

TOXICIDADE AGUDA E GENOTOXICIDADE DO
AGROTÓXICO COMERCIAL FOLISUPER 600BR A
GIRINOS DE *Physalaemus cuvieri*
(ANURA: LEIUPERIDAE)

HAMANDA SOARES V. P. DA SILVA *
CLARENICE LOIOLA *
SILMA REGINA FERREIRA PEREIRA **
RICARDO LUVIZOTTO SANTOS ***
GILDA VASCONCELLOS DE ANDRADE ****
GILVANDA SILVA NUNES *****

Este trabalho objetivou avaliar a toxicidade e a genotoxicidade do inseticida organofosforado paration metílico à espécie de anfíbios *Physalaemus cuvieri*. O primeiro passo consistiu na análise da toxicidade direta do agrotóxico pela condução de experimentos que possibilitassem conhecer a sua Concentração Letal (CL₅₀). Em seguida, foi avaliado o potencial genotóxico de uma formulação comercial do inseticida, mediante a realização do Ensaio Cometa em girinos pré-metamorfos da mesma espécie. O produto comercial, Folisuper 600BR, apresentou CL₅₀-96 h de 0,36 mgL⁻¹ a girinos de *P. cuvieri*. Observou-se que o composto também pode induzir danos ao DNA em concentrações entre 0,1 a 1000 µgL⁻¹, o que comprova a sua significativa genotoxicidade à espécie estudada, acarretando sérios desequilíbrios nos ambientes aquáticos devido principalmente aos impactos adicionais sobre a cadeia trófica.

PALAVRAS-CHAVE: PARATION METÍLICO; TOXICIDADE AGUDA; GENOTOXICIDADE; ANFÍBIOS; *Physalaemus cuvieri*.

- * Biólogas, Mestres em Biodiversidade e Conservação pelo Departamento de Biologia, Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís, MA, Brasil (e-mail: hamandasoares@hotmail.com; claraloiola@gmail.com).
- ** Bióloga, Doutora em Biologia (Genética), Pesquisadora, Departamento de Biologia, UFMA, São Luís, MA, Brasil (e-mail: silmaregina@yahoo.com.br).
- *** Oceanólogo, Doutor em Ciências da Biologia Ambiental, Professor, Departamento de Oceanografia e Limnologia, UFMA, São Luís, MA, Brasil (e-mail: luvisottosantos@ufma.br).
- **** Bióloga, Doutora em Ecologia, Pesquisadora, Departamento de Biologia, UFMA, São Luís, MA, Brasil (e-mail: gildavandrade@gmail.com).
- ***** Química Industrial, Doutora em Química, Coordenadora da Pesquisa, Departamento de Tecnologia Química, UFMA, São Luís, MA, Brasil (e-mail: gilvanda-dapi@hotmail.com).

1 INTRODUÇÃO

O Folisuper 600BR, agrotóxico comercial, é empregado como inseticida e acaricida em diversas culturas. Trata-se de produto com classificação toxicológica I (extremamente tóxico) (ANVISA, 2013), contendo o princípio ativo paration metílico (*o,o*-dimethyl *o*-4-nitrophenyl phosphorothioate). Esse composto tem sido amplamente utilizado na agricultura para o controle de pragas e também no controle de ectoparasitos em tanques de piscicultura (LESTER e ROUBAL, 1995; LUVIZOTTO-SANTOS, CORDEIRO e VIEIRA, 2009).

O inseticida paration metílico pertence ao grupo dos organofosforados (OF), conhecidos por serem potenciais inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE). Com a inibição da AChE, a acetilcolina (ACh), principal substrato dessa enzima (cuja ação é mediada pelos receptores nicotínicos e muscarínicos) fica acumulada e começam a surgir os sintomas neurológicos da contaminação (SAVOLAINEN, 2001). Os mecanismos gerais de ações neurotóxicas ocasionadas por esse grupo de agrotóxicos são bem conhecidos, entretanto ainda são escassos estudos acerca dos mecanismos moleculares subjacentes (MARONI *et al.*, 2000). Mesmo em concentrações insuficientes para causar a inibição da AChE há evidências de que os organofosforados podem alterar *in vitro* alguns processos celulares (SAVOLAINEN, 2001; EATON *et al.*, 2008).

A avaliação ecotoxicológica constitui importante ferramenta para análise dos efeitos prejudiciais de agrotóxicos em espécies não alvo, principalmente as nativas. A identificação do perigo e a análise da relação dose-resposta são etapas iniciais no processo de avaliação da toxicidade ou de risco ambiental desses compostos (USEPA, 2002).

Os anfíbios representam grupo em risco, ameaçado principalmente pela perda e degradação de habitat (IUCN, 2008; SILVANO e SEGALLA, 2005). A exposição aos agrotóxicos desempenha importante papel no declínio das populações de anfíbios, e muitos desses compostos funcionam como disruptores endócrinos como, por exemplo, a atrazina. Alguns produtos são capazes de feminilizar e causar castração química em anfíbios machos adultos (SPARLING, LINDER e BISHOP, 2000; HAYES *et al.*, 2010). No caso dos OF, que agem como inibidores de uma enzima fundamental para as funções vitais, sua presença pode exercer forte impacto sobre as populações de organismos aquáticos (SPARLING, LINDER e BISHOP, 2000).

