



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL**  
**CAMPUS ERECHIM**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL**

**GUILHERME VICTOR VANZETTO**

**EFEITOS LETAIS E SUBLETAIS DE CIPERMETRINA E DELTAMETRINA EM  
LARVAS DE *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae)**

**ERECHIM**

**2016**

**GUILHERME VICTOR VANZETTO**

**EFEITOS LETAIS E SUBLETAIS DE CIPERMETRINA E DELTAMETRINA EM  
LARVAS DE *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS, campus Erechim, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental.

**Orientadores:**

**Prof. Dr(a). Marília Teresinha Hartmann.**

**Prof. Dr. Paulo Afonso Hartmann.**

**Orientadora externa:**

**Prof. Dr(a). Cláudia Maris Ferreira Mostério.**

**ERECHIM**

**2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL**

CAMPUS ERECHIM

ERS 135 – Km 72, nº 200

CEP: 99700-970

Caixa Postal 764

Erechim - RS

Brasil

**GUILHERME VICTOR VANZETTO**

**EFEITOS LETAIS E SUBLETAIS DE CIPERMETRINA E DELTAMETRINA EM  
LARVAS DE *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae)**

Dissertação de mestrado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Fronteira Sul, campus Erechim, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental. Orientadores: Prof<sup>a</sup> Dra. Marília Teresinha Hartmann e Prof. Dr. Paulo Afonso Hartmann. Orientadora externa: Prof<sup>a</sup>. Dra. Cláudia Maris Ferreira Mostério. Defendido e aprovado pela banca examinadora em 30/11/2016.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup> Dra. Marília Teresinha Hartmann  
Orientadora

---

Prof. Dr. Paulo Afonso Hartmann  
Orientador

---

Prof<sup>a</sup> Dra. Cláudia Maris Ferreira Mostério  
Instituto de Pesca – APTA – SAA – SP

---

Prof. Dr. Elton Celton de Oliveira  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Dois Vizinhos

---

Prof<sup>a</sup> Dra. Nédia de Castilhos Ghisi  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Dois Vizinhos

ERECHIM/RS, NOVEMBRO DE 2016.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais Ildo Agostinho Vanzetto e Suzimar Maria Pavan Vanzetto que em nenhum momento duvidaram da minha capacidade e jamais deixaram de me apoiar. Devo a eles cada uma de minhas vitórias.

A minha irmã Suelen, sempre presente, onde eu posso encontrar apoio nos percalços do caminho, pelo incentivo e exemplo.

A minha namorada Laura, responsável pela minha dedicação, garra e determinação, pela paciência, compreensão e apoio. Agradeço, em especial, a toda minha família, que mesmo muitas vezes sem compreender, nunca deixaram de me apoiar e de ser um porto seguro para mim.

Aos amigos orientadores, Marília Hartmann e Paulo Hartmann, pela oportunidade, pela troca de experiência e por me orientarem com sua sabedoria bem como pelo tempo dedicado ao meu trabalho, um exemplo de determinação, profissionalismo e dignidade.

A amiga orientadora externa, Cláudia Maris Ferreira Mostério, por dividir seu conhecimento, abrigar a pesquisa no Instituto de Pesca e abrir as portas do Instituto Biológico, meu muito obrigado.

A amiga, Ana Cristina Pinto da Fonseca Martins, por compartilhar sua experiência e seu conhecimento, pelo espaço cedido e dedicação. A amiga, Sthefany Rosa, por seu auxílio.

Ao grupo de pesquisa, Camila, Cassiane, Grégori, Jéssica S., Jéssica, Juliana, Natani, Paola, pela troca de conhecimentos e auxílio nas atividades. As Técnicas de Laboratório Ângela, Flávia e Suzana pelo suporte.

Enfim, obrigado a todos que contribuíram para a realização deste estudo, que de uma forma, ou outra, foram responsáveis e testemunhas de minha conquista.

## RESUMO

Os agrotóxicos vêm sendo amplamente utilizados na agricultura garantindo suprimento de alimentos para uma população em constante crescimento. Um dos grupos de agrotóxicos mais utilizados na atualidade são os inseticidas piretróides, no entanto, estes compostos têm trazido riscos a espécies não alvo como os anfíbios. Este estudo avaliou os efeitos toxicológicos causados a uma espécie nativa de anfíbio anuro, *Physalaemus gracilis*, expostos a dois inseticidas, cipermetrina e deltametrina. Para tal, foram coletadas desovas totais em meio natural, e transportadas até o laboratório onde foram mantidas em condições controladas para seu desenvolvimento larval. Os testes de toxicidade foram realizados com larvas nos estágios 24-25 de Gosner. Foi realizado teste agudo para determinação da  $CL_{50\ 96h}$  e teste crônico, onde se avaliou a mortalidade, atividade natatória e a morfologia oral das larvas expostas a concentrações subletais. A  $CL_{50\ 96h}$  foi determinada pelo método Trimmed Spearman-Kärber, para cipermetrina foi 5,4 mg/L e 0,46 mg/L para deltametrina. Os testes crônicos foram definidos em 1/50; 1/75, 1/100, 1/200, 1/300 e 1/500 da  $CL_{50\ 96h}$ , ou seja, 0,1, 0,07, 0,05, 0,03, 0,02 e 0,01 mg/L de cipermetrina e 0,009, 0,006, 0,004, 0,003, 0,0015 e 0,001 mg/L de deltametrina. Ocorreu influência significativa da mortalidade com relação ao tempo e ao aumento das concentrações ( $p < 0,001$ ). Observando o efeito da mortalidade, a concentração de efeito não observado (CENO) para cipermetrina foi 0,02 mg/L e a concentração de efeito observado (CEO) foi 0,01 mg/L. Para deltametrina CENO = 0,004 mg/L e CEO = 0,003 mg/L. O valor crônico para efeito da mortalidade foi 0,015 mg/L de cipermetrina e 0,003 mg/L de deltametrina. Os efeitos da exposição também influenciaram na atividade natatória, onde cipermetrina imobilizou os indivíduos. Na morfologia oral ambos agrotóxicos apresentaram alterações como ausência de denticulos e de mandíbula. Conclui-se que os piretróides com princípio ativo cipermetrina e deltametrina apresentam efeitos toxicológicos para espécies não alvo, tal como larvas de *Physalaemus gracilis*.

Palavras-chave: Anfíbios. Concentração letal. Inseticidas. Piretróides. Toxicidade.

## ABSTRACT

Agrochemicals have been widely used in agriculture, ensuring food supply for a constantly growing population. One of the groups of pesticides most used today are pyrethroid insecticides, however, these compounds have brought risks to non-target species such as amphibians. This study evaluated the toxicological effects caused to the native species of amphibian Anuran, *Physalaemus gracilis*, exposed to two insecticides, cypermethrin and deltamethrin. For this, total spawnings were collected in the natural environment, and transported to the laboratory where they were kept under controlled conditions for their larval development. Toxicity tests were performed on larvae at stages 24-25 of Gosner. An acute test was performed to determine the  $LC_{50\ 96h}$  and chronic test, where the mortality, swimming activity and oral morphology of larvae exposed to sublethal concentrations were evaluated. The  $LC_{50\ 96h}$  was determined by the Trimmed Spearman-Kärber method, for cypermethrin was 5.4 mg/L and 0.46 mg/L for deltamethrin. Chronic tests were defined as 1/50; 1/75, 1/100, 1/200, 1/300 and 1/500 of the  $LC_{50\ 96h}$ , ie 0.1, 0.07, 0.05, 0.03, 0.02 and 0.01 mg/L cypermethrin and 0.009, 0.006, 0.004, 0.003, 0.0015 And 0.001 mg/L deltamethrin. There was a significant influence of mortality in relation to time and increase of concentrations ( $p < 0.001$ ). Observed the effect of mortality, the unobserved effect concentration (CENO) for cypermethrin was 0.02 mg/L and the observed effect concentration (CEO) was 0.01 mg/L. For deltamethrin CENO = 0.004 mg/L and CEO = 0.003 mg/L. The chronic value for mortality effect was 0.015 mg/L cypermethrin and 0.003 mg/L deltamethrin. The effects of exposure also influenced swimming activity, where cypermethrin immobilized individuals. In the oral morphology both pesticides presented alterations like absence of denticles and mandible. It is concluded that pyrethroids with active principle cypermethrin and deltamethrin have toxicological effects for non-target species, such as *Physalis gracilis* larvae.

Keywords: Amphibian. Lethal concentration. Insecticides. Pyrethroids. Toxicity.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Agrotóxicos utilizados no estudo, ingredientes e tipo de formulação. ....	17
Tabela 2 - Mortalidade de larvas (número de indivíduos) de <i>Physalaemus gracilis</i> em teste agudo em função do tempo de exposição aos agrotóxicos cipermetrina e deltametrina.....	24
Tabela 3 - Mortalidade (número de indivíduos) de larvas de <i>Physalaemus gracilis</i> em teste crônico ao longo do tempo de exposição aos agrotóxicos cipermetrina e deltametrina.....	27
Tabela 4 - Atividade natatória de larvas de <i>Physalaemus gracilis</i> expostos a cipermetrina e deltametrina. Endpoints: (3) – movimentos natatórios iguais ao controle, ou seja, sem alterações na natação da larva, quando comparado ao controle; (2) – movimentos natatórios diferentes do controle, em círculos ou movimento menor que o controle; (1) – movimentos natatórios somente com estímulo de toque em alguma parte do corpo e (0) - considerado estático, mas vivo. ....	29
Tabela 5 - Alterações na morfologia oral de larvas de <i>Physalaemus gracilis</i> expostos a cipermetrina, deltametrina, e formol. ....	31

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - A. Indivíduo adulto de <i>Physalaemus gracilis</i> ; B. Desova em meio natural; C. Desova coletada para desenvolvimento em laboratório; D. Larvas utilizadas nos testes. Fonte: A. (BORGES-MARTINS, 2007); B, C, e D. O autor. ....	18
Figura 2 - Visão geral do açude onde foram coletadas desovas de <i>Physalaemus gracilis</i> , (Anura: Leptodactylidae), na Universidade Federal da Fronteira Sul, Erechim, RS. 18 de fevereiro de 2016. Fonte: O autor. ....	19
Figura 3 - Teste agudo de <i>Physalaemus gracilis</i> expostos aos agrotóxicos cipermetrina e deltametrina. Fonte: O autor. ....	20
Figura 4 - Teste crônico de <i>Physalaemus gracilis</i> expostos aos agrotóxicos cipermetrina e deltametrina. Fonte: O autor. ....	21
Figura 5 - Concentração Letal em 96 horas de exposição à cipermetrina e deltametrina para larvas de <i>Physalaemus gracilis</i> . Concentração letal, Intervalo de confiança (-95% +95%). Fonte: O autor. ....	23
Figura 6 – Mortalidade total (número de indivíduos) de <i>Physalaemus gracilis</i> em teste agudo expostos a diferentes concentrações de cipermetrina. Mediana, Intervalo de 25% - 75%, Valores não discrepantes. Fonte: O autor.....	25
Figura 7 – Mortalidade total (número de indivíduos) de <i>Physalaemus gracilis</i> em teste agudo expostos a diferentes concentrações de deltametrina. Mediana, Intervalo de 25% - 75%, Valores não discrepantes. Fonte: O autor.....	25
Figura 8 - Mortalidade (número de indivíduos) de <i>Physalaemus gracilis</i> em relação ao tempo de exposição a cipermetrina e deltametrina. (a). Cipermetrina, (b). Deltametrina. Mediana, Intervalo de 25% - 75%, Valores não discrepantes. Fonte: O autor. ....	26
Figura 9 - Mortalidade (número de indivíduos) de <i>Physalaemus gracilis</i> em teste crônico expostos a diferentes concentrações de cipermetrina e deltametrina. (a). Cipermetrina, (b). Deltametrina. Mediana, Intervalo de 25% - 75%, Valores não discrepantes. Fonte: O autor. ....	27
Figura 10 - Mortalidade (número de indivíduos) de <i>Physalaemus gracilis</i> em relação ao tempo de exposição a cipermetrina e deltametrina. (a). Cipermetrina, (b). Deltametrina. Mediana, Intervalo de 25% - 75%, Valores não discrepantes. Fonte: O autor. ....	28

