Report for the IUCN/SSC Crocodile Specialist Group

Student Research Assistance Scheme

Researcher: Nathan Fernandes Neves

Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Laboratório de Estudos Zoológicos do Alto Paranapanema (LEZPA), campus Lagoa do Sino, Rodovia Lauri Simões de Barros, Km 12 SP-189, Bairro Aracaçu, 18.290000, Buri, São Paulo, Brazil.

E-mail: ferneves1112@gmail.com

Supervisor: Vinícius de Avelar São Pedro

Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Laboratório de Estudos Zoológicos do Alto Paranapanema (LEZPA), campus Lagoa do Sino, Rodovia Lauri Simões de Barros, Km 12 SP-189, Bairro Aracaçu, 18.290000, Buri, São Paulo, Brazil.

E-mail: viniciusasp@ufscar.br

CSG Member: Luís Antonio Bochetti Basset

E-mail: luisbassetti@gmail.com

Evaluation of nuclear abnormalities in blood cells of broad-snouted caiman [*Caiman latirostris* (Daudin, 1801)] in an agricultural landscape of the state of São Paulo.

Abstract

Brazil is one of the largest producers and exporters of agricultural products in the world, as well as one of the largest consumers of chemical inputs for agriculture. Pesticides are substances with genotoxic, carcinogenic and mutagenic potential, which can accumulate in water bodies. The accumulation of these substances in water bodies can cause numerous alterations in non-target organisms, in addition to bioaccumulation and biomagnification. Ecotoxicology is the area that studies the relationship of these chemicals with the environment and the organisms in it, and, for this, uses living organisms as the object of study, such as reptiles, where the species used are called bioindicator species. Among reptiles, crocodilians are frequently used as bioindicators. In Brazil there are six species, of which the Broad-snouted Caiman (*Caiman latirostris*) stands out in studies of agricultural environments. Blood samples from this caiman can be used to investigate the genotoxic potential of agrochemicals using the Micronucleus Test

(MN) and others nuclear abnormalities (NAs), which detects micronucleus and nuclear abnormalities. Previous studies in an agricultural environment in the Upper Paranapanema region found a high frequency of nuclear abnormalities in blood cells of fish and turtles, possibly related to pesticide contamination of water. Therefore, the present study sought to add information to this investigation through the Micronucleus Test and others nuclear abnormalities in blood cells of a species that occupies the last trophic level of aquatic environments. This study was expected to generate an overview of the health and population census of this species in the region, and to test its use as a bioindicator. Twelve environments were sampled in the study area, totaling 26 caimans visualized and 13 captured through pitfall traps (*funnel traps*). For each captured individual, biometry and blood sampling were performed via occipital sinus in the cervical vertebral region to prepare the blood smear slides. In addition to micronuclei (MN), notched nucleus (IV), lobed erythocyte (LB), blebbed erythocyte (BROTO) and binucleated cells (BN) were counted, according to Carrasco et al (1990), Fenech (2000), Poletta et al. (2008) and López-González et al. (2017). As a reference data in the species, we used reference values for the frequency of micronuclei and others nuclear abnormalities found in the literature, as well as data from animals from uncontaminated environments provided by researcher Dr. Evelyn C. López González, from Proyecto Yacaré in Argentina. The frequencies of MN and BN of the caimans collected in the agricultural environments differed significantly from the reference values, and these values were significantly higher in the caimans collected in the present study. For IV and BROTO abnormalities, there was no significant difference between the two groups. Through this study it was possible to detect genotoxic damage in the blood cells of Broad-snouted Caiman, possibly related to contamination of water bodies by agrochemicals used in the region's farms. The study also added positively to the population census and monitoring of the species in the study area, and validated the future possibility use of the species as a bioindicator of the quality of aquatic environments with other complementary biomarkers.

Keywords: Ecotoxicology. Agrochemicals. Bioindicator. *Caiman latirostris*. Micronucleus test.

Avaliação de anomalias nucleares em células sanguíneas de jacarés-de-papo-amarelo [*Caiman latirostris* (Daudin, 1801)] em uma paisagem agrícola do estado de São Paulo.

Resumo

O Brasil é um dos maiores produtores e exportadores de produtos agropecuários do mundo, como também é um dos maiores consumidores de insumos químicos para a agricultura. Os agrotóxicos são substâncias com potencial genotóxico, carcinogênico e mutagênico, passível de acumular-se nos corpos hídricos. O acúmulo dessas substâncias nos corpos hídricos pode causar inúmeras alterações nos organismos não-alvo, além da bioacumulação e biomagnificação. A ecotoxicologia é a área que estuda a relação dessas substâncias químicas com o ambiente e os organismos ali inseridos e, para isto, utiliza-se de organismos vivos como objeto de estudo, como os répteis, onde as espécies utilizadas são chamadas de espécies bioindicadoras. Dentre os répteis, os crocodilianos são frequentemente utilizados como bioindicadores. No Brasil existem seis espécies, das quais o jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) se destaca em estudos em ambientes agrícolas. Amostras de sangue deste crocodiliano podem ser utilizadas para investigar o potencial genotóxico dos agroquímicos, através do Teste de Micronúcleo (MN) e outras anomalias nucleares (NAs), o qual detecta micronúcleos e anomalias nucleares. Estudos prévios em uma área agrícola na região do Alto Paranapanema encontraram uma alta frequência de anomalias nucleares em células sanguíneas de peixes e cágados, possivelmente relacionadas à contaminação das águas por agrotóxicos. Portanto, o presente estudo buscou agregar informações a essa investigação através do Teste de MN e NAs em células sanguíneas de uma espécie que ocupa o último nível trófico dos ambientes aquáticos. Esperou-se com esse estudo gerar um panorama sobre a saúde e censo populacional dessa espécie na região, além de testar seu uso como bioindicador. Foram amostrados 12 ambientes na área de estudo, totalizando 26 jacarés visualizados e 13 capturados através de armadilhas do tipo covo (*Funnel traps*). Para cada indivíduo capturado, foram realizadas a biometria e a coleta de sangue, via seio occipital na região vertebral cervical, para confecção das lâminas de esfregaço sanguíneo. Além de micronúcleos (MN), foram contabilizados núcleos chanfrados (IV), núcleos lobulados (LB), núcleos segmentados (BROTO) e células binucleadas (BN), conforme Carrasco et al (1990), Fenech (2000), Poletta et al. (2008) e López-González et al. (2017). Como parâmetro de referência para a espécie, foram utilizados valores de referência para a frequência de micronúcleos e outras anomalias nucleares encontrados na literatura, além de dados de animais de ambientes não contaminados disponibilizados pela pesquisadora Dra. Evelyn C. López González, do Proyecto Yacaré na Argentina. As frequências de MN e BN dos jacarés coletados nas matrizes agrícolas diferiram significativamente dos valores de referência, sendo esses valores significativamente mais altos nos jacarés coletados no presente estudo. Para as anomalias do tipo IV e BROTO, não houve diferença significativa entre os dois grupos. Através deste trabalho foi possível detectar danos

genotóxicos nas células sanguíneas de jacarés-de-papo-amarelo, possivelmente relacionados à contaminação dos corpos d'água por agroquímicos utilizados nas lavouras da região. O estudo também agregou de forma positiva com o censo populacional e monitoramento da espécie na área do estudo, além de validar a possibilidade futura da utilização da espécie como bioindicadora de qualidade dos ambientes aquáticos, junto a biomarcadores complementares.

Palavras-chaves: Ecotoxicologia. Agrotóxicos. Bioindicador. *Caiman latirostris*. Teste de Micronúcleo.

INTRODUÇÃO

A expansão das áreas destinadas a agricultura resultou no aumento das alterações ambientais trazendo sérias consequências para a conservação da biodiversidade, como a perda e a fragmentação de habitats, além da contaminação ambiental pelo uso excessivo de agroquímicos (SALA et al., 2000; GREEN et al., 2005; LONDRES, 2011). Dentre estes impactos, a presença de substâncias tóxicas nos corpos hídricos implica em prejuízos diretos à saúde humana, além de afetar a biodiversidade (FERNANDES, 2005).

Os agrotóxicos vêm sendo utilizados em grandes quantidades nas lavouras, sobretudo nas monoculturas, a fim de controlar pragas, tais como insetos, fungos, plantas indesejadas e doenças (FILIZOLA et al., 2002). Entretanto, na maioria das vezes, apenas uma pequena porcentagem aplicada irá exercer sua função, enquanto o restante deposita-se sobre o solo, tornando-se um xenobiótico com potencial genotóxico, carcinogênico e mutagênico, passível de se deslocar para outros locais (SABIK et al., 2000; FERNANDES, 2005). O deslocamento dessas substâncias ocorre principalmente por escoamento superficial e por lixiviação, que pode resultar na contaminação de águas superficiais e subterrâneas, respectivamente (SPADOTTO et al., 2004).