No Brasil, há pouca informação sobre os efeitos de agrotóxicos em espécies de anfíbios, embora esses produtos sejam usados há décadas nas lavouras. Esses animais, devido sua pele bastante permeável, além da reprodução e dos estágios larvais dependerem do ambiente aquático, tornam-se altamente vulneráveis à contaminação química, o que pode resultar em efeitos significativos nos indivíduos e nas populações de anfíbios (HAYES *et al.* 2006).

Para entender os efeitos de poluentes a qualquer tipo de animal aquático, o primeiro passo é conhecer a toxicidade aguda de compostos representantes das classes dos agrotóxicos, o que torna necessária a realização de experimentos para determinar sua Concentração Letal (CL_{50}) para os indivíduos testados (PERKINS, BOERMANS e STEPHENSEN, 2000). Outros efeitos provenientes da exposição a contaminantes podem ser avaliados pela observação de danos causados às moléculas de DNA dos indivíduos expostos. O Ensaio Cometa, também denominado Eletroforese em Gel de Célula Única, tem sido um dos mais recomendados para avaliação genotóxica, pois detecta quebras em fitas simples e dupla da molécula de DNA, além de sítios álcali-labelis (DHUANG *et al.*, 2007). Esse ensaio tem sido realizado em anfíbios nos estágios adulto e larvais para a avaliação genotóxica de diferentes compostos em corpos d'água contaminados (DHUANG *et al.*, 2007; RALPH e PETRAS, 1997). Além de danos ao DNA, o Ensaio Cometa possibilita estudos do seu reparo e morte celular (incluindo apoptose) em diferentes tipos de células da biota natural, sem o conhecimento prévio do cariótipo ou da taxa de *turnover* das células dos indivíduos estudados (JHA, 2008).

A espécie *Physalaemus cuvieri*, conhecida como rã-cachorro, constitui bom modelo para avaliação da suscetibilidade de espécies nativas por se tratar de espécie abundante e de ampla distribuição geográfica no Brasil. Esses animais, muito comuns em áreas rurais do estado

do Maranhão, utilizam corpos d'água lânticos para a reprodução e o desenvolvimento larvário (BARRETO e ANDRADE, 1995), semelhantes aos corpos d'água associados às áreas de agricultura, expondo-se, portanto, a possíveis contaminações por agrotóxicos.

No presente estudo avaliou-se a toxicidade aguda e a genotoxicidade do agrotóxico Folisuper 600BR (princípio ativo inseticida OF paration metílico) em girinos pré-metamorfo da espécie *P. cuvieri*, objetivando fornecer informações sobre os efeitos dessa substância em organismos não alvos em agroecossistema maranhense.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 REAGENTES, SOLUÇÕES E DEMAIS MATERIAIS

Utilizou-se nos ensaios ecotoxicológicos a formulação comercial do princípio ativo paration metílico (Figura 1) Folisuper 600BR (AGRIPEC, Brasil), com 60% de pureza. O restante da formulação equivale a ingredientes inertes.

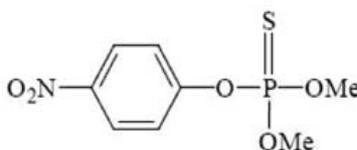


FIGURA 1 - ESTRUTURA QUÍMICA DO INSETICIDA PARATION METÍLICO (O,O-DIMETHYL O-4-NITROPHENYL PHOSPHOROTHIOATE)

Me = Grupamento metílico.

Dimetilssulfóxido (DMSO), NaOH, HCl, EDTA, ciclofosfamida, agarose ponto de fusão normal e baixo ponto de fusão (*normal and low melting*), solução de lise e Triton-x- foram obtidos da Sigma (Califórnia, EUA). A solução de lise para o Teste Cometa foi preparada pela adição sequencial de 1 mL de Triton-x, 10 mL de DMSO, 89 mL de solução lise estoque em presença de NaCl 2,5 mol.L⁻¹, EDTA 0,1 mol.L⁻¹ e Tris 0,01 mol.L⁻¹. Preparou-se a solução tampão alcalina utilizada no Teste Cometa pela mistura de NaOH 0,3 mol.L⁻¹ e EDTA 1 mmol.L⁻¹, pH > 13. Todas as soluções teste foram preparadas imediatamente antes de cada experimento. As vidrarias foram lavadas exaustiva e sequencialmente com detergente Extran® alcalino (Merck), água destilada e água deionizada para evitar contaminação.

2.2 INSTRUMENTAÇÃO

Para a realização do Ensaio Cometa foi utilizado sistema de eletroforese. As condições de eletroforese foram: cuba de eletroforese de 25 cm de diâmetro entre eletrodos; corrida a 0,8 V/cm (20 V); amperagem ajustada para 300 mA, mediante aumento ou diminuição do volume da solução alcalina e tempo de corrida de 20 min. Para a análise virtual das lâminas utilizou-se microscópio trinocular de fluorescência, com aumento de 40 X, composto de objetiva planacromática e iluminação episcópica 100 W HBO/diascópica 20 W Halogênio (marca Opton, modelo TNI-51-IMU).

2.3 ORGANISMOS TESTE

Os girinos da espécie *P. cuvieri* utilizados no experimento foram provenientes de única desova coletada no município de Carolina, MA (7°15'35"S e 47°26'48"W) Brasil, visando minimizar possíveis efeitos de variação genética.

Realizou-se a troca de água dos aquários a cada dois dias e os girinos foram alimentados com ração para filhotes de répteis aquáticos, marca Tartaruga baby® (Nutral). O início dos experimentos ocorreu quando os girinos atingiram comprimento total de 105 a 108 mm. Durante a condução dos experimentos, a alimentação dos girinos foi suspensa.