Figura 11 - Sobrevivência (número de indivíduos) de <i>Physalaemus gracilis</i> após sete dias de teste crônico a cipermetrina, deltametrina e controle. (a). Concentrações de cipermetrina; (b). Concentrações de deltametrina; (c). Controle. Fonte: O autor.....	29
Figura 12 - Atividade natatória das larvas de <i>Physalaemus gracilis</i> expostos a concentrações crônicas de cipermetrina e deltametrina por um período de 7 dias. Linha contínua para cipermetrina e linha pontilhada para deltametrina. Fonte: O autor.....	30
Figura 13 - Alterações na morfologia oral de <i>Physalaemus gracilis</i> em relação a exposição de cipermetrina, deltametrina e formol. (a). Cipermetrina, (b). Deltametrina, (c). Controle, (d). Formol. Mediana, Intervalo de 25% - 75%, Valores não discrepantes. Fonte: O autor.....	31
Figura 14 - Alterações na morfologia oral de <i>Physalaemus gracilis</i> . A. Indivíduo controle, sem alterações. B. Ausência de dentículos e ausência parcial de mandíbula inferior. C. Ausência de dentículos e ausência de mandíbula superior. D. Ausência de dentículos inferiores. E. Ausência de dentículos e ausência parcial da mandíbula superior. F. ausência de dentículos e de mandíbulas. Setas: Ausência de mandíbulas. Estrelas: Ausência de dentículos. Axio Scope.A1 – Zeiss. Aumento de 10x. Fonte: O autor.....	32

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
2.1.	OBJETIVO GERAL .....	16
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
<b>3</b>	<b>MATERIAL E METODOS</b> .....	<b>17</b>
3.1.	AGROTÓXICOS .....	17
3.2.	COLETA E MANUTENÇÃO DA ESPÉCIE TESTE .....	18
3.3.	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....	19
<b>3.3.1.</b>	<b>Teste agudo</b> .....	<b>19</b>
<b>3.3.2.</b>	<b>Teste crônico</b> .....	<b>20</b>
<b>3.3.3.</b>	<b>Atividade natatória</b> .....	<b>21</b>
<b>3.3.4.</b>	<b>Morfologia oral</b> .....	<b>22</b>
3.4.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	22
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>23</b>
4.1.	TESTE AGUDO .....	23
4.2.	TESTE CRÔNICO .....	26
4.3.	ATIVIDADE NATATÓRIA.....	29
4.4.	MORFOLOGIA ORAL.....	30
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>33</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>36</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>38</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A população mundial atual é de 7 bilhões de habitantes (UNFPA, 2016). Diante do crescimento populacional a estimativa é de 9 bilhões de pessoas até o ano de 2050, este cenário revela a necessidade de elevar a produção de alimentos (CONTE; BOFF, 2013). Neste sentido, a produção agrícola vem sofrendo drásticas mudanças, com a inserção de novas tecnologias, visando a produção extensiva de alimentos (MMA, 2015).

O avanço tecnológico tem influenciado diretamente na evolução do setor agrícola e tais melhorias estão atreladas a utilização de compostos quimicamente sintetizados, que podem acarretar em bioacumulação, persistência e toxicidade (OGA, 2003; DIAMOND et al., 2015). Os agrotóxicos vêm sendo amplamente utilizados na agricultura para o controle e combate de pragas, garantindo o suprimento de alimentos para uma população em crescimento (SANTOS; AREAS; REYES, 2007).

Um dos grupos de agrotóxicos mais utilizados na atualidade são os inseticidas piretróides (IBAMA, 2014). Seu uso está atrelado a alguns impactos ambientais, principalmente relacionados a toxicidade em espécies não alvo, como abelhas (BOVI, 2013; DEL SARTO et al., 2014), artrópodes aquáticos (GRISOLIA, 2005; GUTIÉRREZ, et al., 2016), peixes (VIRAN et al., 2003; MONTANHA; PIMPÃO, 2012), anfíbios (AYDIN-SINAN; GÜNGÖRDÜ; OZMEN, 2012; WRUBLEWSKI, 2016) e mamíferos (KANEKO, 2011).

Piretróides são inseticidas de origem vegetal, obtidos a partir de flores do gênero *Chrysanthemum*. Inseticidas deste grupo causam paralisia imediata, mortalidade e efeito de choque denominado *Knockdown* em insetos (SANTOS; AREAS; REYES, 2007). São amplamente empregados para o controle de insetos na agricultura, e na saúde pública, no controle da malária e da dengue (OSTI et al., 2007; SANTOS; AREAS; REYES, 2007; BRAGA; VALLE, 2007).

Os piretróides podem ser utilizados como modelo para o estudo da ecotoxicologia, pois contaminam o ar, a terra e a água provocando efeitos adversos (SANTOS; AREAS; REYES, 2007). São altamente tóxicos para organismos aquáticos e suas características, composição, mecanismo de ação, formulação, e aspectos toxicológicos já foram documentados (SANTOS; AREAS; REYES, 2007;

MONTANHA; PIMPÃO, 2012).

Cipermetrina e Deltametrina são piretróides sintéticos (ANVISA, 2015). A cipermetrina é utilizada em culturas de arroz, batata, café, citrus, feijão, fumo, mandioca, milho, soja e tomate (FISPQ, 2011; ANVISA, 2015). Também é utilizada para controle de ectoparasitas, insetos e tratamento de madeiras (VELISEK et al., 2006). A deltametrina é indicada para controle de baratas, moscas, mosquitos, traças, cupins e brocas de madeira, podendo ser aplicada na desinsetização (FISPQ, 2003). Também está presente na maioria dos shampoos e produtos para combater piolhos, pulgas e carrapatos (FISPQ, 2003). O valor médio permitido de cipermetrina em água para consumo humano é de 300 µg/L, o valor médio para deltametrina não foi encontrado (BRASIL, 2014).

Para avaliar os efeitos diretos e indiretos dos inseticidas sobre as espécies, se faz necessário a utilização de testes ecotoxicológicos (MASSARO, 2006). A ecotoxicologia é o ramo da toxicologia que estuda os efeitos tóxicos de substâncias naturais ou sintéticas aos componentes bióticos do ecossistema bem como suas consequências (COELHO, 2006; MASSARO, 2006).

Os testes de toxicidade aquática podem ser definidos em dois grupos: testes de toxicidade aguda e teste de toxicidade crônica (BERNARDI et al., 2008). A exposição aguda tem como função avaliar os efeitos mais severos a um curto período de exposição do composto sobre os indivíduos. Os testes crônicos permitem avaliar os efeitos letais, assim como os subletais, dos compostos sobre as espécies. Estes últimos ocorrem por um período mais prolongado e consideram o efeito dos inseticidas em concentrações mais realistas (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008; MOUTINHO, 2013).

Nos testes toxicológicos os organismos são expostos a várias concentrações do composto, por determinado período de tempo (ARAGÃO; ARAÚJO, 2006). No sistema estático a solução não é renovada durante o teste (JARDIM, 2004). Isto permite verificar os efeitos do composto sobre parâmetros biológicos do organismo, como mortalidade, crescimento, reprodução, desenvolvimento e comportamento (ARAGÃO; ARAÚJO, 2006).

Uma das características mais importantes para testes de toxicidade é a seleção da espécie indicadora (MASSARO, 2006). Os anfíbios são excelentes espécies modelos para testes toxicológicos, pois são suscetíveis a contaminação por produtos químicos devido à permeabilidade da pele e em função da

dependência da maioria das espécies do ambiente aquático para reprodução e desenvolvimento larval (BUGGREN; WARBURTON, 2007; SILVA et al., 2013). Além disso, apresentam fases de desenvolvimento distintas: fase de ovos, larval e adulta, cada uma em substratos diferentes (WELLS, 2007).

Estudos sobre a toxicidade dos piretróides em anfíbios mostram potencial neurotóxico e genotóxico, o que ressalta a importância do entendimento dos efeitos destes compostos para a preservação das espécies e dos ecossistemas onde estão inseridas (PELTZER et al., 2011; LAJMANOVICH et al., 2014). A concentração letal de cipermetrina para *Rana temporaria* foi 6,5 µg/L (PAULOV, 1990). Para *Hypsiboas pulchellus* a CL<sub>50</sub> foi 175,2 µg/L (AGOSTINI, NATALE, RONCO, 2010). Em embriões de *Xenopus laevis* foi 30,6 µg/L e 6,9 µg/L para larvas (YU et al., 2013). A CL<sub>50</sub> de cipermetrina para embriões e larvas de *Rhinella arenarum* para 96, 168 e 240 horas de exposição, obteve 11,20; 6,44; 3, 50 mg/L e 6,43; 2,74 e 1,82 mg/L para embriões e larvas, respectivamente (SVARTZ; ARONZON; COLL, 2015). Para *Physalaemus gracilis* a CL<sub>50 96h</sub> de cipermetrina foi 1,4 mg/L (WRUBLEWSKI, 2016).

A concentração letal de deltametrina para *Bufo arenarum* foi 0,004 mg/L (SALIBIÁN, 1992). E para larvas de *Xenopus laevis*, a CL<sub>50 168h</sub> foi de 0,006 mg/L (AYDIN-SINAN, 2012). Mais dados de CL<sub>50</sub> para anfíbios expostos a deltametrina não foram encontrados, mas outros trabalhos testaram a toxicidade do agrotóxico em peixes (PIMPÃO, 2006; RATHNAMMA; KUMAR; PHILIP, 2007; GALEB, 2010; ALMEIDA; CÔNSOLI, 2013; HEDAYATI et al., 2013).

Ao mesmo tempo em que o Brasil tem grande diversidade de anfíbios, com 1026 espécies conhecidas (SEGALLA et al., 2014) é considerado o maior consumidor de agrotóxicos do mundo (MMA, 2015). Os anfíbios estão presentes em diversos ecossistemas aquáticos com potencial de contaminação por agrotóxicos. Além disso, estão entre os vertebrados que mais sofrem por atividades humanas, com 41% das espécies conhecidas em declínio populacional e um terço ameaçadas de extinção (KOUBA et al., 2013). Mesmo nesta condição, ainda são escassos os trabalhos com toxicologia de anfíbios realizados no Brasil (LEITE et al., 2010; ZOCHE et al., 2013; ARAÚJO et al., 2014; SANTANA et al., 2015). Como consequência, pouco sabemos como esses produtos afetam a fauna silvestre, principalmente quando associados aos ambientes aquáticos.

A espécie *Physalaemus gracilis* (rã-chorona) possui comprimento rostro-cloacal entre 26,0 e 32,0 mm, habita áreas abertas e durante o período reprodutivo é

encontrada em corpos de água permanentes (ACHAVAL; OLMOS, 2003). Tem ocorrência no sul do Brasil, Uruguai e Argentina. Nos meses de setembro a março as fêmeas entram em processo reprodutivo, onde depositam de 400 a 800 ovos, sobre a lâmina d'água, em ninhos de espuma (BORGES-MARTINS et al., 2007; CAMARGO, SARROCA, MANEYRO, 2008). A espécie não consta em listas de espécies ameaçadas, tendo em vista sua ampla distribuição e sua tolerância a uma ampla gama de habitats (IUCN, 2010).

Embora não existam testes ecotoxicológicos com *Physalaemus gracilis*, estudos com espécies congêneras, como *P. biligonigerus*, *P. santafecinus*, *P. offersi* e *P. cuvieri*, já foram realizados (IZAGUIRRE et al., 2000; JIQUIRIÇÁ, 2010; JUNGES et al., 2012; SILVA et al., 2013; COSTA, NOMURA, 2016; WRUBLEWSKI, 2016).