Uma vez acumulados nos corpos hídricos, os agrotóxicos podem causar inúmeras alterações comportamentais, fisiológicas e genéticas nos organismos não-alvo (BICKHAM et al., 2000; CROSBY et al., 2015; WANG et al., 2015). Esses efeitos podem reduzir a taxa reprodutiva e elevar a taxa de mortalidade, tendo como possível consequência um estrangulamento populacional com implicações sobre a perda da variabilidade genética e viabilidade da população (BICKHAM et al., 2000).

Além dos danos diretos causados aos organismos não-alvo, os agrotóxicos também podem afetar a dinâmica ecológica dos ambientes, comprometendo as funções do ecossistema

(PRESOTI, 2008). Além da bioacumulação, que é o acúmulo de uma substância química dentro de um organismo, os agrotóxicos tendem a se acumular nos níveis tróficos superiores, atingindo maiores concentrações em consumidores terciários e predadores de topo (ARNOT; GOBAS, 2006; ANDRÉA, 2008). Esse processo, chamado de biomagnificação, proporciona o acúmulo de agrotóxicos por toda a cadeia trófica, podendo chegar aos seres humanos através da ingestão da carne de animais contaminados (PRESOTI, 2008; MENDES et al., 2016).

Uma das formas de identificar o acúmulo dessas substâncias nos indivíduos e nos ecossistemas é a utilização de bioindicadores. Estes são organismos que, geralmente, não morrem quando expostos a agentes tóxicos e/ou alterações no ambiente, mas respondem a essa exposição em níveis moleculares-bioquímicos até o nível de comunidade, fornecendo informações sobre a saúde dos indivíduos e do ambiente como um todo (ANDRÉA, 2008). Segundo Vieira e colaboradores (2002) os crocodilianos podem funcionar como bioindicadores de qualidade ambiental, devido a sua adaptação a ambientes contaminados por poluentes industriais ou agrícolas e, por serem predadores de topo da cadeia alimentar. No Brasil, são encontradas seis espécies de crocodilianos, entre elas, o jacaré-de-papo-amarelo [*Caiman latirostris* (Daudin, 1802)] (COSTA & BÉRNILS, 2018). Estudos prévios registraram a ocorrência deste crocodiliano em ambientes contaminados por poluentes agrícolas e industriais e áreas urbanizadas (BORTEIRO et al., 2006; FILOGÔNIO et al., 2010), mas não examinaram as possíveis consequências dessa exposição a poluentes à saúde dos animais.

Devido a sua posição como predador de topo na cadeia trófica, e por ser comum em ambientes aquáticos de áreas agrícolas, essa espécie pode ser um bom modelo para se investigar a biomagnificação de agroquímicos. Amostras de sangue deste crocodiliano podem ser utilizadas para se obter um panorama geral desses efeitos (LÓPEZ-GONZÁLEZ et al., 2017; MARRUGO-NEGRETE et al., 2019). Uma das metodologias utilizadas para avaliar esses efeitos com base em amostras de sangue é o Teste de Micronúcleo (MN) e outras anomalias nucleares (NAs), que detecta alterações cromossômicas induzidas por agentes externos (LÓPEZ-GONZÁLEZ et al., 2017). Os micronúcleos são fragmentos de cromossomos ou cromossomos inteiros que não são incorporados ao núcleo principal da célula filha na etapa da anáfase da divisão celular, englobados por uma membrana (FENECH et al., 2016). Além destes, outras anomalias nucleares também se enquadram nas alterações cromossômicas (CARRASCO et al., 1990; LÓPEZ-GONZÁLEZ et al., 2017).

Estudos prévios em uma área agrícola na região do Alto Paranapanema, estado de São Paulo, encontraram uma alta frequência de anomalias nucleares em células sanguíneas de peixes e cágados, possivelmente relacionadas à contaminação das águas por agrotóxicos (MORAES, 2018; KUBO, 2019). Um estudo em desenvolvimento buscou agregar informações a essa investigação através da avaliação de anomalias nucleares em células sanguíneas de jacarés-de-papo-amarelo, uma espécie que ocupa um nível trófico acima dos peixes e cágados. Portanto, o presente projeto buscou dar continuidade a essa investigação utilizando o jacaré-de-papo-amarelo.

OBJETIVO GERAL

Realizar a avaliação de anomalias nucleares em células sanguíneas de jacarés-de-papo-amarelo em paisagens agrícolas no Alto do Paranapanema.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a ocorrência anomalias nucleares em células sanguíneas de jacarés-de-papo-amarelo in situ com a de indivíduos de cativeiro (grupo controle);
- Relacionar a ocorrência dessas anomalias nucleares com o potencial genotóxico de agroquímicos;
- Testar o potencial uso do jacaré-de-papo-amarelo como bioindicador de qualidade ambiental;
- Contribuir com os dados de censo populacional e monitoramento de jacarés já iniciados na região.

MATERIAIS E MÉTODOS

ÁREA DE ESTUDO

O estudo foi realizado na região do campus Lagoa do Sino da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) no município de Buri, bacia hidrográfica do Alto do Paranapanema, no sudoeste do Estado de São Paulo (Figura 1). A região encontra-se originalmente em uma área de transição entre os biomas Mata Atlântica e Cerrado, sendo rica em ecossistemas aquáticos lênticos como lagoas naturais, várzeas, represas e açudes (KRONKA et al., 2005; ANA, 2014).

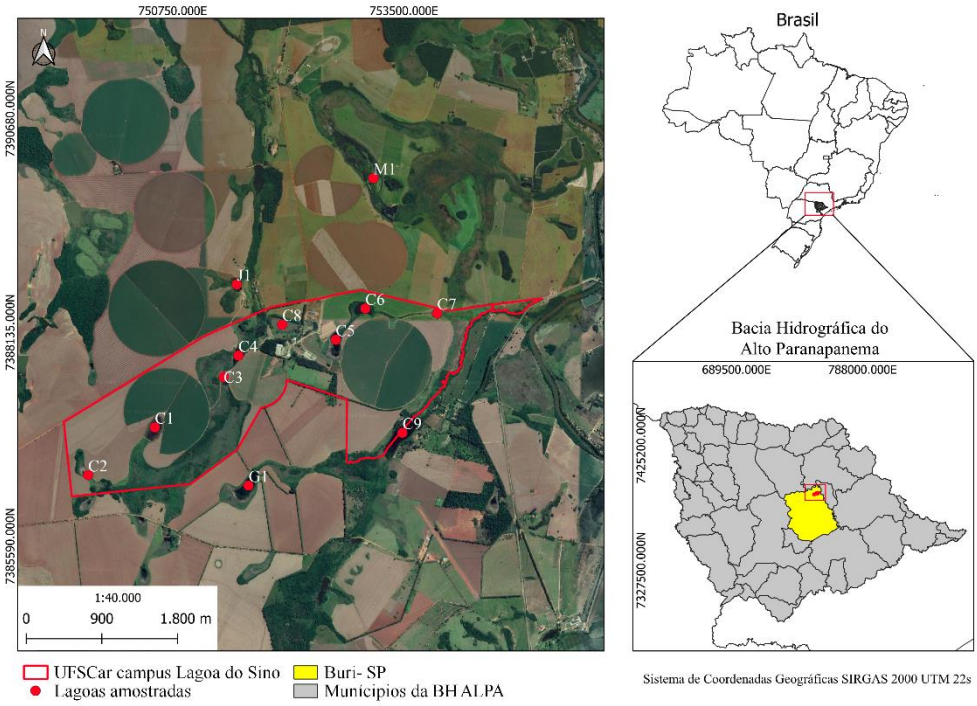


Figura 1. Localização da área do estudo e ambientes amostrados. Fonte: autoria própria.

A pecuária e a agricultura são as principais atividades econômicas da região (Figura 2), sendo também as principais responsáveis pelas alterações antrópicas no ecossistema natural (ANA, 2016).

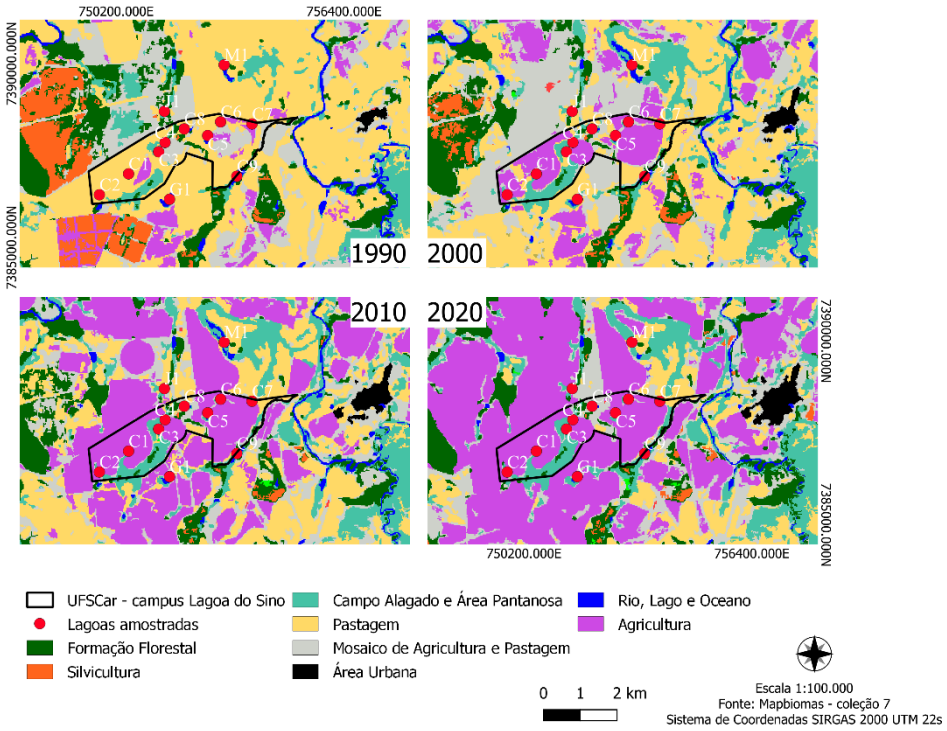


Figura 2. Dinâmica do uso e cobertura do solo na região da UFSCar campus Lagoa do Sino, onde foram feitas as amostragens de jacaré-de-papo-amarelo para o presente estudo. Fonte: autoria própria.