2.4 TESTE DE TOXICIDADE AGUDA

A água empregada no teste de toxicidade foi a mesma do controle negativo (água de poço), utilizada no máximo 24 h após a coleta. A temperatura e o pH da água foram medidos diariamente e a dureza total antes do início do experimento, quando a água ainda não estava dopada com o agrotóxico (PAN, 2012b).

Foram utilizados 10 girinos por replicata e quatro replicatas por tratamento, totalizando 40 girinos expostos às seguintes concentrações: 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 5,0 e 10,0 mg.L⁻¹. Os girinos foram colocados em frascos de vidro contendo 1 L de solução de Folisuper 600BR, nas concentrações referidas. Trocou-se a solução de cada tratamento diariamente por solução recém-preparada. Água desclorificada foi usada como controle negativo.

Os girinos foram considerados mortos quando não reagiram ao toque, tendo sido contados após 24 h, 48 h, 72 h e 96 h de tratamento. Os dados foram analisados pelo programa TSK (*Trimmed Spearman-Kärber Program*, Versão 1.5), utilizado pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US-EPA) para calcular os valores de CL₅₀ e os seus intervalos de confiança em nível de 95% de probabilidade (TSK, 1991).

2.5 ÁREA AGRÍCOLA AVALIADA E ENSAIO COMETA

O Ensaio Cometa foi realizado com girinos expostos a soluções de Folisuper 600BR em três concentrações: 0,1; 0,25 e 1000 µg.L⁻¹. As concentrações mais baixas (0,1 e 0,25 µg.L⁻¹) foram equivalentes às concentrações do inseticida paration metílico analisadas por cromatografia a gás com detecção por espectrometria de massas (CG-EM), em análise preliminar da água de poças formadas na região agrícola investigada (Figura 2), em cujas áreas hortícolas e frutícolas próximas, o agrotóxico tem sido extensivamente utilizado. A concentração de 1000 µg.L⁻¹ foi escolhida como uma concentração subletal após o teste de toxicidade aguda. Para o controle positivo adotou-se o teor de 5000 µg.L⁻¹ da ciclofosfamida, comumente empregado nesse ensaio (SINGH *et al.*, 1988).

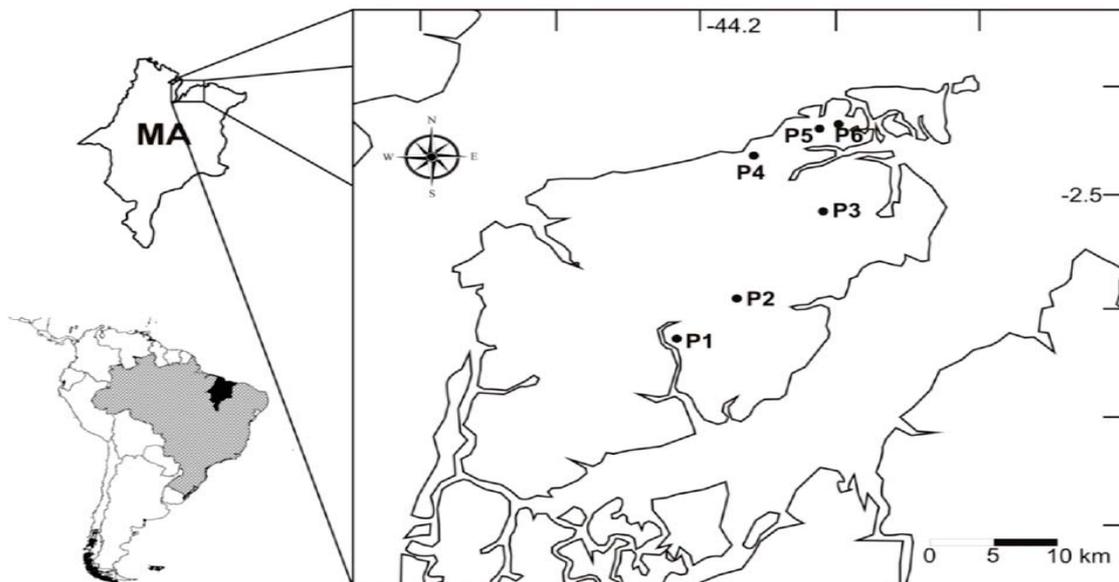


FIGURA 2 - LOCALIZAÇÃO DAS ÁREAS DE COLETA NA ILHA DE SÃO LUÍS: CINTURÃO VERDE (P1), SÃO BRAZ DOS MACACOS (P2), IGUAÍBA (P3), TALITA (P4), ITAPEUA (P5) E RAPOSA (P6)

Realizou-se o experimento com 10 girinos *P. cuvieri* por tratamento, sendo coletadas amostras do tecido da cauda após 24 h de exposição ao inseticida para avaliação dos danos ao DNA. Usou-se o procedimento descrito por Singh *et al.* (1988) com adaptações sugeridas por