Neste estudo, foi utilizada *Physalaemus gracilis* (Leptodactylidae), para avaliar os possíveis efeitos toxicológicos devido a exposição a dois inseticidas do grupo dos piretróides, especificamente Cipermetrina e Deltametrina.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos letais e subletais de cipermetrina e deltametrina em larvas de *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae).

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Estimar a sensibilidade das larvas de *P. gracilis* aos inseticidas a base de cipermetrina e deltametrina.
- II. Determinar a  $CL_{50\ 96h}$  de cipermetrina e deltametrina para larvas de *P. gracilis*.
- III. Determinar a concentração de efeito não observado (CENO), concentração de efeito observado (CEO) e o valor crônico (VC) para a mortalidade das larvas de *P. gracilis* expostos a cipermetrina e deltametrina.
- IV. Avaliar a atividade natatória dos indivíduos e a morfologia oral.
- V. Comparar a taxa de danos encontrada entre os agrotóxicos testados.
- VI. Discutir as implicações biológicas e ecológicas relacionadas ao impacto de inseticidas piretróides no ambiente de *P. gracilis*.

### 3 MATERIAL E METODOS

#### 3.1. AGROTÓXICOS

Foram utilizados dois agrotóxicos comerciais do grupo dos inseticidas piretróides, derivados sintéticos das piretrinas (Tabela 1).

Tabela 1 - Agrotóxicos utilizados no estudo, ingredientes e tipo de formulação.

Nome Técnico	Nome comercial	Ingrediente Ativo (g/L)	Ingrediente Inerte (g/L)	Tipo de Formulação
Cipermetrina	Cipertrin®	250	723	Concentrado Emulsionável
Deltametrina	Decis®	25	886	Concentrado Emulsionável

Fonte: O autor.

Cipertrin®250 g/L, é um inseticida formulado por Prentiss Química LTDA, registrado no Ministério da Agricultura, da Pecuária e Abastecimento – MAPA sob nº 06195. Sua composição é (RS)-alpha-cyano-3-phenoxybenzyl (1RS,3RS;1RS;3RS)-3-(2,2dichlorovinyl)-2,2dimethylcyclopropanecarboxylate 25 % m/v e ingredientes inertes 72,3% m/v. É considerado inseticida de contato e classificado como Concentrado Emulsionável (EC). Quanto a toxicologia possui classe I - extremamente tóxico e altamente perigoso ao meio ambiente, classe I de acordo com o potencial de periculosidade ambiental. Possui pH 5,12 a 20 °C, faixa de ebulição 135 a 145°C, ponto de fulgor em 18°C, densidade entre 0,95 - 0,96 g/cm<sup>3</sup> a 20°C, é emulsificável em água e em outros solventes como, acetona, clorofórmio, ciclohexanona, xileno, maior que 450 g/L, em etanol 337 g/L e em hexano 103 g/L (FISPQ, 2011).

Decis® 25 g/L (EC) é formulado por Bayer S/A, registrado no MAPA sob nº 00758498. Sua composição é (S)-α-ciano-3-phenoxybenzyl (1R,3R)-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate 2,5% m/v e outros ingredientes 88,6% m/v. Considerado inseticida de contato e ingestão classe III, medianamente tóxico e altamente perigoso ao meio ambiente, classe I. Possui pH 4,0 – 5,0 (5% em água), faixa de ebulição 135 – 145°C, ponto de fulgor 48 °C densidade 890 – 910

Kg/m<sup>3</sup>, emulsificável em água, Log Pow = 5,43. Altamente bioconcentrável em peixes (FISPQ, 2003).

### 3.2. COLETA E MANUTENÇÃO DA ESPÉCIE TESTE

A espécie teste foi o anfíbio anuro nativo *Physalaemus gracilis* (Boulenger, 1883) (Figura 1). A coleta de desovas totais foi realizada em meio natural, com menos de 24 horas de oviposição. As coletas ocorreram no período de Novembro de 2015 a Fevereiro de 2016, em um açude localizado na Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Erechim, (latitude: -27.728681°; longitude: -52.285852°) (Figura 2).



Figura 1 - A. Indivíduo adulto de *Physalaemus gracilis*; B. Desova em meio natural; C. Desova coletada para desenvolvimento em laboratório; D. Larvas utilizadas nos testes. Fonte: A. (BORGES-MARTINS, 2007); B, C, e D. O autor.



Figura 2 - Visão geral do açude onde foram coletadas desovas de *Physalaemus gracilis*, (Anura: Leptodactylidae), na Universidade Federal da Fronteira Sul, Erechim, RS. 18 de fevereiro de 2016. Fonte: O autor.

As desovas foram transportadas até o laboratório de ecologia e conservação da UFFS, onde foram aclimatadas em aquários de 10 litros com água desclorada, com aeração artificial, pH entre 7,5 e 8,5, condutividade entre 175 e 250  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , oxigênio dissolvido entre 3 e 6 mg/L e a temperatura da água em  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Durante o período de desenvolvimento os indivíduos foram alimentados diariamente com alimento básico, vegetal, em flocos, recomendado como complemento alimentar para espécies onívoras, com 45% de proteína bruta. Os indivíduos não utilizados nos experimentos foram devolvidos ao local de coleta. O projeto teve licença do Ibama para coleta, nº. 51285-1 e autorização do comitê de ética no uso de animais (CEUA) da Universidade Federal da Fronteira Sul.

### 3.3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

#### 3.3.1. Teste agudo

O teste de toxicidade aguda foi realizado com indivíduos no estágio 24- 25, de acordo com a tabela de Gosner (1960). Foram utilizadas larvas com comprimento em média de 9,322mm (máx. 11,761mm; mín. 7,712mm, desvio padrão 1,436mm, n=10) e massa de 0,083g (máx. 0,107g; mín. 0,050g, desvio padrão 0,019g, n=10). O teste teve duração de 96 horas e foi monitorado a cada 24 horas para verificação da mortalidade. Os indivíduos mortos foram retirados. As larvas foram colocadas em frascos de vidro estéreis contendo 500 mL de solução dos inseticidas nas

concentrações testadas, com densidade de 1 larva para cada 100 mL. Foram utilizadas 5 larvas por frasco, em sextuplicada, totalizando 30 larvas expostas em cada concentração. O mesmo foi realizado com o controle negativo, com água proveniente de poço artesiano, dentro dos padrões de potabilidade, sem cloro (Figura 3). O teste foi estático, sem alimentação.

Para a formulação comercial de cipermetrina foram testadas as concentrações: 0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0 mg/L. Para a formulação comercial de deltametrina foram testadas as concentrações: 0,01; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7 e 1,0mg/L. Durante os testes o pH da água ficou entre 7,5 e 8,5, a condutividade entre 175 e 250  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , o nível de oxigênio dissolvido entre 3 e 6 mg/L e a temperatura da água em  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .



Figura 3 - Teste agudo de *Physalaemus gracilis* expostos aos agrotóxicos cipermetrina e deltametrina. Fonte: O autor.

### 3.3.2. Teste crônico

Para o teste crônico, onde foram avaliados os efeitos subletais, utilizou-se concentrações nas proporções de 1/50; 1/75, 1/100, 1/200, 1/300 e 1/500 da  $CL_{50\ 96h}$  de cada um dos inseticidas testados. Foram utilizadas larvas no estágio 24-25, de acordo com a tabela de Gosner (1960). Os indivíduos apresentaram comprimento médio de 10,616mm (máx. 12,071mm; mín. 8,192mm, desvio padrão 2,723mm,  $n=10$ ) e massa 0,098g (máx. 0,104g; mín. 0,053g, desvio padrão 0,018g,  $n=10$ ). Os

indivíduos foram submetidos a este teste por um período de 7 dias, sendo monitorados a cada 24 horas para verificação da mortalidade. A alimentação foi mantida diariamente, com um cálculo de 15% da massa média dos indivíduos e posteriormente foram multiplicados pela quantidade de indivíduos no teste. Os aquários foram aerados artificialmente (Figura 4).

O delineamento experimental seguiu os mesmos padrões do teste agudo, os aquários foram embaralhados, as larvas foram colocadas em frascos de vidro estéreis contendo 500 mL de solução de inseticidas nas concentrações testadas, com densidade de 1 larva para cada 100 mL. Foram utilizadas 5 larvas por frasco, em sextuplicada, totalizando 30 larvas expostas em cada concentração. O mesmo foi realizado com o controle negativo, água proveniente de poço artesiano, dentro dos padrões de potabilidade. Durante o experimento manteve-se os mesmos padrões físico químicos da água do teste agudo.

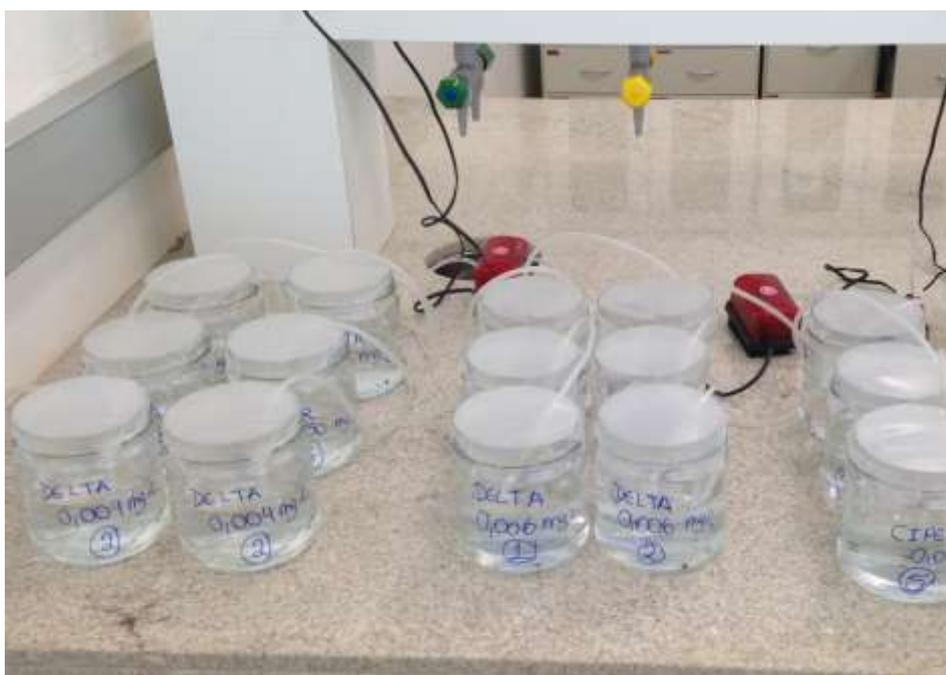


Figura 4 - Teste crônico de *Physalaemus gracilis* expostos aos agrotóxicos cipermetrina e deltametrina. Fonte: O autor.

### 3.3.3. Atividade natatória

Para avaliar a atividade natatória das larvas foram realizadas inspeções a cada 24 horas nos aquários. A avaliação ocorreu nas concentrações de 1/50, 1/75 e 1/100 da  $CL_{50\ 96h}$  de ambos agrotóxicos. Com auxílio de um bastão de vidro realizou-

se um movimento circular no aquário por três vezes. Essa movimentação foi curta para estimular a movimentação das larvas no aquário, sem causar stress. Como forma de comparação, o padrão de atividade natatória foi estabelecido em quatro endpoints, numerados de 0 a 3. (3) – para movimentos natatórios iguais ao controle, ou seja, sem alterações na natação da larva, quando comparado ao controle; (2) – para movimentos natatórios diferentes do controle, em círculos ou movimento menor que o controle; (1) – movimentos natatórios somente com estímulo de toque em alguma parte do corpo e (0) - considerado estático, mas vivo.