ESPÉCIE DE ESTUDO

O jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) habita diferentes tipos de ambientes aquáticos lênticos como lagoas, açudes, manguezais e brejos, ocupando geralmente o topo da cadeia trófica nesses habitats (THORBJARNARSON et al., 1998). A espécie se alimenta de uma variedade de presas, incluindo crustáceos, moluscos, insetos, peixes e outros vertebrados (MICUCCI; WALLER, 1995; DIEFENBACH, 1988). Este crocodiliano possui porte médio, podendo alcançar 3,5 metros de comprimento, embora atualmente sejam raros os animais com mais de 2 metros na natureza (VERDADE et al., 2010). Sua distribuição compreende a porção sudeste da América do Sul, incluindo o leste do Brasil, nordeste da Argentina, sul do Paraguai, norte do Uruguai e sudoeste da Bolívia (VILLELA, 2004; VERDADE et al., 2010). Atualmente, a espécie encontra-se na categoria Menos Preocupante (LC), tanto em âmbito global (SIROSKI et al., 2020) quanto nacional (COUTINHO et al., 2013). Estudos prévios na região confirmam a presença frequente do jacaré-de-papo-amarelo em açudes e lagoas naturais de fazendas no Alto Paranapanema (MARQUES, 2013; ALMEIDA JÚNIOR, 2019; NEHEMY & SÃO PEDRO, 2021).

CAPTURA DOS ANIMAIS E COLETA DE SANGUE

As capturas dos animais foram realizadas por armadilhas do tipo covo (*Funnel Traps*) (Figura 3A) montadas às margens dos corpos hídricos, parcialmente submersas, iscadas com pedaços de frango ou carne bovina e, checadas diariamente (SAALFELD, 2010; BASSET, 2016). Entre Novembro/2020 e Abril/2021 e, Novembro/2022 e Dezembro/2022, o número de armadilhas montadas e checadas diariamente, variou de uma a cinco armadilhas, distribuídas em uma a três lagoas, o que resultou em aproximadamente 4.604 horas de amostragem.

Como método de coleta complementar foram realizadas seis horas de busca ativa noturna por barco em ambientes aquáticos monitorados, utilizando uma lanterna de luz forte e um laço de cabo de aço, o qual é formado por um cabo de aço preso em uma corda longa e resistente a tensão, para que o animal seja subjugado da maneira mais segura e adequada (HUTTON et al., 1987). O baixo esforço amostral deste método se deu principalmente pela necessidade da participação de terceiros para realizar a busca ativa noturna por barco. Outro fator crucial foi a dificuldade em capturar os espécimes, uma vez que os animais da área do estudo apresentam comportamento ressabiado, denominado por Webb & Messel (1979) como "Wariness", afundando e se abrigando na vegetação ou se distanciando do barco.

As amostras de sangue dos jacarés-de-papo-amarelo foram coletadas no seio occipital venoso na região vertebral cervical (Figura 3D) em volume de entre 1 a 2 mL, dependendo do tamanho do indivíduo, utilizando seringas descartáveis de 3 ml e agulhas descartáveis 22G x 1, 26G x ½ e 21G x 1 ¼, dependendo do tamanho do animal (SYKES et al., 2008; SILVA JÚNIOR, 2013; BASSET, 2016; CARLOS et al., 2017). Em lâminas para microscopia limpas e identificadas, foi feito o esfregaço com gotas do sangue recém coletado e posto para secar ao ar livre. Foram preparadas três lâminas de esfregaço para cada animal. Após o procedimento, a amostra restante foi transferida para *Vacutainers* identificados, com o anticoagulante heparina-sódica e mantidos refrigerados na geladeira (OLIVEIRA, 2015; CARLOS et al., 2017).

Para a biometria foram registrados os comprimentos: total (TTL), rostro-cloacal (SVL) e da cabeça (DCL) com auxílio de uma fita métrica, além da obtenção da massa corpórea do indivíduo, com auxílio da balança digital portátil com gancho e uma corda (VERDADE, 2000; BASSET, 2016). A sexagem foi realizada por exame visual dos órgãos sexuais com auxílio de um espéculo nasal descartável (Figura 3F-G), conforme descrito por Allsteadt & Lang (1995). A marcação individual foi realizada externamente, através de cortes nas cristas caudais simples

e duplas utilizando lâminas descartáveis para bisturi, sendo que os tecidos extraídos nesse procedimento foram armazenados em eppendorf com álcool 70% na Coleção Herpetológica da Lagoa do Sino (CHLS) da UFSCar campus Lagoa do Sino para futuros estudos. A numeração previamente estabelecida seguiu a codificação na qual as cristas caudais simples correspondem às unidades, a crista de escama caudal dupla da direita às dezenas e as escamas duplas da esquerda às centenas (Figura 3E) (BOLTON, 1994). Após a coleta da amostra sanguínea e a marcação, utilizou-se iodo (iodopovidona) para a assepsia dos cortes das cristas caudais. Ao finalizar os procedimentos, o animal foi devolvido ao local de captura.

Em decorrência das normas sanitárias impostas pela pandemia de COVID-19, não foi possível fazer a coleta de amostras sanguíneas de indivíduos do Criatório Caiman, que serviriam como grupo controle. Dessa forma, as amostras obtidas em campo no presente estudo foram comparadas com os valores de referência fornecidos pela pesquisadora Dr. Evelyn C. López González do Proyecto Yacaré na Argentina (Anexo 1), onde os animais estavam sob condições semi-naturais (LÓPEZ-GONZÁLEZ et al., 2022). Entretanto, nos valores fornecidos pela pesquisadora, a contagem dos eritrócitos foi de 1.000 células por indivíduo, diferente do presente trabalho em que foram contabilizados 3.000 por indivíduo, porém no final foi utilizado a média da frequência (expressa em anomalia/1.000 células) para cada parâmetro analisado, além de que anomalias nucleares do tipo núcleo lobulado (LB) não foram contabilizadas pela pesquisadora, portanto, não foi possível realizar a comparação da mesma.

O presente trabalho foi realizado mediante licença de coleta do ICMBio/SISBIO (nº 75935-2 e nº 86309-1) e autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSCar (nº 6037120820). Ressalta-se que as metodologias de captura e coleta sanguínea do presente estudo estão entre as mais aplicadas em estudos com crocodilianos e todos os procedimentos estão de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