Dhawan e colaboradores (2011). Uma parte da cauda dos girinos foi macerada em solução tampão fosfato (PBS), pH 7,5, e depois misturada à solução de agarose baixo ponto de fusão a 0,5% (m/v) para a confecção das lâminas. As lâminas pré-cobertas com agarose (ponto de fusão normal) a 1,5% foram transferidas para solução de lise, colocadas em cuba de eletroforese com solução tampão alcalina por 20 min para desnaturação e 20 min sob corrente elétrica (25V, 300 mA). As lâminas foram submetidas à neutralização com solução tampão Tris-HCl (pH 7,5) por 15 min (3 ciclos de 5 min) e secas à temperatura ambiente. As lâminas foram coradas por adição de 30 μL de solução de brometo de etídio 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, preparada minutos antes da solução estoque de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, e cobertas com lamínula para análise imediata no microscópio de fluorescência. Foram analisadas 100 células por lâmina para cada indivíduo exposto à cada concentração do agrotóxico, totalizando 300 análises. Como controle negativo utilizou-se água deionizada e como controle positivo a solução de ciclofosfamida a 5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Foram calculados os seguintes parâmetros: frequência de danos (nas diferentes classes de danos) e índice de danos (SHESKIN, 2004). Os resultados foram analisados pelo programa BIOSTAT 12.0. As comparações estatísticas entre as classes de danos ao DNA para os controles e os grupos expostos foram efetuadas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Student-Newman-Keuls (teste SNK, $p < 0,05$), que tem sido adotado rotineiramente na avaliação estatística de resultados médicos e biológicos (LUO *et al.*, 2003).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 TOXICIDADE AGUDA DO AGROTÓXICO

Durante todo o período em que foi realizado o estudo de toxicidade aguda, as características físico-químicas da água utilizada nos testes corresponderam à temperatura em torno de 28 °C; pH variando entre 7,5 e 7,8 e dureza total entre 1,6 e 1,8 mg/L de CaCO_3 (parâmetros considerados normais para os testes).

De acordo com os dados apresentados na Figura 3 pode-se observar o aumento da letalidade dos girinos em função da concentração do agrotóxico. Nas concentrações de 5,0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e 10,0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, todos os indivíduos morreram logo nos 10 primeiros minutos de exposição ao agrotóxico. Na concentração de 1,0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ do agrotóxico após 72 horas de exposição, metade da população ainda permanecia viva, embora apresentando visível debilidade em sua mobilidade.

Os valores da CL_{50} do Folisuper 600BR, encontrados mediante curva dose-resposta para os girinos de *P. cuvieri* foram de: 1,30 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (24 h de exposição); 0,93 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (48 h); 0,70 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (72 h) e 0,36 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (96 h).

Luo e colaboradores (2003) avaliaram a toxicidade do paration metílico a girinos de *Rana tigrina*, utilizando cinco concentrações (2,0; 3,1; 4,8; 7,8 e 12 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Encontraram valores de CL_{50} de 4,9; 3,9; 3,3 e 3,1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para 24, 48, 72 e 96 h de exposição, respectivamente. Em outro trabalho, avaliando a toxicidade de alguns inseticidas organofosforados para girinos de *Rana boylei*, Sparling e Fellers (2007) obtiveram os seguintes valores de CL_{50} : 3,0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para clorpirifós (24 h); 7,488 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para o diazinon (96 h) e 2,137 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para malation (96 h). Os valores de CL_{50} foram muito superiores em ambos os estudos quando comparados aos obtidos no presente trabalho, o que demonstra a elevada susceptibilidade da espécie *P. cuvieri* ao agrotóxico em relação às demais espécies já investigadas. Esse fato também pode explicar a diminuição da população desse anfíbio em áreas agrícolas maranhenses em que são utilizados esse e outros agrotóxicos (NUNES, VERBINNEN e NUNES, 2010). Deve-se mencionar que os autores citados utilizaram nos seus experimentos soluções dos agrotóxicos com purezas superiores a 99 %, isto é, partiram dos seus princípios ativos. No presente estudo, as soluções utilizadas para exposição dos girinos de *P. cuvieri* foram preparadas mediante dissolução de formulação comercial contendo 60 % de paration metílico. Assim, a presença de ingredientes inertes pode ter influenciado o aumento da toxicidade, sugerindo que a formulação

comercial seja mais tóxica que o composto padrão. Convém lembrar que, na prática, os agricultores aplicam as formulações comerciais dos agrotóxicos e não seus princípios ativos.

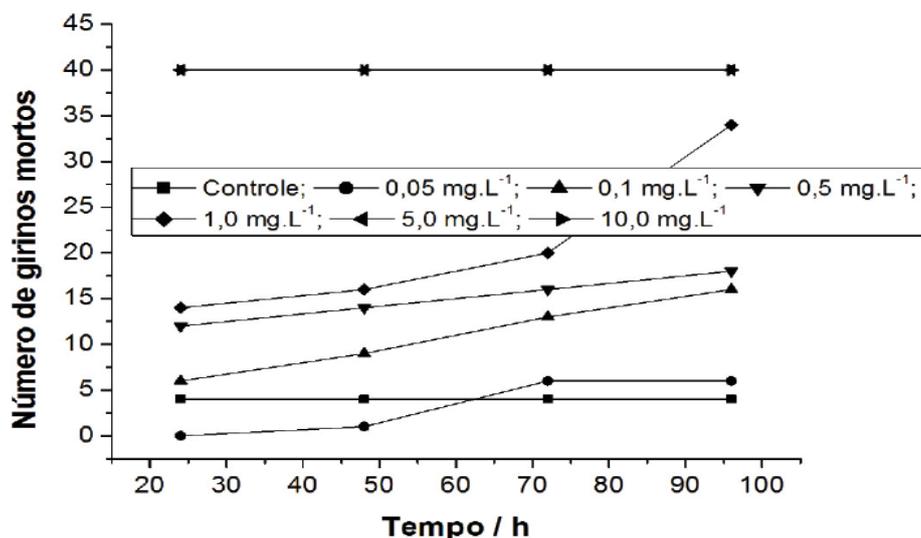


FIGURA 3 - RESULTADOS DOS ENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA DO AGROQUÍMICO FOLISUPER 600BR PARA GIRINOS DE *P. curvieri*

Nota: controle - água desclorificada.