### **3.3.4. Morfologia oral**

A análise na morfologia oral ocorreu com as concentrações de 1/200, 1/300 e 1/500 de ambos agrotóxicos, no teste crônico. Para comparação foi feito um controle positivo com 0,07 mg/L de formol. Ao final do período do teste crônico os indivíduos foram retirados e analisados com auxílio de estereomicroscópio, sendo fotografados individualmente com microscópio Axio Scope.A1 Zeiss, AxioCam ERc 5s e software Zen 2012. A primeira análise foi realizada de forma cega, e as alterações foram observadas e registradas sem conhecimento a qual solução o indivíduo foi exposto. Depois, os resultados dos expostos aos agrotóxicos foram comparados com o controle e indivíduos expostos ao formol. O controle positivo em formol possibilitou a fixação das partes bucais, e permitiu uma avaliação detalhada da morfologia oral.

## **3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados obtidos nos ensaios de toxicidade aguda foram analisados pelo método Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton et al., 1977). A Concentração de Efeito Não Observado (CENO) e a Concentração de Efeito Observado (CEO) foram determinadas para o efeito de mortalidade. Também foi determinado o Valor Crônico (VC). A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro Wilks e a homogeneidade das variâncias foi testada por Bartlett. Para teste de hipóteses utilizou-se ANOVA seguida do teste de Dunnett's para comparar as médias de cada tratamento com o controle. Foi utilizado nível de confiança de 95% e o software Statsoft Estatística 8.

## 4 RESULTADOS

### 4.1. TESTE AGUDO

Dentre as formulações comerciais de agrotóxicos testadas, a composição contendo deltametrina foi a mais tóxica para as larvas de *P. gracilis*. A  $CL_{50\ 96h}$  do teste agudo (Figura 5), foi de 5,4 mg/L para cipermetrina e 0,46 mg/L para deltametrina.

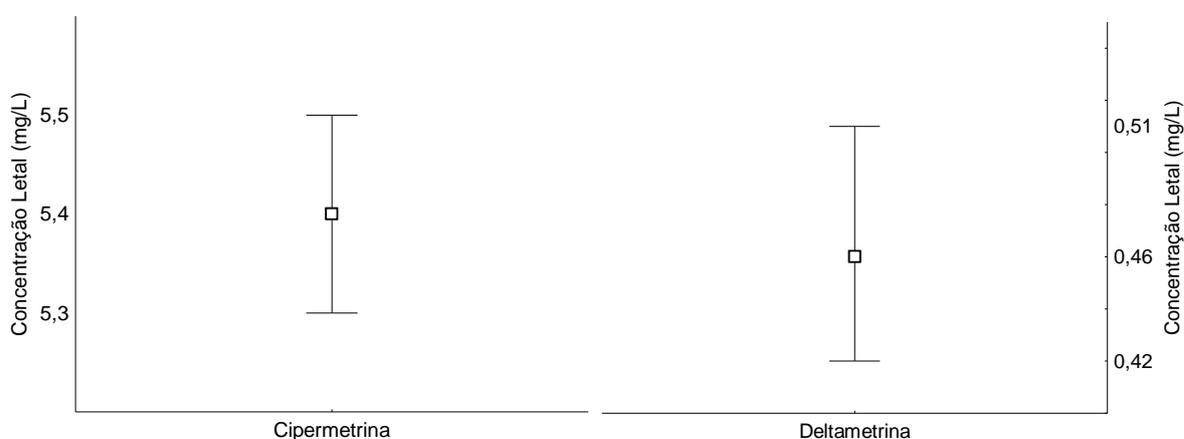


Figura 5 - Concentração Letal em 96 horas de exposição à cipermetrina e deltametrina para larvas de *Physalaemus gracilis*. Concentração letal, Intervalo de confiança (-95% +95%). Fonte: O autor.

A exposição aguda a cipermetrina apresentou mortalidade total de 35%, 105 indivíduos (Tabela 2). Nas primeiras 24 horas ocorreu 25,6% (77) da mortalidade. As concentrações de 6 e 7 mg/L representaram 76,5% da mortalidade nas primeiras horas de exposição. Após 96 horas de exposição, concentrações como, 0,1 mg/L e 1 mg/L, apresentaram elevada mortalidade, 9,5% (10) e 16,2% (17) dos indivíduos (Figura 6).

No teste com deltametrina, a mortalidade nas primeiras 24 horas atingiu 32% (96). As concentrações de 0,6; 0,7 e 1 mg/L representaram 89,5% da mortalidade nas primeiras horas de exposição. Houve influência significativa das concentrações de cipermetrina ( $F_{(10, 55)}=28,928$ ,  $p<0,001$ ) e deltametrina, ( $F_{(10, 55)}=38,633$ ,  $p<0,001$ ) na mortalidade. Quanto maior a concentração de agrotóxico maior é a taxa de mortalidade (Figura 7).

Tabela 2 - Mortalidade de larvas (número de indivíduos) de *Physalaemus gracilis* em teste agudo em função do tempo de exposição aos agrotóxicos cipermetrina e deltametrina.

Agrotóxico	Concentração (mg/L)	Mortalidade					CL <sub>50</sub> (mg/L)
		24 h	48 h	72 h	96 h	Total	
Cipermetrina	0,1	1	3	6	0	10	5,4 -95%: 5,3 +95%: 5,5
	0,5	0	1	0	1	2	
	1	5	4	4	4	17	
	1,5	2	0	0	1	3	
	2	0	0	1	0	1	
	3	3	0	3	0	6	
	4	2	0	0	0	2	
	5	5	0	0	0	5	
	6	29	0	0	0	29	
7	30	0	0	0	30		
Mortalidade Total		77	8	14	6	105	
Deltametrina	0,01	0	1	0	0	1	0,46 -95%: 0,42 +95%: 0,51
	0,05	0	0	0	1	1	
	0,1	1	0	0	0	1	
	0,2	0	0	0	9	9	
	0,3	3	0	0	0	3	
	0,4	0	0	0	3	3	
	0,5	6	0	0	0	6	
	0,6	26	0	0	1	27	
	0,7	30	0	0	0	30	
	1	30	0	0	0	30	
Mortalidade Total		96	1	0	14	111	

Fonte: O autor.

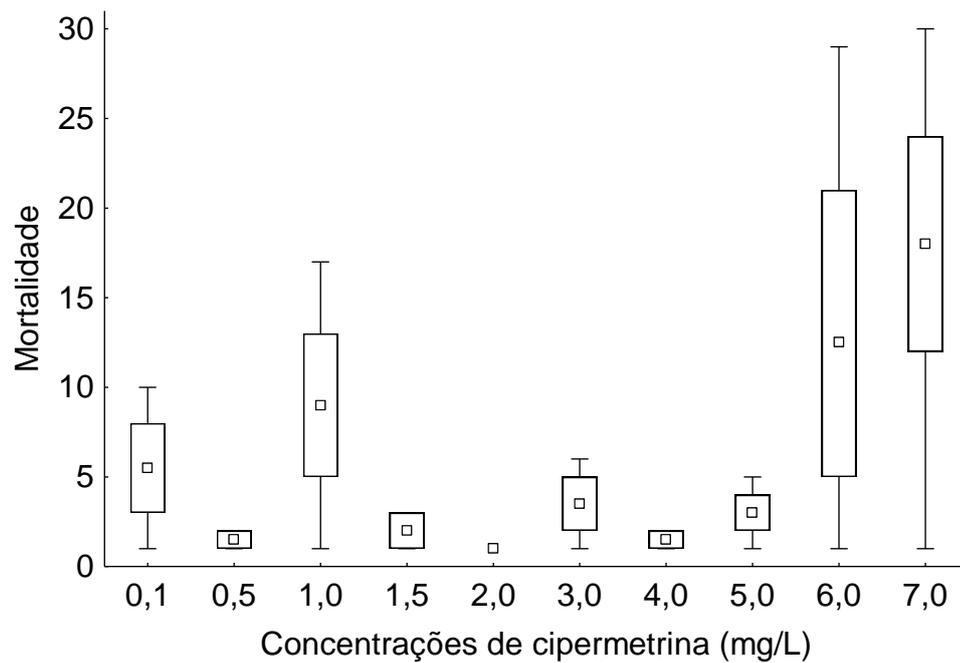


Figura 6 – Mortalidade total (número de indivíduos) de *Physalaemus gracilis* em teste agudo expostos a diferentes concentrações de cipermetrina. Mediana, Intervalo de 25% - 75%, Valores não discrepantes. Fonte: O autor.

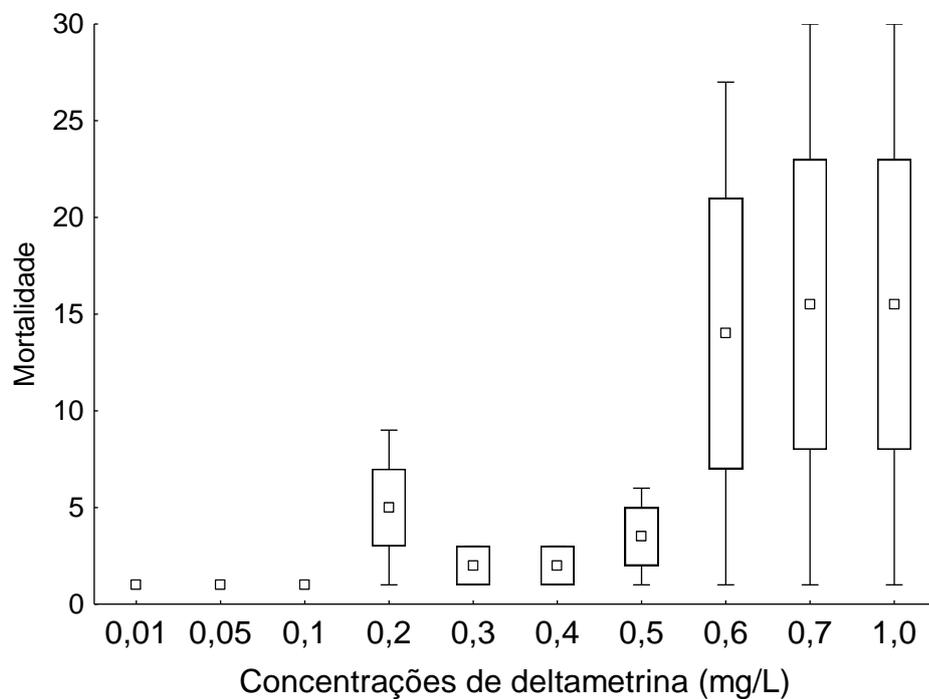


Figura 7 – Mortalidade total (número de indivíduos) de *Physalaemus gracilis* em teste agudo expostos a diferentes concentrações de deltametrina. Mediana, Intervalo de 25% - 75%, Valores não discrepantes. Fonte: O autor.

A mortalidade foi maior nas primeiras 24 horas de teste, tanto para cipermetrina ( $F_{(3, 40)}=3,362$ ,  $p=,027$ ) como para deltametrina ( $F_{(3, 40)}=4,594$ ,  $p=,007$ ) (Figura 8).