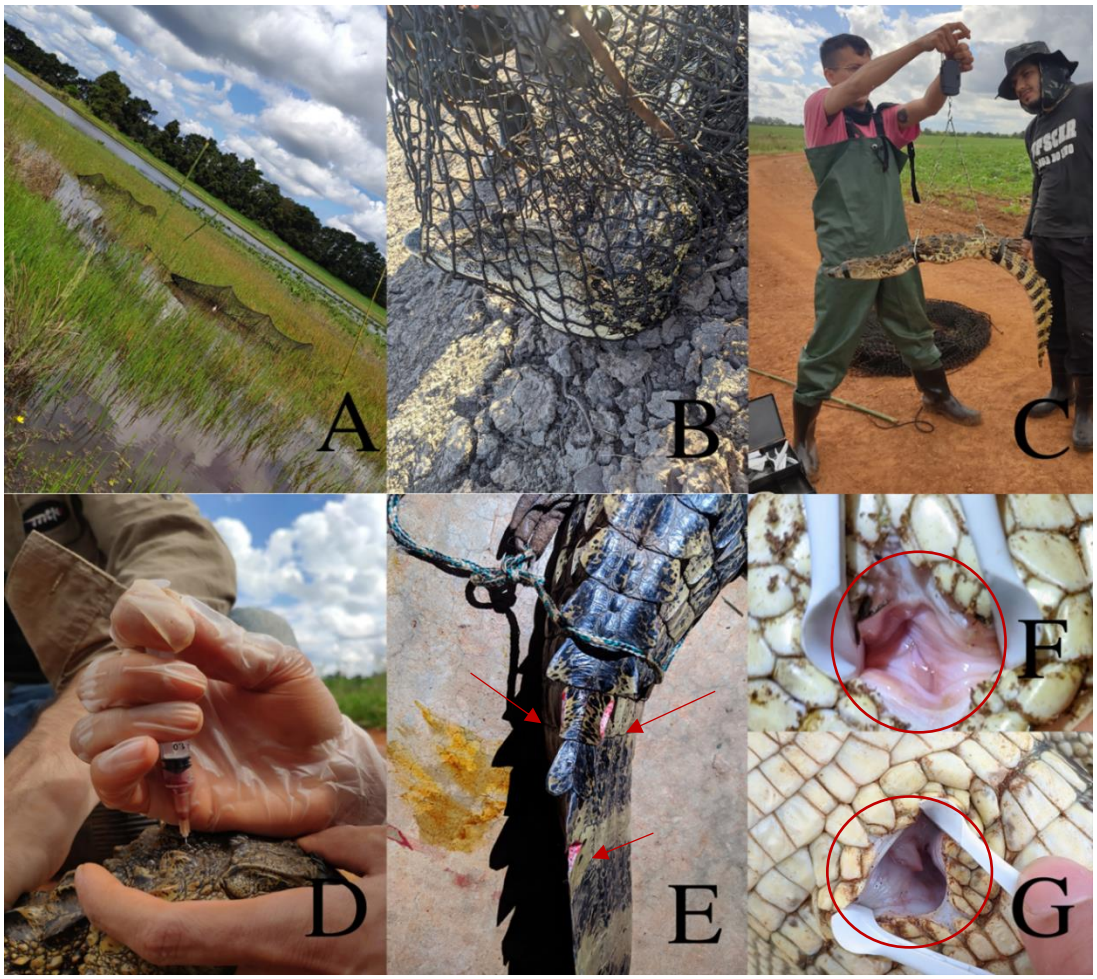


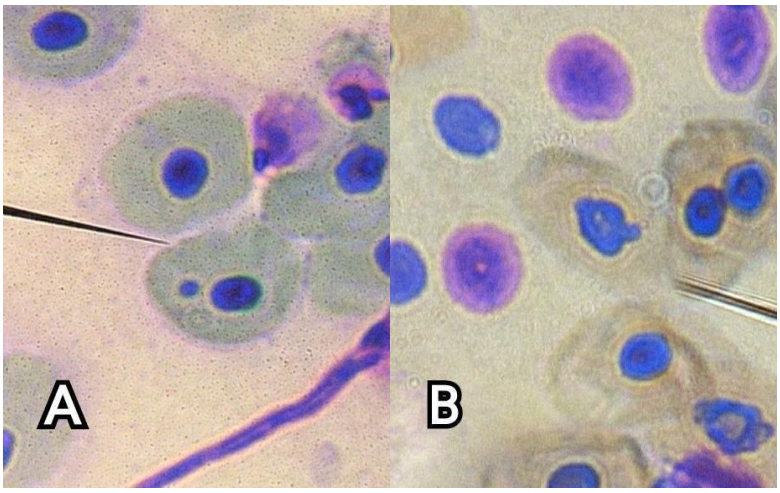
Figura 3. Metodologias utilizadas. A) Armadilha do tipo covo (*Funnel traps*); B) Jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) capturado em armadilha de covo; C) Procedimento de pesagem; D) Coleta de amostra de sangue através de punção do seio occipital venoso na região cervical; E) Cortes nas cristas simples e duplas para a marcação do indivíduo; F-G). Visualização dos órgãos genitais (fêmea e macho, respectivamente). Fonte: autoria própria.

ANÁLISE DAS AMOSTRAS SANGUÍNEAS

Para a análise das amostras coletadas, foi realizado o Teste de Micronúcleo (MN) e outras anomalias nucleares (NAs), a fim de detectar micronúcleos (MN) e outras alterações cromossômicas nos eritrócitos em células sanguíneas dos jacarés-de-papo-amarelo. As alterações foram classificadas de acordo com Carrasco et al (1990) e López-González et al. (2017): célula binucleada (BN), núcleo chanfrado (IV), núcleo lobulado (LB) e núcleo segmentado (BROTO) (Figura 4).

Para o Teste de Micronúcleo (MN) e outras anomalias nucleares (NAs), as lâminas com os esfregaços sanguíneos foram submetidas à coloração hematológica com o corante Panótico rápido (LABORCLIN), no qual utiliza-se de um agente fixador, composto por metanol e corante triarilmetano, além de duas soluções corantes, compostas por xantenos e água deionizada e, tiazinas e água deionizada. A coloração consiste na imersão da lâmina durante cinco segundos no agente fixador, corante xantenos e corante tiazinas, respectivamente e separadamente. Após feito, as lâminas foram lavadas com água deionizada e expostas ao ambiente na posição vertical para secagem natural (LABORCLIN, 2005; OLIVEIRA, 2015).

Após concluídas, as lâminas foram observadas no microscópio óptico no aumento de 1.000x, contabilizando 1.000 eritrócitos por lâmina, totalizando 3.000 células por animal coletado. Para estimar a frequência de células anômalas em cada lâmina, foram contabilizados os números de MN e de NAs com auxílio do contador de células, de acordo com os procedimentos descritos por Carrasco et al (1990), Fenech (2000), Poletta et al. (2008) e López-González et al. (2017).



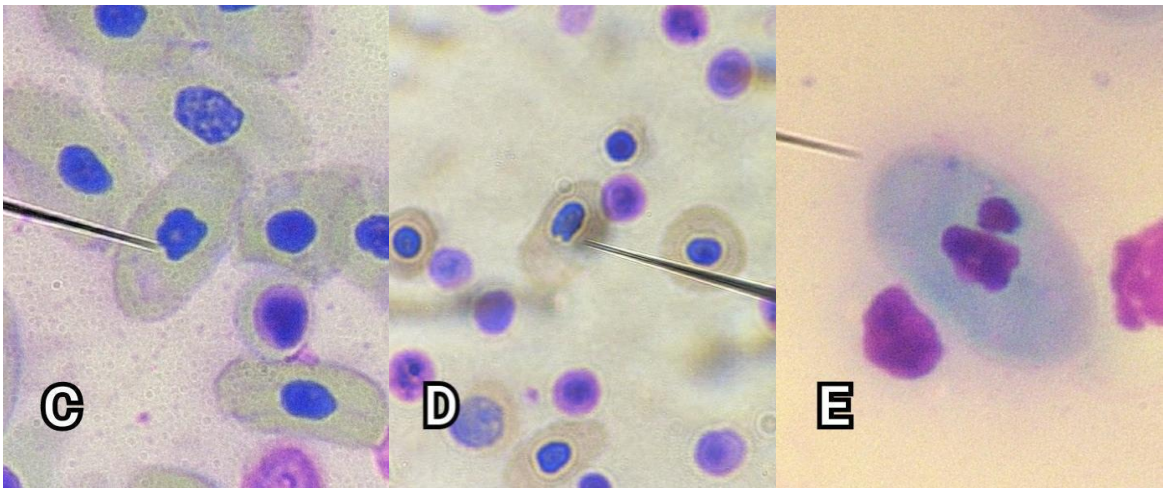


Figura 4. Micronúcleos e outras anomalias nucleares identificadas nas células sanguíneas do jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) no presente estudo; A) Micronúcleo (MN); B) Núcleo segmentado (BROTO); C) Núcleo lobulado (LB); D) Núcleo chanfrado (IV); E) Célula binucleada (BN). Fonte: autoria própria.

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para as análises estatísticas, a distribuição dos dados referentes à contagem de cada tipo de anomalia nas células foram testados quanto à normalidade através do teste de Shapiro-Wilk. Os dados que apresentarem distribuição normal ($p > 0,05$) foram comparados através do teste t de Student. Para dados com distribuição não normal ($p < 0,05$), foi empregado o teste de Kruskal-Wallis. Em todos os casos, valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos, indicando diferença entre os grupos.

Todas as análises foram feitas utilizando o programa R x64 v4.0.3.

RESULTADOS

LEVANTAMENTO POPULACIONAL

Foram investigados 12 ambientes aquáticos, entre lagoas e represas (Figura 1), onde em oito deles registrou-se a presença da espécie. O maior número de jacarés-de-papo-amarelo visualizados nos corpos hídricos foi de 12 indivíduos em uma única lagoa, e o menor número foi um único indivíduo, o que ocorreu em quatro ambientes diferentes (Tabela 1).

Tabela 1. Ambientes aquáticos estudados para a presença de jacarés-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) no município de Buri-SP. Área aproximada da lagoa expressa em hectares.