Fávero, Souza e Matias avaliaram a toxicidade aguda do paration metílico em peixes adultos, conhecidos popularmente como guppies (*Poecilia reticulata*), e encontraram CL_{50-24h} de 10,64 mgL⁻¹. Por sua vez, Kreutz *et al.* (2008) constataram CL_{50-96h} de 4,8 mgL⁻¹ a alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*). Em ambos os trabalhos foi avaliada a formulação comercial do produto Folidol®, contendo também 60 % de paration metílico. As CL_{50} encontradas por esses autores mostraram-se igualmente elevadas quando comparadas às verificadas para girinos da espécie *P. curvieri*. Esses dados demonstram que existem variações consideráveis entre os valores da CL_{50} para indivíduos de diferentes espécies, e evidenciam a importância de se conduzir estudos dessa natureza para prever o comportamento e os efeitos que esses xenobióticos podem causar à biota quando presentes em ambientes aquáticos.

3.2 GENOTOXICIDADE DO AGROTÓXICO

Os resultados obtidos com as células da cauda dos girinos expostos ao agrotóxico são apresentados na Tabela 1.

Pequeno número de células com nível de dano zero foi observado, mesmo no grupo controle, provavelmente por conta do tecido estudado (cauda dos anfíbios). Até o final da metamorfose esse tecido costuma ser totalmente removido, mediante processo de morte programada da célula (denominado apoptose). Um dos primeiros eventos desse processo é a fragmentação do DNA (GALLUZZI *et al.*, 2007), o que pode explicar o número elevado de células com danos 3 e 4 no grupo controle negativo. A frequência relativamente alta de danos em amostras-controle tem sido atribuída ao alto nível de fundo ("background") em organismos aquáticos (WILSON *et al.*, 1998), mas no presente estudo não foi possível detectar as causas instrumentais e inerentes ao método para esse efeito.

A análise dos dados dos grupos expostos a diferentes concentrações do agrotóxico durante o mesmo período (24 h) revelou que o índice de danos apresentou tendência geral de aumento conforme a concentração do poluente. As classes de danos que mais contribuíram para tais índices foram a 4 (danos máximos) e a 3 (danos intensos).

TABELA 1 - FREQUÊNCIA DE CLASSES DE DANOS AO DNA DETECTADAS PELO ENSAIO COMETA EM CÉLULAS DA CAUDA DE GIRINOS DE *P. cuvieri* TRATADOS COM FOLISUPER 600BR

Amostra	Dose de exposição ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Frequência de danos por classes (%)					Índice de Dano	Posto Médio
		0	1	2	3	4		
Controle Negativo	0	0,2	9,0	31,8	25,2	31,4	2,74 ^c	4.0
Controle Positivo	5000	0,0	0,0	0,6	16,6	82,8	3,82 ^a	38.0
Paration Metílico	0,1	0,0	1,8	16,0	20,6	61,8	3,43 ^{c,d}	13.45
	0,25	0,0	1,2	5,6	33,4	59,8	3,54 ^{b,d}	22.45
	1000	0,0	0,0	9,4	26,0	64,6	3,55 ^b	25.10
								H= 26.7156
								P=0.0000

Médias seguidas pela mesma letra, na vertical, não diferem estatisticamente pelo teste Kruskal-Wallis, seguido pelo teste SNK, em nível de 95 % de probabilidade. Controle Negativo = água deionizada. Controle Positivo = solução de ciclofosfamida a 5 mg.L⁻¹. Tempo de exposição = 24 h. Classes de danos: 0 = cometas intactos, nenhum dano registrado; 1 = danos mínimos causados pela exposição ao agrotóxico; 2 = danos médios; 3 = danos intensos; 4 = danos máximos.

O nível de danos aos indivíduos tratados com a solução do agrotóxico a 0,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ não apresentou diferença significativa com o grupo controle ($p < 0,05$), não podendo ser considerada genotóxica. Essa concentração não foi suficiente para causar dano ao material genético, talvez por ser baixa ou pelo curto período de exposição. Considerando o eficiente mecanismo de reparo do DNA, imagina-se que o material genético pode ter sido lesado em taxa passível de reparação.

As concentrações de 0,25 e 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ foram consideradas genotóxicas por terem acarretado índices de danos significativamente maiores ($p < 0,05$) em relação ao controle negativo. Observou-se ainda que nenhuma das concentrações testadas foi mais genotóxica que o controle positivo (ciclofosfamida).

Girinos de diferentes espécies já foram utilizados na avaliação da genotoxicidade de outros organofosforados. Por exemplo, Li e colaboradores (2010) avaliaram a genotoxicidade do profenofós (solução emulsionável a 40 %) a girinos de *Rana spinosa*. Esse organofosforado mostrou-se genotóxico em concentrações superiores a 0,075, mg.L⁻¹. Girinos de *Rana tigrina* expostos ao inseticida clorpirifós mostraram aumento significativo de danos ao DNA, quando submetidos a concentrações variando de 0,08; 0,16 a 0,64 mg.L⁻¹ (YIN *et al.*, 2009).