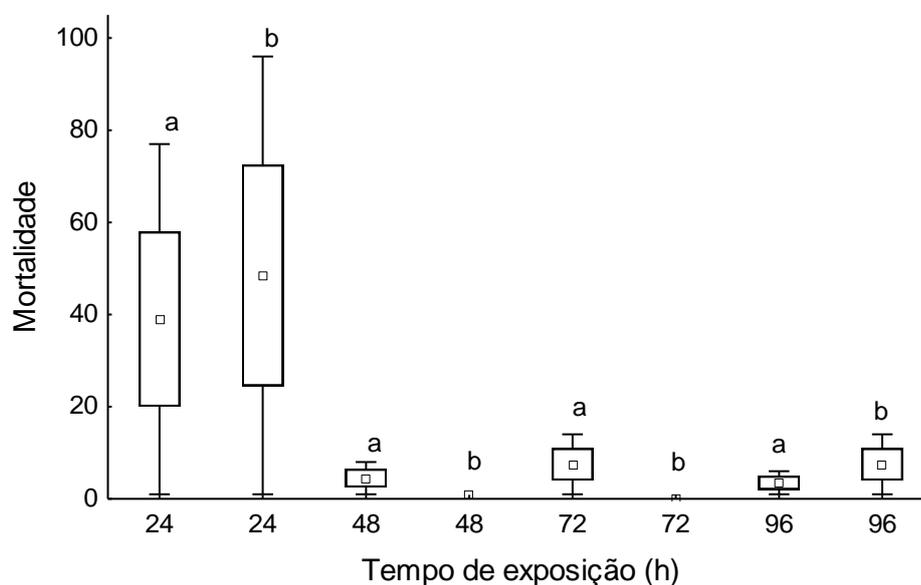


Figura 8 - Mortalidade (número de indivíduos) de *Physalaemus gracilis* em relação ao tempo de exposição a cipermetrina e deltametrina. (a). Cipermetrina, (b). Deltametrina. Mediana, Intervalo de 25% - 75%, Valores não discrepantes. Fonte: O autor.

#### 4.2. TESTE CRÔNICO

Nos testes crônicos foram avaliados os efeitos subletais e definidas concentrações em 1/50; 1/75, 1/100, 1/200, 1/300 e 1/500 da  $CL_{50\ 96h}$ . Ou seja, 0,1, 0,07, 0,05, 0,03, 0,02 e 0,01 mg/L de cipermetrina e 0,009, 0,006, 0,004, 0,003, 0,0015 e 0,001 mg/L de deltametrina, respectivamente.

Mesmo expostos a concentrações crônicas as larvas de *Physalaemus gracilis* apresentaram sensibilidade elevada aos agrotóxicos testados. Para cipermetrina a mortalidade ocorreu logo em 48 horas de exposição, nas concentrações de 0,1 e 0,07 mg/L (Tabela 3). Em concentrações mais baixas a mortalidade iniciou em 72 horas. Para deltametrina, nas concentrações de 0,009 e 0,004 mg/L as larvas morreram nas primeiras 24 horas, na concentração de 0,006 mg/L em 48 horas, as outras concentrações apresentaram mortalidade a partir de 72 horas. No controle ocorreram 3 mortes, uma em 72 horas e outras duas em 96 horas. O teste crônico apresentou taxa de mortalidade de 82,2% (148) para cipermetrina e 76,1% (137) para as concentrações de deltametrina.

Tabela 3 - Mortalidade (número de indivíduos) de larvas de *Physalaemus gracilis* em teste crônico ao longo do tempo de exposição aos agrotóxicos cipermetrina e deltametrina.

Agrotóxico	Concentração (mg/L) e Proporção	Mortalidade (horas)							Mortalidade total
		24	48	72	96	120	144	168	
Cipermetrina	0,1 – 1/50 CL <sub>50</sub>	0	5	3	7	11	1	0	27
	0,07 – 1/75 CL <sub>50</sub>	0	5	3	6	8	3	4	28
	0,05 – 1/100 CL <sub>50</sub>	0	0	2	6	10	3	2	23
	0,03 – 1/200 CL <sub>50</sub>	0	0	2	7	8	2	4	23
	0,02 – 1/300 CL <sub>50</sub>	0	0	7	6	0	4	5	22
	0,01 – 1/500 CL <sub>50</sub>	0	0	3	9	6	4	3	25
Deltametrina	0,009 – 1/50 CL <sub>50</sub>	2	3	1	5	7	2	3	23
	0,006 – 1/75 CL <sub>50</sub>	0	2	2	2	5	7	6	24
	0,004 – 1/100 CL <sub>50</sub>	1	0	2	2	1	7	6	19
	0,003 – 1/200 CL <sub>50</sub>	0	0	5	9	8	2	0	24
	0,0015 – 1/300 CL <sub>50</sub>	0	0	2	10	9	2	2	25
	0,001 – 1/500 CL <sub>50</sub>	0	0	4	4	5	6	3	22
Controle	0	0	0	1	2	0	0	0	3

Fonte: O autor.

A mortalidade aumentou conforme a elevação das concentrações, ambos os agrotóxicos foram significativos para este efeito, ( $F_{(6, 35)}=10,679$ ,  $p<0,001$ ) para cipermetrina e ( $F_{(6, 35)}=5,898$ ,  $p<0,001$ ) para deltametrina, (Figura 9).

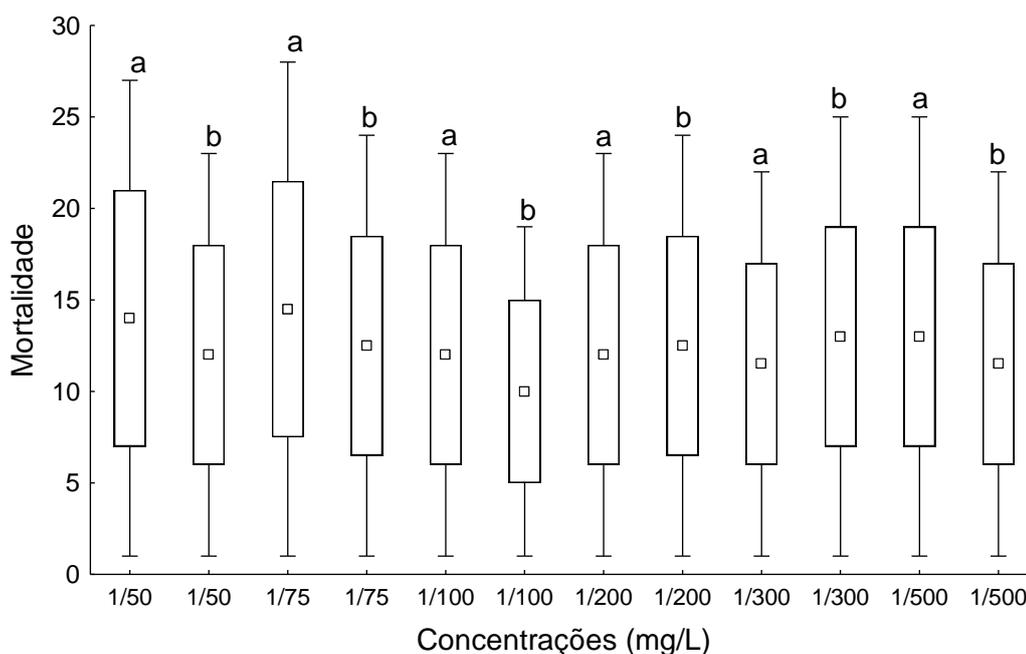


Figura 9 - Mortalidade (número de indivíduos) de *Physalaemus gracilis* em teste crônico expostos a diferentes concentrações de cipermetrina e deltametrina. (a). Cipermetrina, (b). Deltametrina. Mediana, Intervalo de 25% - 75%, Valores não discrepantes. Fonte: O autor.

Houve influência significativa da mortalidade com relação ao tempo de exposição dos indivíduos (Figura 10). Ou seja, a mortalidade aumentou com o passar do tempo de exposição a cipermetrina ( $F_{(6, 42)}=7,085$ ,  $p<0,001$ ) e deltametrina ( $F_{(6, 42)}=4,425$ ,  $p<0,001$ ).

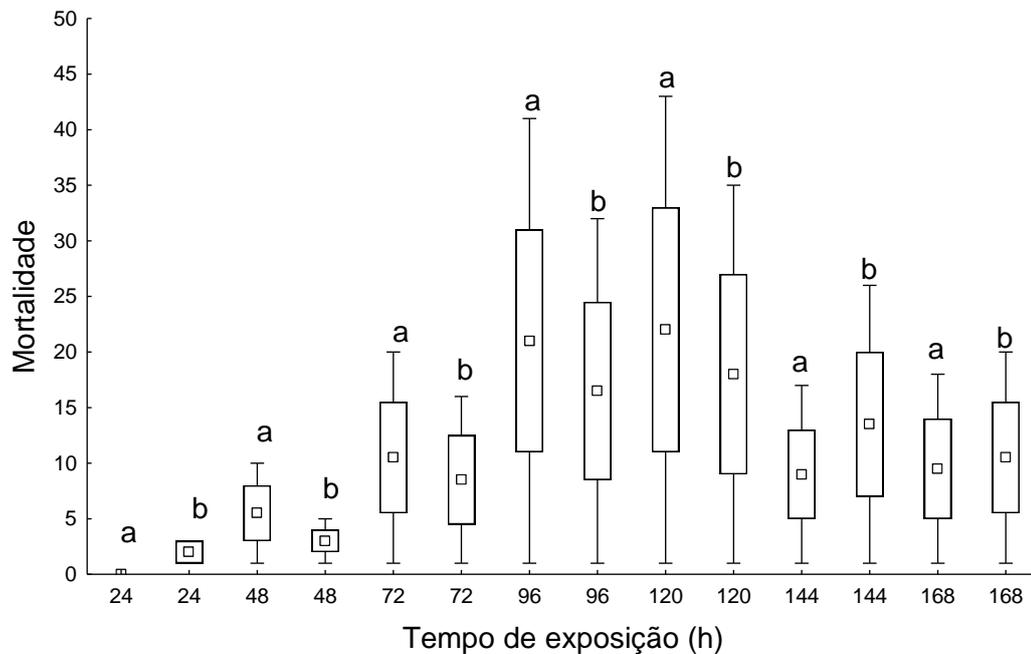


Figura 10 - Mortalidade (número de indivíduos) de *Physalaemus gracilis* em relação ao tempo de exposição a cipermetrina e deltametrina. (a). Cipermetrina, (b). Deltametrina. Mediana, Intervalo de 25% - 75%, Valores não discrepantes. Fonte: O autor.

O valor de CENO para cipermetrina foi 0,02 e de CEO foi 0,01 mg/L. Assim, o valor crônico para *Physalaemus gracilis* expostos a cipermetrina é VC = 0,015 mg/L. O valor de CENO para deltametrina foi 0,004 e CEO foi 0,003 mg/L. O valor para a mortalidade crônica de *Physalaemus gracilis* expostos a deltametrina é VC = 0,0035 mg/L.

A taxa de sobrevivência (Figura 11) durante o teste crônico foi maior em deltametrina, 23,8% (43) do que para cipermetrina 17,7% (32). A taxa de sobrevivência no controle foi de 90%.

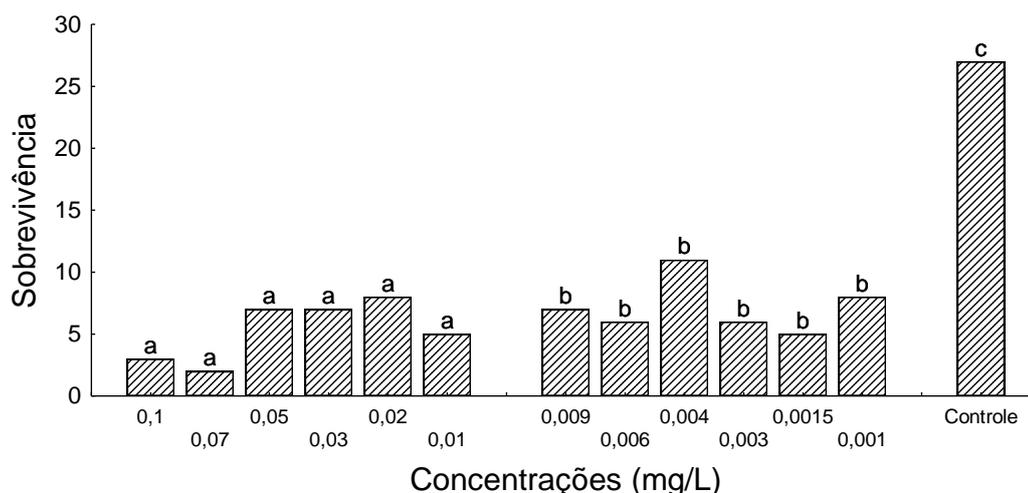


Figura 11 - Sobrevivência (número de indivíduos) de *Physalaemus gracilis* após sete dias de teste crônico a cipermetrina, deltametrina e controle. (a). Concentrações de cipermetrina; (b). Concentrações de deltametrina; (c). Controle. Fonte: O autor.