Ambientes	**Coordenadas geográficas**	**Área aproximada da lagoa**	**Nº indivíduos visualizados**	**Nº indivíduos capturados**	**Nº recapturas**
C1	-23.60800009, -48.54459844	4,55	6	5	3
C2	-23.61341801, -48.55228498	0,47	1	0	0
C3	-23.60257596, -48.53654185	1,15	0	0	0
C4	-23.60033199, -48.53510061	1,46	0	0	0
C5	-23.59841462, -48.52374122	2,88	1	1	0
C6	-23.59498924, -48.52037587	2,16	0	0	0
C7	-23.59536782, -48.51200308	0,39	0	0	0
C8	-23.59683346, -48.52997504	3,47	1	0	0
C9	-23.60826861, -48.51580552	7,08	0	0	0
J1	-23.59264885, -48.53542965	1,13	1	0	0
M1	-23.58097637, -48.51968352	21,16	4	0	0
G1	-23.61414630, -48.53354424	5,02	12	7	6

CAPTURA DOS ANIMAIS

No total, foram realizadas 22 capturas nas armadilhas do tipo covo (*Funnel Traps*) e nenhuma por busca ativa, resultando em 13 indivíduos de *Caiman latirostris*, sendo alguns deles capturados mais de uma vez (Tabela 2).

Tabela 2. Dados biométricos dos indivíduos de *Caiman latirostris* capturados no campus Lagoa do Sino da UFSCar e entorno, município de Buri-SP. Comprimento total (TTL), comprimento rostro-cloacal (SVL), comprimento da cabeça (DCL).

Espécime	TTL (cm)	SVL (cm)	DCL (cm)	Peso (kg)	Sexo	Local de coleta
1	121	60	13	5,17	Fêmea	C1
2	158	78	18	11,03	Fêmea	C1
3	97	48	11,5	2,44	Fêmea	C1
4	118	57	13,5	3,35	Fêmea	C1
5	141	68	16	17,87	Fêmea	C1
6	107	58	15	5,30	Fêmea	C5
7	196	101	22	29,50	Fêmea	G1
8	71	37,5	9	1,06	Macho	G1
9	96	47	11	2,66	Macho	G1
10	93	47	11	2,39	Macho	G1
11	109	50,5	12	3,13	Macho	G1
12	104	51	11	3,09	Macho	G1
13	107	51	12	3,46	Macho	G1

No geral, as recapturas ocorreram entre um a dez dias após a primeira captura, não havendo diferença nos dados biométricos dos indivíduos, entretanto, para o espécime 1, o período de recaptura foi de 13 meses após a captura representada na Tabela 2, sendo que os dados biométricos do indivíduo na recaptura foram: 131 cm (TTL), 64 cm (SVL), 16 cm (DCL) e 6,10 kg (Peso). O espécime 2 foi capturado em uma expedição do Projeto Caiman sete meses antes da captura representada na mesma tabela, sendo que naquele momento o indivíduo havia 138 cm (TTL), 67 cm (SVL), 15 cm (DCL) e 8,20 kg (Peso).

ANÁLISE DAS AMOSTRAS SANGUÍNEAS

Nas amostras sanguíneas dos animais coletados em campo, foram observados micronúcleos (MN), células binucleadas (BN), núcleos chanfrados (IV), núcleos lobulados (LB) e núcleos segmentados (BROTO), conforme mostra a Tabela 3.

Tabela 3. Frequência de micronúcleos e outras anomalias nucleares (média ± desvio padrão) para os indivíduos de *Caiman latirostris* capturados em áreas agrícolas do município de Buri-

SP. Dados expressos em anomalia/1.000 células. A) Micronúcleo (MN); B) Núcleo segmentado (BROTO); C) Núcleo lobulado (LB); D) Núcleo chanfrado (IV); E) Célula binucleada (BN).

Espécime	**MN**	**BN**	**IV**	**BROTO**	**LB**
1	2 ± 1,73	1.33 ± 0,58	17.66 ± 5,50	63.66 ± 5,50	25 ± 7,21
2	2.66 ± 3,05	1 ± 1	33.66 ± 9,29	65 ± 36,59	27.66 ± 5,77
3	4.66 ± 1,15	0.66 ± 1,15	30 ± 5	119.66 ± 7,57	48.33 ± 13,58
4	8 ± 4,58	1.33 ± 1,15	21 ± 1,73	85 ± 5	12 ± 4
5	1.33 ± 2,31	0	15.66 ± 2,89	65.33 ± 7,50	23.33 ± 8,33
*6**	8.66	0	26.3	68.66	8.66
7	3,33 ± 1,52	0,66 ± 0,57	29 ± 6,55	75,33 ± 17,09	38,33 ± 9,71
8	10,33 ± 2,30	1 ± 1	18 ± 13,85	56,33 ± 23,62	23 ± 5,19
9	4,33 ± 0,57	0,33 ± 0,57	25,33 ± 5,85	60,33 ± 12,89	26 ± 15,71
10	1,66 ± 2,08	0,66 ± 1,15	18,66 ± 5,03	37,33 ± 10,96	27 ± 14,73
11	2,66 ± 0,57	0,66 ± 0,57	16,33 ± 5,50	44 ± 8,18	36,66 ± 22,50
12	2,33 ± 1,15	0,33 ± 0,57	40 ± 9,16	78,33 ± 17,38	28,66 ± 6,80
13	1	0,33 ± 0,57	28,33 ± 11,06	48,33 ± 18,58	13,66 ± 5,50
Média total	4,07 ± 3,03	0,63 ± 0,43	24,61 ± 7,49	66,71 ± 20,87	26 ± 10,95

* Para o indivíduo número 6 a contagem dos micronúcleos e outras anomalias nucleares foi realizada em uma única lâmina de esfregaço sanguíneo e, por isso, não apresenta valores de desvio padrão.

As frequências de MN e BN dos animais coletados em áreas agrícolas no presente estudo foram significativamente maiores daquelas observadas nos valores de referência (Figura 5). Para a frequência de IV e BROTO não houve diferença significativa entre os dois grupos. Ao somarmos as anomalias nucleares totais (AN) (BROTO, IV e BN) dos animais coletados neste estudo, e compararmos aos valores de referência, também não houve diferença significativa.

Ao comparar as frequências de MN, BN, IV, LB, BROTO e AN dos espécimes coletados nas lagoas C1 e G1, não foram observadas diferenças significativas.

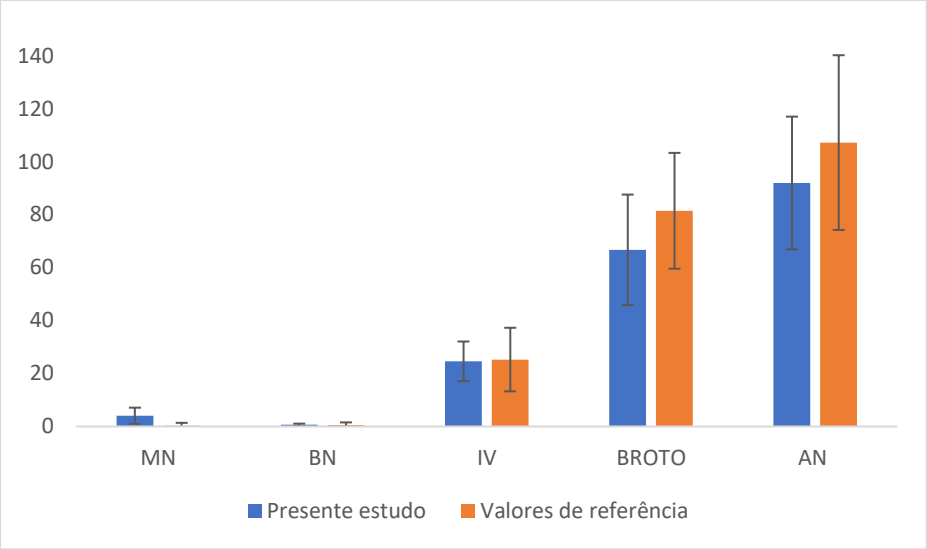


Figura 5. Frequência de micronúcleos (MN), células binucleadas (BN), núcleo chanfrado (IV), núcleo segmentado (BROTO) e anomalias nucleares totais (AN) para os indivíduos coletados no presente estudo e os valores de referência, expressa em anomalias/1.000 células.

Poletta e colaboradores (2008) também investigaram a frequência de MN em *C. latirostris* em ambientes não antropizados e livres de poluentes. Eles encontraram uma taxa de 0,84(± 0,74) MN/1.000 células para jacarés com idades de quatro meses e 1,04 (± 0,92) MN/1.000 células em animais com dez meses (1,04 ± 0,92). Esses valores são significativamente menores do que os encontrados no presente estudo (Figura 6).

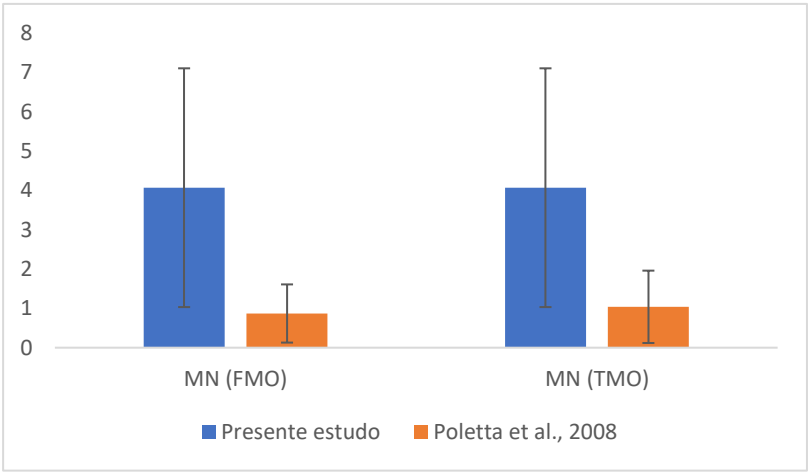


Figura 6. Relação frequência de micronúcleos (MN) para os indivíduos coletados em campo e indivíduos do estudo de Poletta e colaboradores (2008). FMO: frequência de MN em jacarés com quatro meses de idade; TMO: frequência de MN em jacarés com dez meses de idade.