Os resultados obtidos no presente trabalho corroboram os encontrados para outros OF, mostrando que o paration metílico é capaz de induzir aumento de dano ao DNA dos girinos expostos em baixas concentrações. Isso significa que o composto pode afetar a reprodução, a vida embrionária, o desenvolvimento, o crescimento e a sobrevivência da espécie *P. cuvieri*. Segundo Lee e Steinert (2003), quando determinada substância provoca tais efeitos em baixas concentrações, frequentemente também induz efeitos carcinogênicos, defeitos hereditários por mutações, teratogênese e patologias de fundo genético.

Como já descrito, a aplicação do ensaio cometa a espécies brasileiras de anuros vem sendo realizada com sucesso, tanto para avaliação ambiental quanto para avaliação de potencial para biomonitoramento. Porém, ainda não tinham sido encontrados trabalhos sobre a exposição da espécie *P. cuvieri* aos agrotóxicos organofosforados.

Os resultados apresentados demonstram que em agroecossistemas aquáticos intensamente impactados pelo agrotóxico Folisuper 600BR podem ocorrer efeitos adversos diretamente à fauna, adicionais ao estresse natural do sistema. Anfíbios ligados a esses ambientes exercem papel fundamental no transporte de energia e de nutrientes entre os compartimentos água e solo. A redução da sua população, ou mesmo a dizimação da espécie em determinadas áreas,

inexoravelmente causará desequilíbrios ao longo do tempo. Além disso, esses organismos aquáticos podem transportar os poluentes por bioacumulação impactando diversas cadeias tróficas.

É interessante mencionar que no ambiente natural, devido à redução da persistência e biodisponibilidade, os efeitos da maioria das substâncias químicas são menos danosos do que em laboratório (ARAGÃO e ARAÚJO, 2006), porém alguns compostos se mostram mais tóxicos em campo do que em condições laboratoriais. O paration metílico se degrada rapidamente sob condições naturais no ambiente aquático e o seu maior produto de degradação (paraoxon metílico) é mais tóxico a mamíferos e organismos aquáticos, como peixes (GONZALEZ ORTIZ, MARTÍNEZ-TABACHE e TERRÓN, 2004; PAN, 2012a) e crustáceos (PAN, 2012b.)

Por ocasião da análise química das amostras de águas das poças, empregando-se a técnica GC-MS, foram encontrados resíduos tanto do composto-pai (paration metílico) quanto do seu produto de degradação (paraoxon metílico). Em cerca de 60 % das amostras de água superficial, as concentrações do paraoxon metílico estiveram bem acima, evidenciando o efeito de degradação pela presença do oxigênio e da luz. Pode-se inferir que o efeito tóxico do paration metílico no ambiente aquático tem sido provocado principalmente pelo seu produto de degradação.

4 CONCLUSÃO

No Brasil, por ocasião do registro de agroquímicos, são exigidos pelo Ministério da Saúde, entre outros testes, ensaios de toxicidade a organismos não alvos para avaliar a forma de ação dessas substâncias nos organismos constituintes da cadeia alimentar. Embora os testes com anfíbios não constituam exigência regulatória, tais ensaios têm sido extremamente importantes para demonstrar a periculosidade e o grau de interferência dos produtos sobre os ecossistemas aquáticos e seu comportamento no ambiente. São particularmente úteis na avaliação e no monitoramento da qualidade da água, já que os resultados de análises químicas por si só não retratam o impacto provocado pela presença desses xenobióticos e seus efeitos sobre os compartimentos ambientais, em especial o compartimento água.

Os resultados apresentados neste estudo mostraram que: 1) a formulação comercial do inseticida paration metílico (Folisuper 600BR) é tóxica aos girinos de *P. cuvieri* devido à sua CL_{50-96h} relativamente baixa; 2) a cauda dos girinos constitui tecido viável para a realização do Ensaio Cometa na avaliação da contaminação aquática pelo inseticida, apesar do grande número de células com danos 3 e 4 no grupo controle provocado, provavelmente, pelo processo de apoptose na cauda dos girinos durante a metamorfose, e 3) o composto também pode induzir danos ao DNA dos girinos expostos ao agrotóxico, mesmo em baixas concentrações, o que pode impactar significativamente a sobrevivência da espécie no ecossistema aquático contaminado.

Por conta do amplo uso do paration metílico para o controle de pragas, tanto na agricultura quanto na piscicultura, pode-se considerar que esse inseticida oferece risco em potencial a determinadas espécies de anfíbios, particularmente à espécie *P. cuvieri*, já que os resultados obtidos no teste agudo e no Ensaio Cometa mostraram que a exposição a concentrações residuais podem ser letais assim como induzir danos ao material genético.

ABSTRACT

ACUTE TOXICITY AND GENOTOXICITY OF THE FOLISUPER 600BR COMMERCIAL AGROCHEMICAL TO TADPOLES OF *Physalaemus cuvieri* (ANURA: LEIUPERIDAE)

This study aimed to evaluate the toxicity and genotoxicity of the organophosphorus insecticide methyl parathion on the species of amphibian *Physalaemus cuvieri*. The first step consisted on analyzing the direct toxicity of the pesticide, by conducting experiments that would enable to know the lethal concentration (LC_{50}). Then, it was evaluated the genotoxic potential of a commercial formulation of the insecticide by the Comet assay in tadpoles pre-shifters of *P. cuvieri*. The same commercial product, Folisuper 600BR, presented a 96 h- LC_{50} of 0.36 mg L⁻¹ to tadpoles. It was observed that the pesticide may also induce DNA damage at concentrations

between 0.1 and 1000 µgL⁻¹ which proves significant genotoxicity to the studied species. That may result on serious imbalances in aquatic environments mainly due to the additional impacts on the food chain.