#### 4.3. ATIVIDADE NATATÓRIA

A exposição das larvas a concentrações subletais dos agrotóxicos afetou a atividade natatória dos indivíduos (Tabela 4). O comportamento natatório no controle manteve-se no padrão 3 até o final dos testes. Porém, na presença dos agrotóxicos a atividade natatória foi comprometida já nas primeiras 24 horas. Os indivíduos apresentaram o mesmo comportamento até as 72 horas do experimento, entretanto após 96 horas algumas concentrações de cipermetrina mostraram-se capazes de imobilizar os indivíduos.

Tabela 4 - Atividade natatória de larvas de *Physalaemus gracilis* expostos a cipermetrina e deltametrina. Endpoints: (3) – movimentos natatórios iguais ao controle, ou seja, sem alterações na natação da larva, quando comparado ao controle; (2) – movimentos natatórios diferentes do controle, em círculos ou movimento menor que o controle; (1) – movimentos natatórios somente com estímulo de toque em alguma parte do corpo e (0) - considerado estático, mas vivo.

Agrotóxicos	Concentração (mg/L) e proporção	Atividade Natatória							Mobilidade final
		24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h	
Cipermetrina	0,1 – 1/50	2	1	1	0	0	0	0	0
	0,07 – 1/75	2	1	1	0	0	0	0	0
	0,05 – 1/100	2	1	1	1	1	1	1	1
Deltametrina	0,009 – 1/50	2	1	1	1	1	1	1	1
	0,006 – 1/75	2	1	1	1	1	1	1	1
	0,004 – 1/100	2	1	1	1	1	1	1	1

Fonte: O autor.

Nas primeiras 24 horas as larvas apresentaram atividade natatória diferente e menor que o controle para todas as concentrações de ambos agrotóxicos (Figura 12). Com 48 horas os indivíduos não se movimentavam com a agitação da água no aquário, sendo necessários estímulos para a natação. Para deltametrina esse comportamento manteve-se até o fim do teste, bem como para a concentração de 0,05 mg/L de cipermetrina. Porém, para as concentrações de 0,1 e 0,07 mg/L os indivíduos não correspondiam aos estímulos, ficando estáticos, mas vivos até o sétimo dia.

As concentrações dos agrotóxicos influenciaram a atividade natatória das larvas em relação ao controle, para cipermetrina ( $F_{(3, 24)}=26,862$ ,  $p<0,001$ ). O mesmo ocorreu com deltametrina ( $F_{(3, 24)}=56,333$ ,  $p<0,001$ ). Quanto maior a concentração dos agrotóxicos menor a atividade natatória.

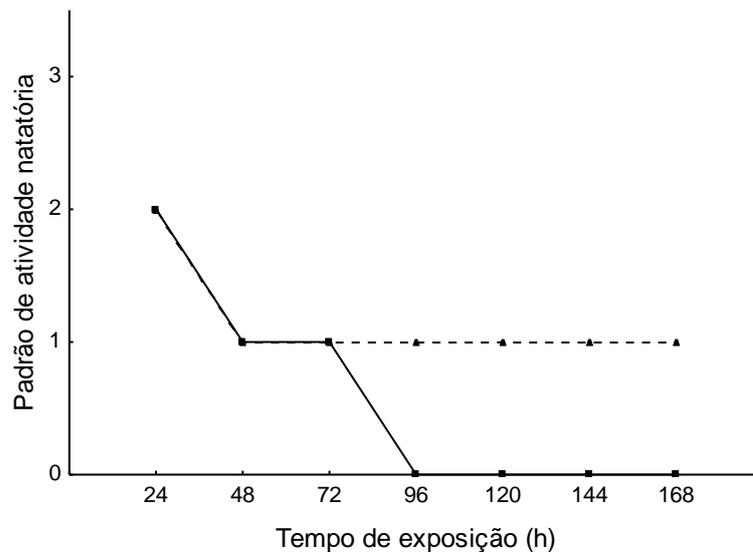


Figura 12 - Atividade natatória das larvas de *Physalaemus gracilis* expostos a concentrações crônicas de cipermetrina e deltametrina por um período de 7 dias. Linha contínua para cipermetrina e linha pontilhada para deltametrina. Fonte: O autor.

#### 4.4. MORFOLOGIA ORAL

Foram analisados 79 indivíduos para avaliação da morfologia oral (indivíduos que sobreviveram ao teste crônico). Destes, 38 (48,1%) apresentaram alterações (Tabela 5).

Tabela 5 - Alterações na morfologia oral de larvas de *Physalaemus gracilis* expostos a cipermetrina, deltametrina, e formol.

Grupo	Concentração (mg/L) e Proporção	Indivíduos analisados	Mandíbula			Dentículos			Indivíduos alterados
			Sup	Inf	S. e l.	Sup	Inf	S. e l.	
Deltametrina	0,03 - 1/200	6	1	1	3	0	1	5	6
	0,0015 - 1/300	5	1	1	0	0	1	1	2
	0,001 - 1/500	8	1	3	1	0	3	2	6
Cipermetrina	0,03 - 1/200	7	2	1	0	1	0	2	4
	0,02 - 1/300	8	2	2	0	1	6	0	6
	0,01 - 1/500	5	3	1	0	1	2	2	5
Formol	0,07	13	2	0	2	2	3	2	7
Controle		27	0	0	0	0	2	0	2

Fonte: O autor.

A ocorrência de alterações na morfologia oral foi significativa em relação ao controle ( $F_{(7, 71)}=8,047$ ,  $p<0,001$ ) (Figura 13). Apresentaram alterações, 14 indivíduos expostos a deltametrina, 15 expostos a cipermetrina, 7 ao formol e 2 indivíduos do controle. Para cipermetrina, no tratamento 1, foi 10,5%, no tratamento 2, 15,8% e no tratamento 3, 13%. Para deltametrina, no tratamento 1 foi 15,8%, no tratamento 2, foi 5,3% e no tratamento 3, 15,8%. Para o formol foi 18,5% e para o controle 5,3%.

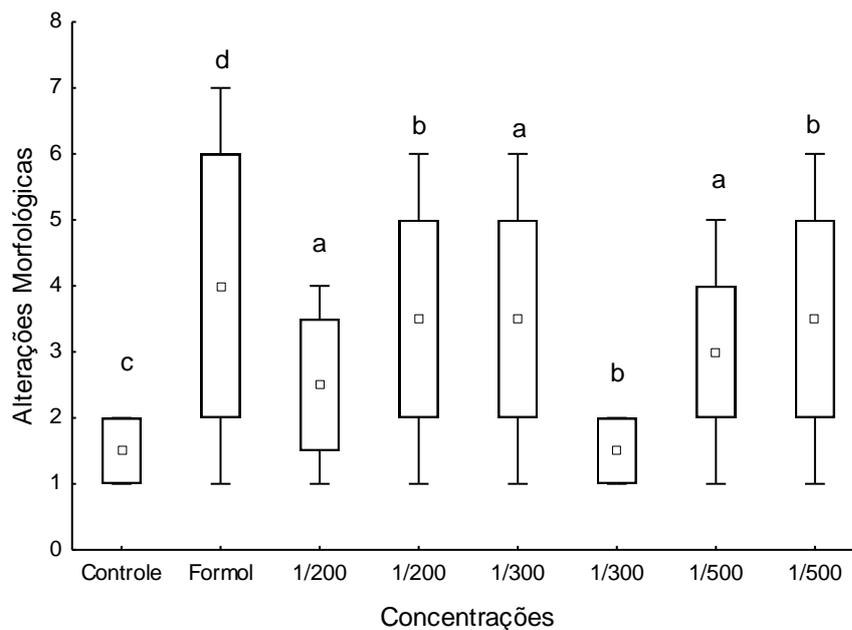


Figura 13 - Alterações na morfologia oral de *Physalaemus gracilis* em relação a exposição de cipermetrina, deltametrina e formol. (a). Cipermetrina, (b). Deltametrina, (c). Controle, (d). Formol. Mediana, Intervalo de 25% - 75%, Valores não discrepantes. Fonte: O autor.

As anormalidades identificadas foram: alteração na mandíbula superior, (n=12; 18,8%), alteração na mandíbula inferior, (n=9; 14,1%), alteração na mandíbula superior e inferior (n=6; 9,4%). Alteração na linha de dentículos superior, (n=5; 7,8%), alteração na linha de dentículos inferior (n=18; 28,1%), alteração na linha de dentículos superior e inferior (n=14; 21,8%).

As alterações com maior ocorrência foram a perda parcial ou total das linhas de dentículos inferiores, seguida pela perda total ou parcial dos dentículos (Figura 14). As alterações ligadas aos dentículos representaram 57,7% dos casos, ante 42,3% dos casos envolvendo perda parcial ou total da mandíbula.

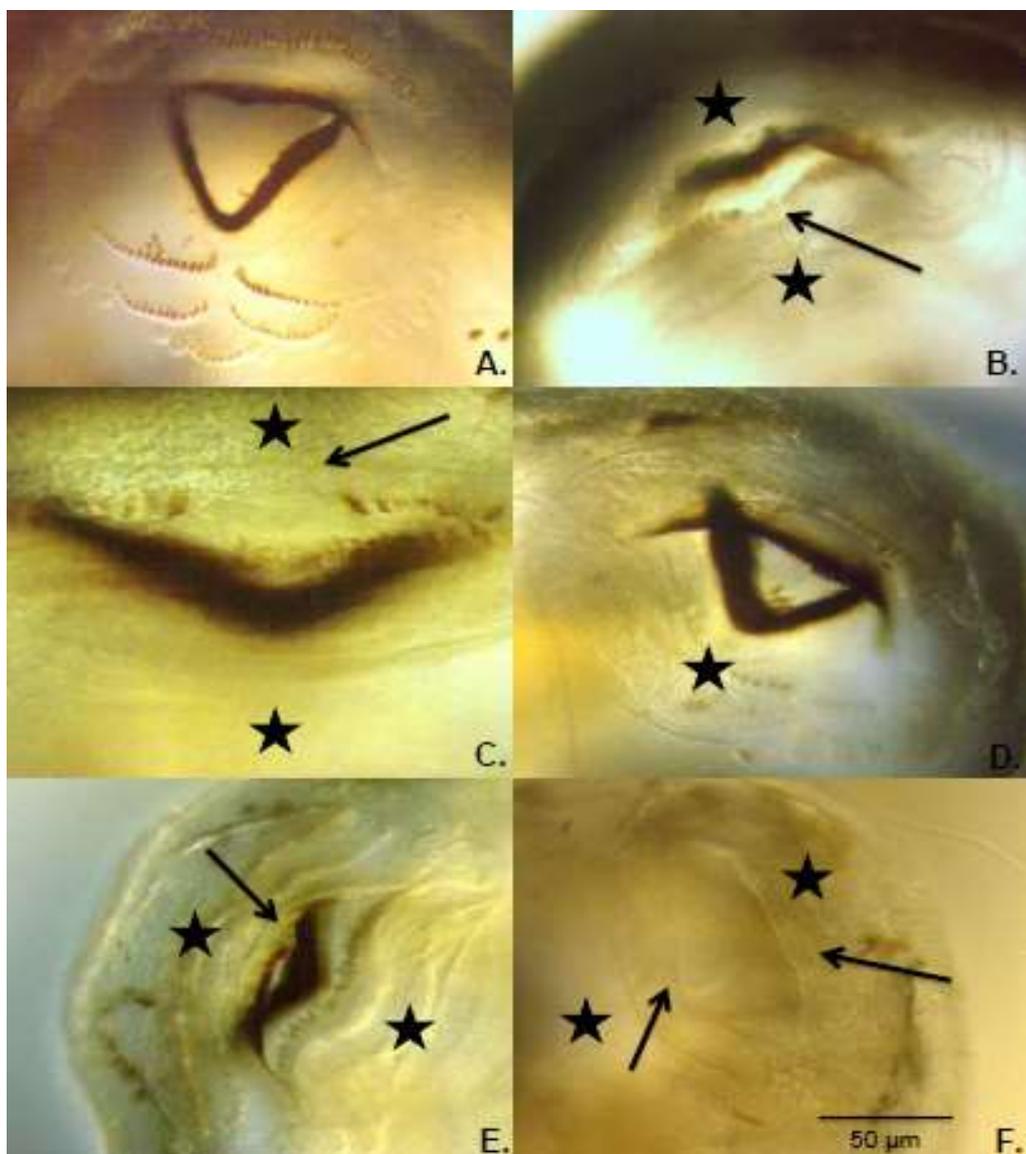


Figura 14 - Alterações na morfologia oral de *Physalaemus gracilis*. A. Indivíduo controle, sem alterações. B. Ausência de dentículos e ausência parcial de mandíbula inferior. C. Ausência de dentículos e ausência de mandíbula superior. D. Ausência de dentículos inferiores. E. Ausência de dentículos e ausência parcial da mandíbula superior. F. ausência de dentículos e de mandíbulas. Setas: Ausência de mandíbulas. Estrelas: Ausência de dentículos. Axio Scope.A1 – Zeiss. Aumento de 10x. Fonte: O autor.