DISCUSSÃO

No presente estudo foi detectado um aumento na frequência de MN e BN em células de jacarés-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) em lagoas de matrizes agrícolas na região da UFSCar campus Lagoa do Sino, onde estudos prévios obtiveram resultados semelhantes para outros grupos animais. Kubo (2019) observou um aumento na frequência de MN, BROTO, LB e IV em células sanguíneas de cágado-de-espinhos (*Acanthochelys spixii*) e, Moraes (2018) observou uma alta frequência de MN e outras anomalias nucleares em células sanguíneas de traíras (*Hoplias malabaricus*), quando comparadas aos valores de referências disponíveis na literatura.

Atualmente, sabe-se que a formação dos micronúcleos e de outras anomalias nucleares podem ser induzidas por agentes genotóxicos, como os agroquímicos (POLETTA et al., 2009; GUILHERME et al., 2010; SCHAUMBURG et al., 2015; LÓPEZ-GONZÁLEZ et al., 2017, 2019, 2021, 2022). Diversos estudos evidenciaram a contaminação do meio ambiente por essas substâncias, por meio da avaliação das concentrações de metais no ambiente, como o cobre (Cu), Chumbo (Pb), Zinco (Zn), Manganês (Mn), Ferro (Fe), Cádmio (Cd) e outros, uma vez que esses metais compõem muitos agrotóxicos (GOBBI, 2011; CAMPOS, 2017; OLIVEIRA, 2019).

Moraes (2018), em seu estudo na UFSCar campus Lagoa do Sino, encontrou traços de Mn, Fe e Cu em corpos hídricos do campus, equivalentes aos ambientes C1 e C4 amostrados neste trabalho. Embora a quantidade desses metais sejam inferiores ao máximo permitido por lei, isto indica a contaminação das águas por agrotóxicos na área do presente estudo.

Ainda no estudo de Moraes (2018), é apresentado uma lista de agroquímicos utilizados nas lavouras da UFSCar campus Lagoa do Sino nos anos de 2015 e 2018, onde estão diversas substâncias classificadas como extremamente tóxicas aos organismos e, de alta periculosidade ambiental, sendo está baseada em parâmetros de bioacumulação, persistência, transporte, toxicidade a diversos organismos, potencial mutagênico, teratogênico e carcinogênico (IBAMA, 1996).

Dentre essas substâncias há o glifosato que está relacionado ao aumento de MN em células de *Caiman latirostris* expostos ainda em período embrionário (ovo) no estudo *ex situ* de López-González e colaboradores (2017). Ainda no mesmo trabalho, os autores observaram o aumento de BROTO e IV à exposição de outros agroquímicos que, aparentemente, não estão em uso na área do estudo.

Poletta et al (2009) ao expor ovos de *Caiman latirostris* em um ensaio *ex situ* a diferentes concentrações de glifosato (Roundup® Full II formulation (66,2% glyphosate)), também observou um aumento significativo na frequência de MN nas células dos jacarés. Além dos danos genotóxicos, más-formações e o aumento de 80% da taxa de mortalidade em filhotes da mesma espécie foram observados pelos autores.

López-González et al. (2019) observaram o aumento de BROTO e IV em células da mesma espécie expostos a formulação de cipermetrina e glifosato e o aumento de MN à exposição da formulação de cipermetrina e clorpirifós, sendo que a cipermetrina é um inseticida piretróide com ação semelhante a algumas substâncias utilizadas no campus e, o clorpirifós é princípio ativo do agrotóxico SABRE® utilizado nas lavouras da UFSCar, segundo Moraes (2018).

Segundo os mesmos autores, o fator determinante para o aumento de MN e AN foi a cipermetrina pois quando expostos à formulação de glifosato e clorpirifós, as células de jacarés não apresentaram aumento estatisticamente significativo de MN e AN, embora outros estudos dos mesmos autores mostraram que quando expostos a essas substâncias separadamente, há a indução de danos genotóxicos.

Em estudo mais recente, López-González e colaboradores (2021) observaram um aumento de MN em neonatos de jacarés-de-papo-amarelo expostos ao glifosato, cipermetrina e clorpirifós separadamente e em formulações contendo as três substâncias. Também foram observados um aumento na frequência de anomalias do tipo BROTO e IV quando expostos a essas substâncias separadamente, de modo que o resultado deste estudo foi semelhante aos estudos realizados anteriormente pelos autores.

Poletta et al. (2011) observou que as alterações encontradas nos sistemas enzimáticos e metabolitos e no crescimento em espécimes de *Caiman latirostris* ao nascer e com três meses de vida, não foram mais observadas nos mesmos indivíduos aos 12 meses de idade. Junto a isto, sabe-se que nas fases iniciais da vida dos animais ovíparos, o organismo é mais suscetível a alterações no ambiente, uma vez que o sistema de reparação de danos é pouco desenvolvido (POLETTA et al., 2009; UGGINI et al., 2010). Na fase adulta com o sistema de reparação de danos desenvolvido, o organismo é capaz de se recuperar dos danos, retornando a níveis normais (POLETTA et al., 2009, 2011). Portanto, é possível que nos indivíduos analisados neste estudo, esse sistema foi capaz de reparar os danos e retornar as anomalias do tipo BROTO e IV a valores semelhantes aos valores de referências, não havendo diferença significativa entre

eles, entretanto, para aferir essa suposição seriam necessárias amostras sanguíneas de indivíduos na fase de vida adulta, uma vez que neonatos e filhotes são mais vulneráveis a agrotóxicos e possivelmente possuem valores basais de AN mais elevados quando comparados a adultos.

Com base nesses estudos, há grandes chances do aumento na frequência de MN e BN observadas no presente trabalho estarem relacionadas ao uso de agrotóxicos e a contaminação dos corpos hídricos no campus Lagoa do Sino e entorno, dessa forma, sugere-se realizar estudos físico-químicos do solo e da água na área do estudo para avaliar a possível contaminação destes ambientes, além da utilização de outros indicadores ou biomarcadores para gerar dados definitivos sobre a saúde das populações de *Caiman latirostris* na área do estudo, uma vez que um único biomarcador não é suficiente para refletir o estado de saúde do organismo, sendo necessárias uma bateria de biomarcadores e/ou indicadores para avaliar os efeitos dos agrotóxicos na saúde dos animais.

Recomenda-se também estudos que busquem avaliar danos no DNA dos indivíduos da espécie através do ensaio cometa em amostras sanguíneas, como também estudos que avaliem a presença de metais pesados em amostras de tecido dos jacarés coletados neste trabalho. Além disso, estudos populacionais também são essenciais para avaliarmos a viabilidade das populações em ambientes agrícolas, uma vez que o aumento de más-formações, mortalidade e até da proporção de macho no ninho são possíveis consequências da exposição desta espécie aos agrotóxicos (POLETTA et al., 2009; RUEDA-ALMONACID et al., 2009). Estudos desta natureza são de extrema importância para compreendermos os impactos do atual modelo de manejo do solo empregado na região do Alto Paranapanema e por todo o Brasil, para a partir daí, buscarmos soluções para a mitigação destes impactos e conservação da espécie nesses ambientes.

Este é o primeiro estudo realizado para avaliar o potencial genotóxico dos agroquímicos em células sanguíneas de *Caiman latirostris* em ambientes agrícolas (*in situ*) no Brasil. Portanto, através deste trabalho espera-se incentivar o surgimento de novos estudos que busquem avaliar os impactos dos agrotóxicos no jacaré-de-papo-amarelo em ambientes de vida livre no país, como também estudos com outras espécies da fauna brasileira.

CONCLUSÃO

Através deste trabalho, foi possível detectar danos genotóxicos nas células sanguíneas de *Caiman latirostris* em taxas maiores do que as encontradas em situações sem a presença de

contaminantes. Apesar da ausência de dados de análise da água dos ambientes estudados, é altamente provável que estes estejam contaminados pelo uso de agroquímicos nas lavouras do campus Lagoa do Sino da UFSCar, fortalecendo a hipótese da acumulação dessas substâncias na cadeia trófica (biomagnificação)

Não foram encontrados estudos que determinaram valores de referência para a frequência de micronúcleos e outras anomalias nucleares em indivíduos de *Caiman latirostris* na fase de vida adulta e em ambientes livres de contaminantes. É essencial que novos estudos desta natureza sejam desenvolvidos para que esses valores de referência sejam estabelecidos de forma definitiva. A partir daí, a espécie poderá ser utilizada como um confiável bioindicador da qualidade dos ambientes aquáticos em áreas agrícolas e peri-urbanas. Esses estudos ajudarão também a compreender a eficiência do sistema de reparação celular em diferentes fases da vida dos crocodilianos, como sugerem Poletta et al. (2009) e Poletta et al. (2011).