KEY-WORDS: METHYL PARATION; AMPHIBIAN; *Physalaemus cuvieri*; ACUTE TOXICITY; GENOTOXICITY.

REFERÊNCIAS

- 1 Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Reavaliação toxicológica do ingrediente ativo da parationa metilica**. Nota Técnica. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/96b246804f309971be99bec88f4b6a31/Nota+t%C3%A9cnica+da+Parationa+Met%C3%ADlica.pdf?MOD=AJPERES> Acesso em: 29 ago. 2013.
- 2 ARAGÃO, M.A.; ARAÚJO, R.P.A. Métodos de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos. In: ZAGATO, P.A.; BERTOLETTI, E. (Eds.). **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. São Carlos, SP: Rima, 2006. p. 117-147.
- 3 BARRETO, L.; ANDRADE, G.V. Aspects of the reproductive biology of *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leptodactylidae) in northeastern Brazil. **Amphibia-Reptilia**, v. 16, p. 67-76, 1995.
- 4 DHAWAN, A.; BAJPAYEE, M.; PANDEY, A.K.; PARMAR, D. **ITRC: the SCGE/comet assay protocol**. 1. Protocol for the single cell gel electrophoresis. Disponível em: <http://www.itrcindia.org> Acesso em: 15 de ago. 2011.
- 5 DHUANG, D.; ZHANG, Y.; WANG, Y.; XI, Z.; JI, W. Assessment of the genotoxicity in toad *Bufo raddei* exposed to petrochemical contaminants in Lanzhou Region, China. **Mutation Research**, v. 629, p. 81-88, 2007.
- 6 EATON, D.L.; DAROFF, D.L.; AUTRUP, H.; BRIDGES, J.; BUFFIER, P.; COSTA, L.G.; COYLE, J.; MCKHANN, G.; MOBLEY, W.C.; NADEL, L.; NEUBERT, L.; SCHULTE-HERMANN, R.; SPENCER, P.S. Review of the toxicology of chlorpyrifos with an emphasis on human exposure and neurodevelopment. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 28, n. 2, p.1-125, 2008.
- 7 FÁVERO, S.; SOUZA, E.M.; MATIAS, R. Ecotoxicidade do paration metílico e glifosato para *Poecilia reticulata* (Pisces: Poeciliidae) em laboratório. **Ens. Ci.**, v. 9, n.5, p.315-324, 2005.
- 8 GALLUZZI, L.; MAIURI, M.C.; VITALE, I.; ZISCHKA, H.; CASTEDO, M.; ZITVOGEL, L.; KROEMER, G. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. **Cell Death Differ.**, v. 14, p.1237-1243, 2007.
- 9 GONZALEZ ORTIZ, R.; MARTÍNEZ-TABCHE, L.; TERRÓN, S.O. Phenobarbital on methyl-parathion metabolism in *Hyalomma azteca*. **Bulletin of Environmental Contamination Toxicology**, v. 72, n.6, p.1247-1252, 2004.
- 10 HAYES T.B.; STUART, A.A.; MENDOZA, M.; COLLINS, A.; NORIEGA, N.; VONK, A.; JOHNSTON, G.; LIU, R.; KPODZO, D. Characterization of atrazine-induced gonadal malformations and effects of an androgen antagonist (cyproterone acetate) and exogenous estrogen (estradiol 17β): support for the demasculinization/feminization hypothesis. **Environ. Health Perspect**, v. 114, p. 134-141, 2006.
- 11 HAYES, T.B.; KHOURY, V.; NARAYAN, A.; NAZIR, M.; PARK, A.; BROWN, T.; ADAME, L.; CHAN, E.; BUCHHOLZ, D.; STUEVE, T.; GALLIPEAU, S. Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 107, n.10, p.4612-4617, 2010.
- 12 International Union for Conservation of Nature (IUCN). **An analysis of amphibians on the 2008 IUCN Red List**. 2008. Disponível em: www.iucnredlist.org/amphibians Acesso em: 23 de maio 2011.
- 13 JHA, A.N. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. **Mutagenesis**, v.23, n.3, p. 207-221, 2008.
- 14 KREUTZ, L.C.; BARCELLOS, L.J.G.; SILVA, T.O.; ANZILIERO, D.; MARTINS, D.; LORENSEN, M.; MARTENINGHE, A.; SILVA, L.B. Acute toxicity test of agricultural pesticides on silver catfish (*Rhamdia quelen*) fingerlings. **Ciência Rural**, v. 38, n. 4, p. 1050-1055, 2008.
- 15 LEE, R.S.; STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detection of DNA damage in aquatic (marine and fresh water) animals. **Mutat. Res. Rev. Mutat.**, v. 544, p. 43-64, 2003.
- 16 LESTER, R.J.G.; ROUBAL, F.R. *Phylum Arthropoda*. Isopoda: Cymothoidae. In: WOO, P. (Ed.). **Fish diseases and disorders**. Wallingford: CAB International, 1995. p. 550-561.
- 17 LI, X.; LI, S.; LIU, S.; ZHU, G. Lethal effect and *in vivo* genotoxicity of profenofos to Chinese native amphibian (*Rana spinosa*) tadpoles. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 59, p. 478-483, 2010.
- 18 LUO, Y.C.; ZENG, Q.R.; WU, G.; LUAN, Z.K.; LIAO, B.H. Effect of beta-cyclodextrin compounds on the solubilization of three selected pesticides and their toxicity with methyl-parathion to *Rana tigrina* tadpoles. **Bulletin of Environmental Contamination Toxicology**, v. 70, p. 998-1005, 2003.
- 19 LUVIZOTTO-SANTOS, R.; CORDEIRO, P.J.M.; VIEIRA, E.M. Analysis of methyl parathion in tilapia filets using a simple solid phase extraction clean-up and GC-NPD. **Journal of Food Technology**, Especial Issue, p. 158-161, 2009.