## 5 DISCUSSÃO

Este estudo avaliou os efeitos toxicológicos dos inseticidas piretróides, com princípio ativo deltametrina e cipermetrina, na toxicidade aguda e crônica, na atividade natatória e na morfologia oral de larvas de *Physalaemus gracilis*, popular rã-chorona. Em termos de toxicidade aguda, o agrotóxico com princípio ativo deltametrina, mostrou-se mais tóxico para a espécie comparado ao princípio ativo cipermetrina. De acordo com a classificação do Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS, 2011), a deltametrina possui alta toxicidade,  $CL_{50\ 96h} = 0,46$  mg/L e a cipermetrina média toxicidade,  $CL_{50\ 96h} = 5,4$  mg/L.

Comparada a outras espécies de anfíbios, *Physalaemus gracilis* foi mais resistente a deltametrina. Larvas de *Bufo arenarum* entre os estágios 28-30 obtiveram uma  $CL_{50}$  de deltametrina igual a 0,004mg/L, a  $CL_{50\ 168h}$  para larvas de *Xenopus laevis*, foi de 0,006 mg/L (SALIBIÁN, 1992; AYDIN-SINAN; GÜNGÖRDÜ; OZMEN, 2012). Ainda, a espécie mostrou-se resistente em comparação a outros grupos, como exemplo, a  $CL_{50}$  para microcrustáceos como a *Daphnia sp.* estimada em 0,003 mg/L (ALMEIDA, CÔNSOLI, 2013). Para o peixe tambaqui, *Colossoma macropomoma*  $CL_{50}$  foi de 0,057 mg/L (CUNHA, 2014). Para o pacu, *Piaractus mesopotamicus*, a  $CL_{50\ 48h}$  foi de 0,017 mg/L (ROSSI, 2013). Para *Labeo rohita*, *Danio rerio*, *Hyphessobrycon bifasciatus* e *Oreochromis niloticus* a  $CL_{50\ 96h}$  foi de 0,38 mg/L, 0,078 µg/L, 0,082 µg/L e 0,954 µg/L, respectivamente (ALMEIDA, CÔNSOLI, 2013; SUVETHA et al., 2015). Uma das poucas espécies com maior resistência a deltametrina foi *Poecilia reticulata* com  $CL_{50\ 48h}$  de 5,13 mg/L (VIRAN et al., 2003).

Ainda em relação à resistência da espécie *Physalaemus gracilis*, estudos com o princípio ativo cipermetrina foram relatados em maior número na classe dos anfíbios. Em testes realizados com *Physalaemus biligonigerus* a  $CL_{50}$  foi de 0,12 mg/L (IZAGUIRRE et al., 2000), para *Physalaemus cuvieri* a  $CL_{50}$  foi de 1,4 mg/L (WRUBLEWSKI, 2016), para *Rhinella arenarum* a  $CL_{50}$  foi de 0,11 mg/L (IZAGUIRRE et al., 2006), para *Duttaphrynus melanostictus*  $CL_{50}$  foi de 0,003 mg/L (DAVID et al., 2012) e para *Hypsiboas pulchellus* a  $CL_{50}$  foi de 0,175 mg/L (AGOSTINI; NATALE; RONCO, 2010). Em comparação a outras espécies de

anfíbios a espécie testada neste trabalho apresentou maior resistência, ou seja, a toxicidade para cipermetrina foi menor.

Além dos anfíbios, outras espécies aquáticas também foram testadas para cipermetrina. Dentre elas, o crustáceo *Hyaella curvispina* que está entre as espécies mais sensíveis a este inseticida apresentando  $CL_{50\ 24h}$  igual a  $0,07 \pm 0,03 \mu\text{g/L}$  (MUGNI et al., 2013). O peixe *Heteropneustes fossilis* apresentou  $CL_{50}$  de  $4,56 \mu\text{g/L}$  (PANDEY; MALVIYA; DAS, 2009), o peixe *Labeo rohita* apresentou  $CL_{50}$  de  $0,139 \text{ mg/L}$  (DAS; MUKHERJEE, 2002) e o jundiá, *Rhamdia quelen*, teve sua  $CL_{50}$  definida em  $1,71 \text{ mg/L}$  (MONTANHA et al., 2012). Todas essas espécies apresentaram maior sensibilidade a cipermetrina que as larvas de *P. gracilis*.

Essas comparações de sensibilidade são importantes para avaliação do risco dos agrotóxicos e seu poder de seletividade em espécies não-alvo (e.g. NAKAGOME et al., 2007). A menor sensibilidade de *Physalaemus gracilis* aos inseticidas em relação a outras espécies estudadas pode estar relacionada a resistência aos compostos químicos, já que é encontrada em ambientes alterados e em agroecossistemas (HARTMANN, M.T., dados não publicados). Essa resistência a concentrações de agrotóxicos seria esperada em uma espécie que consegue reproduzir em ambientes propícios a aplicação constante de agrotóxicos. No entanto, essa afirmação depende de estudos específicos sobre resistência, especialmente porque as pesquisas realizadas com as diferentes espécies utilizam compostos e metodologias distintas, o que dificulta a comparação.

Ainda que os efeitos da exposição aguda encontrada para esta espécie demonstre resistência aos inseticidas testados, a elevada mortalidade das larvas nas primeiras 24 horas de exposição, revelam a toxicidade dos inseticidas testados. A exposição crônica dos indivíduos a doses subletais dos agrotóxicos demonstrou a sensibilidade da espécie. As concentrações de efeito não observado e de efeito observado para a mortalidade dos indivíduos no teste crônico, bem como o valor crônico determinado foram menores que a  $CL_{50}$  de algumas espécies supracitadas. Geralmente, a determinação de CENO, CEO e VC, ocorrem em ensaios de toxicidade aquática envolvendo outras espécies como, algas, microcrustáceos, peixes e bactérias. Essa característica torna esse estudo pioneiro na utilização desta metodologia aplicado a mortalidade de anfíbios (CESAR; SILVA; SANTOS, 1997; RUBINGER, 2009).

Os indivíduos expostos a deltametrina apresentaram menor mortalidade e menor efeito sobre a atividade natatória quando comparada a cipermetrina no teste crônico. Neste sentido, a cipermetrina foi mais tóxica. A cipermetrina, assim como os piretróides em geral, são altamente tóxicos para peixes e invertebrados aquáticos (MONTANHA; PIMPÃO, 2012).

Uma das formas de intoxicação por piretróides ocorre na respiração, a água entra pela boca das larvas até atingir as brânquias internas, onde acontece a troca gasosa e depois a água é expelida pelo espiráculo (ALONSO, 2003). Portanto, as brânquias podem aumentar a absorção dos agrotóxicos, o que pode explicar a redução da sobrevivência das larvas de *Physalaemus gracilis* na exposição aguda e crônica. Os piretróides exercem um efeito significativo sobre os canais de sódio neural, interferindo na sua abertura e fechamento, prolongando o tempo de entrada dos íons  $\text{Na}^+$  para o interior da célula (SANTOS; AREAS; REYES, 2007; MONTANHA; PIMPÃO, 2012).

Para compensar os efeitos tóxicos de alguns componentes dos agrotóxicos com maior eficiência (GREULICH; PFLUGMACHER, 2003), anfíbios gastam energia tentando restabelecer o seu equilíbrio fisiológico. Este gasto de energia pode causar atrasos no crescimento, no desenvolvimento, na mobilidade e redução da aptidão fisiológica (GREULICH; PFLUGMACHER, 2003). Neste estudo a atividade natatória foi alterada na exposição crônica de ambos os inseticidas.

Outros exemplos, que revelam alteração de comportamento por exposição aos piretróides, ao nível de locomoção foram observados em *Danio rerio*, *Lepomis macrochirus*; *Channa punctatus* e *Oncorhynchus mykiss* (FIGUEIREDO, 2014).

As alterações na atividade natatória encontradas no presente estudo tem significado ecológico, pois as larvas tornam-se mais visíveis para os predadores, mais lentas, aumentando o risco de predação (PÉREZ IGLESIAS, 2015). Em ambiente natural, a mobilidade reduzida das larvas e a alteração na forma bucal podem significar menor capacidade de fuga e de alimentação, o que interfere na sobrevivência, pois se tornam mais suscetíveis a predação. A redução na estrutura física pode ocorrer devido a uma escassa nutrição, o que leva os mesmos à morte (AZEVEDO-RAMOS et al., 1992; PÉREZ IGLESIAS, 2015).

Em relação a morfologia oral a exposição a deltametrina e cipermetrina apresentaram resultados semelhantes. A ausência parcial ou total da mandíbula e a ausência parcial ou total de dentículos ocorreu na exposição a ambos agrotóxicos. A

ausência completa de linhas de dentes queratinizados e ausência parcial da primeira fileira superior também foi relatada em *Hypsiboas pulchellus* expostos a imazethapyr imidazolinonas (IMZT; formulação herbicida Pivot H<sup>®</sup>) (PÉREZ-IGLESIAS et al., 2015). Inseticidas como a cipermetrina e deltametrina têm sido associados a efeitos negativos sobre anuros através de perturbações hormonais, danos na cauda, deformidades na gônada, alterações aos traços da história de vida e mortalidade (HOWE et al., 2004; RELYEA, 2009). Esses inseticidas são capazes de reduzir o crescimento e as taxas de desenvolvimento dos anfíbios, o que está atrelado à redução na eficiência de forrageamento. As linhas de dentes queratinizados são estruturas complexas que atuam para agarrar e manipular os alimentos. A perda ou a má formação destas estruturas queratinosas afetam a capacidade do indivíduo em cortar os alimentos em tamanhos que podem passar através da pequena abertura da boca e/ou a raspar os alimentos grossos da superfície (DUELLMAN; TRUEB, 1994).

Desta maneira, larvas expostas a cipermetrina e deltametrina em seu ambiente natural, podem sofrer alterações em nível ecológico. As concentrações crônicas utilizadas neste estudo são muito baixas, o que leva a uma real preocupação com a sobrevivência das populações de anuros, principalmente de *P. gracilis*. As características dos agrotóxicos testados mostram sua permanência no ambiente e possibilidade de contato com espécies não-alvo, neste caso anfíbios. As formulações comerciais de deltametrina e cipermetrina foram tóxicas para *Physalaemus gracilis*, demonstrando que mesmo concentrações baixas podem afetar a mortalidade e/ou alterar característica da espécie.