O trabalho contribuiu de forma significativa com o censo populacional e monitoramento do jacaré-de-papo-amarelo em matrizes agrícolas no campus Lagoa do Sino da UFSCar e arredores, no município de Buri, estado de São Paulo e, com o panorama geral da saúde dos jacarés nesses ambientes, sugerindo que os animais podem estar sofrendo danos pelo uso de agrotóxicos empregados nos atuais modelos de manejo agrícola no Brasil e no mundo, fato que deve ser profundamente estudado para aferir esta suposição, utilizando novos indicadores/biomarcadores, além de um maior número amostral e a análise de amostras sanguíneas de jacarés-de-papo-amarelo em diferentes etapas de desenvolvimento (neonato, jovem, adulto) na área do estudo.

A princípio, o estudo também buscou relacionar a ocorrência dessas anomalias nucleares com o potencial genotóxico dos agroquímicos, entretanto, a ausência de parcerias com laboratórios e universidades e o aumento de 100% dos custos das análises de resíduos de agrotóxicos em amostras de água dos ambientes amostrados quando comparamos o orçamento realizado em 2020 e o mesmo orçamento em 2022 na mesma empresa, junto a ausência do grupo-controle adequado, impossibilitaram aferirmos a ocorrência dessas anomalias nucleares com o potencial genotóxico dos agroquímicos. A ausência do grupo-controle também nos impediu de compararmos a compararmos a ocorrência de anomalias nucleares em células sanguíneas de jacarés-de-papo-amarelo *in situ* com a de indivíduos de cativeiro (grupo controle).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allsteadt, J., & Lang, J. W. (1995). Sexual dimorphism in the genital morphology of young American alligators, *Alligator mississippiensis*. *Herpetologica*, 314-325.

Almeida Júnior, J. E. (2019). Estudo populacional de jacaré-de-papo-amarelo [Caiman latirostris (Daudin, 1801)] em uma paisagem agrícola da bacia do Alto Paranapanema, estado de São Paulo, Brasil. Report for the Crocodile Specialist Group (CSG) – IUCN.

Ana – Agência Nacional de Águas (2014). UGRH PARANAPANEMA. Diagnóstico. Brasília.

Ana – Agência Nacional de Águas (2016). Plano Integrado de Recursos Hídricos da Unidade de Gestão de Recursos Hídricos Paranapanema.

Andréa, M. M. (2008). Bioindicadores ecotoxicológicos de agrotóxicos. (Comunicado Técnico, 83). Disponível em: < http://www.biologico.sp.gov.br/publicacoes/comunicados-documentos-tecnicos/comunicados-tecnicos/bioindicadores-ecotoxicologicos-de-agrotoxicos>. Acesso em: 26/02/2023.

Arnot, J. A., & Gobas, F. A. (2006). A review of bioconcentration factor (BCF) and bioaccumulation factor (BAF) assessments for organic chemicals in aquatic organisms. *Environmental Reviews*, *14*(4), 257-297.

Basset, L. A. B. (2016). Estado sanitário do jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) em paisagens antropizadas no Estado de São Paulo (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).

Bickham, J. W., Sandhu, S., Hebert, P. D., Chikhi, L., & Athwal, R. (2000). Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. *Mutation research/Reviews in Mutation research*, *463*(1), 33-51.

Bolton, M. (1994). La explotación del cocodrilo en cautividad. Guía FAO Conservación. Roma, v. 22 p. 156.

Borteiro, C., Prigioni, C., García, J. E., Tedros, M., Gutiérrez, F., & Kolenc, F. (2006). Geographic distribution and conservation status of *Caiman latirostris* (Crocodylia, Alligatoridae) in Uruguay. *Phyllomedusa: Journal of Herpetology*, *5*(2), 97-108.

Campos, N. M. (2017). Disponibilidade de metais-traço em solos submetidos à agricultura intensiva em Jaguaquara, Ba.

Carlos, N., Nuñez del Prado, Y., Quispe, D., & Capuñay, C. (2017). Valores hematológicos y bioquímica sérica del Caimán Blanco (*Caiman crocodilus*) de vida libre en Madre de Dios, Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, *28*(1), 189-194.

Carrasco, K. R., Tilbury, K. L., & Myers, M. S. (1990). Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, *47*(11), 2123-2136.

Costa, H. C., & Bérnils, R. S. (2018). Répteis do Brasil e suas Unidades Federativas: Lista de espécies. *Herpetologia brasileira*, *7*(1), 11-57.

Coutinho, M. E., Marioni, B., Farias, I. P., Verdade, L. M., Bassetti, L., de Mendonça, S. H., ... & Campos, Z. (2013). Avaliação do risco de extinção do jacaré-de-papo-amarelo *Caiman latirostris* (Daudin, 1802) no Brasil.

Crosby, E. B., Bailey, J. M., Oliveri, A. N., & Levin, E. D. (2015). Neurobehavioral impairments caused by developmental imidacloprid exposure in zebrafish. *Neurotoxicology and teratology*, *49*, 81-90.

Diefenbach, C. O. D. C. (1988). Thermal and feeding relations of *Caiman latirostris* (Crocodylia: Reptilia). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, *89*(2), 149-155.

Fenech, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *455*(1-2), 81-95.

Fenech, M., Knasmueller, S., Bolognesi, C., Bonassi, S., Holland, N., Migliore, L., ... & Kirsch-Volders, M. (2016). Molecular mechanisms by which in vivo exposure to exogenous chemical genotoxic agents can lead to micronucleus formation in lymphocytes in vivo and ex vivo in humans. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, *770*, 12-25.

Fernandes, T. C. C. (2005). Investigação dos efeitos tóxicos, mutagênicos e genotóxicos do herbicida trifluralina, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como sistemas-testes. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências

Filizola, H. F., Ferracini, V. L., Sans, L. M. A., Gomes, M. A. F., & Ferreira, C. J. A. (2002). Monitoramento e avaliação do risco de contaminação por pesticidas em água superficial e subterrânea na região de Guaíra. *Pesquisa agropecuária brasileira*, *37*, 659-667.

Filogonio, R., Assis, V. B., Passos, L. F., & Coutinho, M. E. (2010). Distribution of populations of broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*, Daudin 1802, Alligatoridae) in the São Francisco River basin, Brazil. *Brazilian Journal of Biology, 70*, 961-968.

Gobbi, J. M., Melo, M. M., Crepaldi, D. V., & Teixeira, E. A. (2011). Trace elements detection in tissues of fish (*Pseudoplatystoma coruscans*) caught in the São Francisco river (MG). *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, *18*(1).

Green, R. E., Cornell, S. J., Scharlemann, J. P., & Balmford, A. (2005). Farming and the fate of wild nature. *science*, *307*(5709), 550-555.

Guilherme, S., Gaivão, I., Santos, M. A., & Pacheco, M. (2010). European eel (*Anguilla anguilla*) genotoxic and pro-oxidant responses following short-term exposure to Roundup®—a glyphosate-based herbicide. *Mutagenesis*, *25*(5), 523-530.

Hutton, J. M., Loveridge, J. P., & Blake, D. K. (1987). Capture methods for the Nile crocodile in Zimbabwe. Wildlife management: Crocodiles and alligators. Surrey Beatty & Sons, Australia, 243-247.

Ibama - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (1996). PORTARIA NORMATIVA IBAMA Nº 84, DE 15 DE OUTUBRO DE 1996. Disponível em: http://www.aenda.org.br/wp-content/uploads/2018/02/portaria-ibama-84-1996-avaliacao-ambiental.pdf. Acesso em: 07/02/2023.

Kronka, F. J. N., Nalon, M. A., Matsukuma, C. K. (2005). Inventário florestal da vegetação natural do estado de São Paulo. São Paulo. Instituto Florestal, SEMA, São Paulo.

Kubo, W. K. (2019). Levantamento de espécies de cágados no Alto do Paranapanema e seu uso como indicadores de contaminação da água por agroquímicos. Programa de Iniciação Científica e Tecnológica da UFSCar, dados não publicados.

Laborclin (2005). Instruções de uso - Corante Panótico Rápido LB.: Laborclin produtos para laboratórios Ltda. - BULA DE REAGENTE.

Londres, F. (2011). Pesticides in Brazil: a guide to action in defense of life. Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida). Rio de Janeiro: ASPTA–Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa.

López González, E., Larriera, A., Siroski, P. A., & Poletta, G. L. (2017). Micronuclei and other nuclear abnormalities on *Caiman latirostris* (Broad-snouted caiman) hatchlings after

embryonic exposure to different pesticide formulations. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *136*, 84-91.

