal concentrations of four herbicides using the comet assay. **Ecotoxicology**, n.17, p. 6-280.