- 20 MARONI, M.; COLOSIO, C.; FERIDI, A.; FAIT, A. Organophosphorus pesticides. **Toxicology**, v. 143, p. 9–37, 2000.
- 21 NUNES, G.R.; VERBINNEN, R.T.; NUNES, G.S. Impactos sócio-ambientais pelos pesticidas empregados na sojicultura sobre a Comunidade de Sonhem, Região Pré-Amazônica Maranhense. **Amazônia**, v. 6, p. 117-132, 2010.
- 22 PAN. The Pesticide Action Network. Pesticides Database. **Chemical toxicity studies on aquatic organisms. Acute aquatic ecotoxicity summaries for methyl paraoxon on fish**. Disponível em: <http://www.pesticideinfo.org/List_AcquireAcuteSum.jsp?Rec_Id=PC35842&Taxa_Group=Fish> Acesso em: 17 dez. 2012a.
- 23 PAN. The Pesticide Action Network. Pesticides Database. **Chemical toxicity studies on aquatic organisms. Acute aquatic ecotoxicity summaries for methyl paraoxon on Crustaceans**. Disponível em: <http://www.pesticideinfo.org/List_AcquireAcuteSum.jsp?Rec_Id=PC35842&Taxa_Group=Crustaceans> Acesso em: 17 dez. 2012b.
- 24 PERKINS, P.J.; BOERMANS, H.J.; STEPHENSEN, G.R. Toxicity of glyphosate and triclopyr using the frog embryo teratogenesis assay-*Xenopus*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 19, p. 940-945, 2000.
- 25 RALPH, S.; PETRAS, M. Genotoxicity monitoring of small bodies of water using two species of tadpoles and the alkaline single cell gel (Comet) assay. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 29, n. 4, p. 418-430, 1997.
- 26 SAVOLAINEN, K. Understanding the toxic actions of organophosphates. In: KRIEGER, R.I. (Ed.). **Handbook of pesticide toxicology**. New York: Academic Press, 2001. p. 1013–1041.
- 27 SHESKIN, D.J. **Handbook of parametric and nonparametric statistical procedures**. 3rd ed. Boca Raton: Chapman & Hall CRC, 2004. 1193 p.
- 28 SILVANO, D.L.; SEGALLA, M.V. Conservação de anfíbios no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 79-86, 2005.
- 29 SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell Res.**, v. 175, n. 1, p. 184-91, 1988.
- 30 SPARLING, D.W.; FELLERS, G. Comparative toxicity of chlorpyrifos, diazinon, malathion and their oxon derivatives to larval *Rana boylei*. **Environmental Pollution**, v. 147, p. 535-539, 2007.
- 31 SPARLING, D.W.; LINDER, G.; BISHOP, C.A. **Ecotoxicology of amphibians and reptiles**. Pensacola, FL: Society of Environmental Toxicology and Chemistry-SETAC, 2000. 904 p.
- 32 TSK. **Trimmed Spearman–Kärber program**. Version 1.5. Cincinnati: Environmental Protection Agency, 1991.
- 33 USEPA. United States Environmental Protection Agency. **Guidelines for the health: risk assessment guidance for superfund (RAGS)**. 2002. Disponível em: <www.epea.gov/superfund/programs/risk/rags/ch7> Acesso em: 10 jan 2011.
- 34 WILSON, J.T.; PASCOE, P.L.; PARRY, J.M.; DIXON, D.R. Evaluation of a comet assay as a method for the detection of DNA damage in the cells of a marine invertebrate *Mytilus edulis* L (Molusca: Pelecypoda). **Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutag.**, v 399, p. 87-95, 1998.
- 35 YIN, X.H.; ZHU, G.N.; LI, X.B.; LIU, S.Y. Genotoxicity evaluation of chlorpyrifos to amphibian Chinese (Amphibian: Anura) by comet assay and micronucleus test. **Mutation Research**, v. 680, p. 2-6, 2009.

AGRADECIMENTOS

À CAPES pelo apoio ao NARP/UFMA, Projeto PROCAD (Processo 173/2007) e ao CNPq pelo apoio ao Programa de PG em Biodiversidade e Conservação da UFMA, através do Projeto Casadinho (Processo 620163/2008-9). Agradecemos também ao CNPq pelas bolsas de: Produt. Pesq. Desenv. Tecnol. Ext. Inovadora, concedida a G. S. Nunes; Produt. Pesq., Concedida a G. V. Andrade, e Mestrado, concedidas a Hamanda Soares e Clarenice Loiola.