López González, E., Odetti, L. M., Latorre, M. A., Avila, O. B., Contini, L. E., Siroski, P. A., & Poletta, G. L. (2022). A comprehensive approach using multiple biomarkers to detect damage induced by pesticides in broad-snouted caiman (Caiman latirostris) under ex-situ conditions. Heliyon, 8(1), e08667.

López González, E., Romito, M. L., Latorre, M. A., Siroski, P. A., & Poletta, G. L. (2021). Biomarkers of genotoxicity, immunotoxicity and oxidative stress on *Caiman latirostris* (Broad-snouted caiman) hatchlings exposed to pesticide formulations and mixtures widely used in agriculture. *Environmental Advances*, *5*, 100114.

López González, E., Siroski, P. A., & Poletta, G. L. (2019). Genotoxicity induced by widely used pesticide binary mixtures on *Caiman latirostris* (broad-snouted caiman). *Chemosphere*, *232*, 337-344.

Marques, T. S. (2013). Estrutura populacional, uso do espaço e ecologia trófica de jacarés-de-papo-amarelo *(Caiman latirostris)* em paisagem silvicultural (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).

Marrugo-negrete, J., Durango-hernández, J., Calao-ramos, C., Urango-cárdenas, I., & Díez, S. (2019). Mercury levels and genotoxic effect in caimans from tropical ecosystems impacted by gold mining. Science of The Total Environment. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.01.340.

Mendes, R. A., da Costa Lopes, A. S., de Souza, L. C., de Oliveira Lima, M., & da Silva Santos, L. (2016). DDT concentration in fish from the Tapajós River in the Amazon region, Brazil. *Chemosphere*, *153*, 340-345.

Micucci, P. A., & Waller, T. (1995). Los yacarés en Argentina: hacia un aprovechamiento sustentable. *La conservación y el manejo de caimanes y cocodrilos de América Latina*, *1*, 81-112.

Mitchelmore, C. L., Rowe, C. L., & Place, A. R. (2005). Tools for assessing contaminant exposure and effects in reptiles. *Toxicology of Reptiles*, 63-122.

Moraes, N. G. (2018). Análises ecotoxicologicas para a investigação dos efeitos resultantes do uso intensivo de agrotóxicos na fazenda do Campus Lagoa do Sino. 2018. 61 páginas. Bacharel – Centro de Ciências da Natureza, Universidade Federal de São Carlos, Buri, 2018.

Nehemy, I. K. R., & São Pedro, V. D. A. (2021). Répteis da região do Campus Lagoa do Sino da Universidade Federal de São Carlos, Buri, sudeste do Brasil.

Oliveira, J. L. D. S. (2019). Recursos hídricos: percepção ambiental de agricultores e estudo dos efeitos ecotoxicológicos da água do Rio Piancó e de metais pesados em espécies agrícolas.
Oliveira, V. C. S. (2015). Análise citogenética e genotóxica de *Caiman crocodilus* (Linnaeus, 1758) provenientes de ambiente natural e antropizado dos arredores de Manaus.

Poletta, G. L., Kleinsorge, E., Paonessa, A., Mudry, M. D., Larriera, A., & Siroski, P. A. (2011). Genetic, enzymatic and developmental alterations observed in *Caiman latirostris* exposed in ovo to pesticide formulations and mixtures in an experiment simulating environmental exposure. *Ecotoxicology and environmental safety*, *74*(4), 852-859.

Poletta, G. L., Larriera, A., Kleinsorge, E., & Mudry, M. D. (2009). Genotoxicity of the herbicide formulation Roundup®(glyphosate) in broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) evidenced by the Comet assay and the Micronucleus test. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, *672*(2), 95-102.

Poletta, G. L., Larriera, A., Kleinsorge, E., & Mudry, M. D. (2008). *Caiman latirostris* (broad-snouted caiman) as a sentinel organism for genotoxic monitoring: basal values determination of micronucleus and comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, *650*(2), 202-209.

Ponte, F. C., Furtado, A. M. M., da Silva, C. N., da Silva, J. M. P., & Lima, R. S. (2015). Parâmetros fisiográficos e impactos ambientais da rodovia Santarém-Cuiabá (BR-163), ESTADO DO PARÁ (BRASIL). *REDE-Revista Eletrônica do PRODEMA*, *9*(2).

Presoti, A. E. P. (2008). Avaliação de impactos ambientais da sojicultura em um ecossistema aquático da microrregião de Chapadinha, MA. Dissertação (Mestrado em OCEANOGRAFIA E LIMNOLOGIA) – Universidade Federal do Maranhão, São Luis,

Rueda-almonacid, J. V., Mittermeier, C., Carr, J. L., Mittermeier, R. A., Malecha, J. V. R., Mast, R., ... & Rueda, J. N. (2007). Las tortugas y los cocodrilianos de los paises andinos del tropico. Conservación Internacional, Bogotá, Colômbia. 538p.

Saalfeld, D. T. (2010). American Alligator *(Alligator mississippiensis)* ecology in inland wetlands of east Texas. Stephen F. Austin State University.

Sabik, H., Jeannot, R., & Rondeau, B. (2000). Multiresidue methods using solid-phase extraction techniques for monitoring priority pesticides, including triazines and degradation products, in ground and surface waters. *Journal of chromatography A*, *885*(1-2), 217-236.

Sala, O. E., Stuart Chapin, F. I. I. I., Armesto, J. J., Berlow, E., Bloomfield, J., Dirzo, R., ... & Wall, D. H. (2000). Global biodiversity scenarios for the year 2100. *science*, *287*(5459), 1770-1774.

Schaumburg, L. G., Siroski, P. A., Poletta, G. L., & Mudry, M. D. (2016). Genotoxicity induced by Roundup®(Glyphosate) in tegu lizard (*Salvator merianae*) embryos. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *130*, 71-78.

Silva Júnior, O. T. (2013). Contenção farmacológica de jacaré tinga *Caiman crocodilus* linnaeus (Crocodylia: Alligatoridae) com propofol. 2013. 34 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

Siroski, P., Bassetti, L. A. B., Piña, C., & Larriera, A. (2020). Caiman latirostris. The IUCN Red List of Threatened Species 2020: e.T46585A3009813. https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-3.RLTS.T46585A3009813.en. Accessed on 25 February 2023.

Spadotto, C. A., Gomes, M. A. F., Luchini, L. C., & De Andréa, M. M. (2004). Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações. Embrapa Meio Ambiente-Documentos (INFOTECA-E).

Sykes, I.V, John, M., & Klaphake, E. (2008). Reptile hematology. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, *11*(3), 481-500.

Thorbjarnarson, J. B., Ross, J. P., & Espinosa, E. (1998). Crocodiles: an action plan for their conservation. *IUCN, Gland, Switzerland*.

Verdade, L. M. (2000). Regression equations between body and head measurements in the broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*). *Revista Brasileira de Biologia*, *60*, 469-482.

Verdade, L. M., Larriera, A., & Piña, C. I. (2010). Broad-snouted caiman *Caiman latirostris*. *Crocodiles Status Survey and Conservation Action Plan*, *18*, 22.

Vieira, T. Q., Silva, F. B. D., & Heubel, M. T. C. D. (2002). Biometria, hematologia e genética de *Caiman Latirostris* (Daudin, 1801) na Região de Bauru (SP). *Salusvita*, 67-85.

Villela, P. M. S. (2004). Caracterização genética de populações de jacaré-de-papo-amarelo *(Caiman latirostris), utilizando marcadores microssatélites* (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).

Wang, Y., Chen, C., Zhao, X., Wang, Q., & Qian, Y. (2015). Assessing joint toxicity of four organophosphate and carbamate insecticides in common carp (*Cyprinus carpio*) using acetylcholinesterase activity as an endpoint. *Pesticide biochemistry and physiology*, *122*, 81-85.

Webb, G. J. W., & Messel, H. (1979). Wariness in *Crocodylus porosus* (Reptilia: Crocodilidae). *Wildlife Research*, *6*(2), 227-234.

Zapata, L. M., Bock, B. C., Orozco, L. Y., & Palacio, J. A. (2016). Application of the micronucleus test and comet assay in *Trachemys callirostris* erythrocytes as a model for in situ genotoxic monitoring. *Ecotoxicology and environmental safety*, *127*, 108-11.

ANEXOS

Anexo 1

Frequência de micronúcleos e outras anomalias nucleares para os indivíduos de *Caiman latirostris* fornecidos por Evelyn C. López González. Dados expressos em anomalia/1.000 células. Micronúcleos (MN), células binucleadas (BN), núcleos chanfrados (IV) e núcleos segmentados (BROTO).

Espécime	**MN**	**BN**	**IV**	**BROTO**
1	1	0	11	75
2	0	0	33	91
3	0	0	31	72
4	0	0	22	69
5	2	2	35	90
6	0	0	7	48
7	0	0	30	74
8	0	0	10	44
9	2	4	31	105
10	1	0	57	136
11	0	1	21	87
12	0	0	12	54
13	0	0	18	87
14	0	1	30	78
15	0	0	33	96
16	0	0	17	73
17	0	0	28	103
18	0	1	29	84
Média	0,33	0,5	25,27	81,44