## 6 CONCLUSÃO

As concentrações subletais apresentaram efeitos toxicológicos aos indivíduos e o tempo de exposição influenciou significativamente para este efeito. A cipermetrina expressou maior toxicidade no teste crônico tendo uma taxa de mortalidade maior que deltametrina. Foi possível observar que as concentrações subletais são capazes de afetar os organismos quanto a atividade natatória e morfologia oral.

A deltametrina afetou atividade natatória reduzindo a capacidade de resposta dos indivíduos a estímulos na água, por sua vez, a cipermetrina foi capaz de inibir a

atividade natatória a ponto de causar a imobilidade dos indivíduos. Além das alterações na atividade natatória, os agrotóxicos aqui testados provocaram alterações na morfologia oral das larvas de *Physalaemus gracilis*.

As alterações observadas são capazes de expor as larvas da espécie a adversidades biológicas, diminuindo a capacidade de fuga e de forrageamento, entre outros aspectos. Enfim, entende-se que os piretróides com princípio ativo de deltametrina e cipermetrina apresentam efeitos toxicológicos para espécies não alvo como larvas de *Physalaemus gracilis*, ainda de acordo com os resultados obtidos podemos relacionar a exposição a estes agrotóxicos como causa de mortalidade desta espécie.

## REFERÊNCIAS

- ACHAVAL, F.; OLMOS, A. **Anfibios y reptiles del Uruguay**. 2. ed. Montevideo: Graphis, 2003. 136 p..
- AGOSTINI, G. M.; NATALE, G. S.; RONCO, A. E. Lethal and sublethal effects of cypermethrin to *Hypsiboas pulchellus* tadpoles. **Ecotoxicology**, n. 19, p. 1545-1550, 2010.
- ALMEIDA, L. G.; CÔNSOLI, F. L. **Simbiontes de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae): potencial biotecnológico para biorremediação e implicações na metabolização de inseticidas pelo hospedeiro**. 2013. 105 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.
- ALONSO, D. G. **Desarrollo y diferenciación de las branquias externas e internas en embriones y larvas de *Bufo arenarum* : análisis descriptivo y experimental**. 2003. 178 f. Tese (Doctorado em Ciências Biológicas) - Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, 2003.
- ANVISA. **Agência Nacional de vigilância Sanitária**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Monografias+de+Agrotoxicos/Monografias>>. Acesso: janeiro de 2015.
- ARAGÃO, M. A.; ARAÚJO, R. P. A. **Métodos de Ensaio de Toxicidade com Organismos Aquáticos**. Cap. 6, p: 117–152. 2006. In: ZAGATO, P. A.; BERTOLETTI, E. Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações. ZAGATTO e BERTOLETTI (org.) São Carlos, Rima, 2006.
- ARAÚJO, C. V. M.; SHINN, C.; MOREIRA-SANTOS, M.; LOPES, I.; ESPÍNDOLA, E. L. G.; RIBEIRO, R. Copper-driven avoidance mortality in temperate and tropical tadpoles. **Aquatic Toxicology**, n. 146, p. 70-75, 2014.
- AYDIN-SINAN, H.; GÜNGÖRDÜ, A.; OZMEN, M. Toxic effects of deltamethrin and  $\lambda$ -cyhalothrin on *Xenopus laevis* tadpoles. **Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, n. 47, p. 397-402, 2012.
- AZEVEDO-RAMOS, C.; SLUYS, M. V.; HERO, I. M.; MAGNUSSON, W. Influence of tadpole movement on predation by odonate naiads. **Journal of Herpetology**, n. 26, p. 335-338, 1992.
- BERNARDI, M. M.; MORAES, R. C.; VAROLI, F. M. F.; OSTI, S. C. **Ecotoxicologia**. In: SPINOSA, H. S.; GÓMIK, S. L.; PALERMO-NETO, J. Toxicologia aplicada à medicina veterinária, São Paulo: Manole, 2008. p. 942.
- BORGES-MARTINS, M.; COLOMBO, P.; ZANK, C.; BECKER, F. G.; MELO, M. T. Q. In: BECKER, F. G.; RAMOS, R. A.; MOURA, L. A. (orgs.) **Biodiversidade: Regiões**

da Lagoa do Casamento e dos Butiazais de Tapes, Planície Costeira do Rio Grande do Sul. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, 2007. p. 385.

BOVI, T. S. **Toxicidade de inseticidas para abelhas *Apis mellifera* L.** 2013. 69 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, São Paulo, 2013.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismo de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, n. 4, p. 279-293, 2007.

BRASIL. **Portaria Nº 320 da Secretária de Estado da Saúde do Rio Grande do Sul.** Porto Alegre, 2014.

BUGGREN, W. W.; WARBURTON, S. Amphibians as animal models for laboratory research in physiology. **ILAR jornal**, n. 3, p. 260-9, 2007.

CAMARGO, A.; SARROCA, M.; MANEYRO, R. O esforço reprodutivo e o número de ovos vs. Tamanho trade-off em *Physalaemus* rãs (Anura: Leiuperidae). **Acta Oecologica**, n. 34, p. 163-171, 2008.

CESAR, A.; SILVA, S. L. R.; SANTOS, A. R. **Testes de Toxicidade Aquática no Controle da Poluição.** Universidade Santa Cecília – UNISANTA – Santos. São Paulo, 1997. 38 p.

COELHO, R. S. **Avaliação da toxicidade de fluidos de Usinagem através da ecotoxicologia aquática.** 2006. 156 f. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, 2006.

CONTE, I. I.; BOFF, L. A. As crises mundias e a produção de alimentos no Brasil. **Acta Scientiarum. Human and Social Sciences**, n.1, p. 49-59, 2013.

COSTA, R.; NOMURA, F. Measuring the impacts of Roundup Original® on fluctuating asymmetry and mortality in a Neotropical tadpole. **Hydrobiologia**, n. 1. p. 85-96, 2016.

CUNHA, F. S. **Efeitos tóxicos de inseticidas piretróides sobre o peixe tambaqui (*Colossoma macropomum*).** 2014. 54 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) - Universidade Tiradentes, Programa de Pós Graduação em Saúde e Ambiente, Aracajú, 2014.

DAS, B. K.; MUKHERJEE, S. C. Toxicity of cypermethrin in *Labeo rohita* fingerlings: biochemical, enzymatic and haematological consequences. **Comparative Biochemistry And Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology**. n. 1, p.109-121, 2003.

DAVID, M.; MARIGOUDAR, R. S.; PATIL, K. V.; HALAPPA, R. Behavioral, morphological deformities and biomarkers of oxidative damage as indicators of sublethal cypermethrin intoxication on the tadpoles of *D. melanostictus* (Schneider, 1799). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, n. 2, p. 127-134, 2012.

- DEL SARTO, M. C. L.; OLIVEIRA, E. E.; GUEDES, R. N. C.; CAMPOS, L. A. O. Differential insecticide susceptibility of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* and the honey bee *Apis mellifera*. **Apidologie**, n. 5, p. 626-636, 2014.
- DIAMOND, M. L.; DE WIT, C. A.; MOLANDER, S.; SCHERINGER, M.; BACKHAUS, T.; LOHMANN, R.; ARVISSON, R.; BERGMAN, T.; HAUSCHILD, M.; HOLOUBEK, I.; PERSSON, L.; SUZUKI, N.; VIGHI, M.; ZETZSCH, C. Exploring the planetary boundary for chemical pollution. **Environmet International**, v. 78, p. 8-15, 2015.
- DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. **Biology of amphibians**. The Johns Hopkins University Press. Baltimore and London, 1994. p. 677.
- FIGUEIREDO, A. C. P. **Piretróides: Uma nova geração de insecticidas**. 2014. 33 f. Monografia (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, 2014.
- FISPQ – **Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos. Decis 25 EC**. Bayer CropScience, 2003.
- FISPQ – **Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos. Cipertrin**. Prentiss Química LTDA, 2011.
- GALEB, L. A. G. **Avaliação dos efeitos toxicológicos da deltametrina em uma espécie de peixe fluvial nativo jundiá (*Rhamdia quelen*)**. 2010. 116 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Curitiba, 2010.
- GHS. **Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals**. Fourth Edition. United Nations, New York and Geneva, 2011. p. 561.
- GOSNER K. L. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. **Herpetologica**, n. 3, p. 183-189, 1960.
- GREULICH, K.; PFLUGMACHER, S. Differences in susceptibility of various life stages of amphibians to pesticide exposure. **Aquatic Toxicology**, n. 3, p. 329-336, 2003.
- GRISOLIA, C. K. **Agrotóxicos: mutações, câncer e reprodução**. Brasília, DF: Universidade de Brasília, 2005. p. 392.
- GUTIÉRREZ, Y.; SANTOS, H. P.; SERRÃO, J. E.; OLIVEIRA, E. E. Deltamethrin-Mediated Toxicity and Cytomorphological Changes in the Midgut and Nervous System of the Mayfly *Callibaetis radiates*. **Plos One**, v. 11, 2016.
- HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R. V. Trimmed Spearman- Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science Technology**, n. 7, p. 714-719, 1977.

HEDAYATI, A.; TARKHANI, R.; SHADI, A.; BAGHERI, T.; HARSIJ, M.; TAJARI, M. Median lethal concentration of two pesticides, diazinon and deltamethrin, on tra catfish *Pangasius hypophthalmus* (Siluroidei, Pangasiidae). **Toxicology and Industrial Health**, p. 1-6, 2013.

HOWE, C. M.; BERRIL, M.; PAULI, B. D.; HELBING, C. C.; WERRY, K.; VELDHOEN, N. Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species. **Environmental Toxicology and Chemistry**, n. 8, p. 1928–1938, 2004.

IBAMA. INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS RENOVÁVEIS. **Boletim Anual sobre Produção, Importação, Exportação e Vendas de Produtos Agrotóxicos no Brasil**, 2014. p. 42.

IUCN. **Lista Vermelha da IUCN de espécies ameaçadas**. Versão 2. 2010. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em: 24 de mar de 2016.

IZAGUIRRE, M. F.; LAJMANOVICH, R. C.; PELTZER, P. M.; SOLER, A. P.; CASCO, V. H. Cypermethrin-induced apoptosis in the telencephalon of *Physalaemus biligonigerus* tadpoles (Anura: Leptodactylidae). **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, n. 4, p. 501-7, 2000.

IZAGUIRRE, M. F.; MARÍN, L.; VERGARA, M. N.; LAJMANOVICH, R. C.; PELTZER, P. CASCO, V. H. Modelos experimentales de anuros para estudiar los efectos de piretroides. **Ciencia, Docencia y Tecnología**, n. 32, p. 181-206, 2006.

JARDIM, G. M. **Estudos ecotoxicológicos da água e do sedimento do Rio Corumbataí, SP**. 2004. 138 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Agroecossistemas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

JIQUIRIÇÁ, P. R. I. **Efeitos letais e subletais da poluição por nitrogênio em larvas de anuros**. 2010. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Ecologia) - Programa de Pós Graduação em Ecologia. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

JUNGES, C. M.; PELTZER, P. M.; LAJMANOVICH, R. C.; ATTADEMO, A. M.; CABAGNA ZENKLUSSEN, M. C.; BASSO, A. Toxicity of the fungicide trifloxystrobin on tadpoles and its effect on fish-tadpole interaction. **Chemosphere**, v. 87. p. 1348-1354, 2012.

KANEKO, H. Pyrethroids: mammalian metabolism and toxicity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 59. p. 2786-2791. 2011.

KOUBA, A. J.; LLOYD, R. E.; HOUCK, M. L.; SILLA, A. J.; CALATAYUD, N.; TRUDEAU, V. L.; CLULOW, J.; MOLINA, F.; LANGHORNE, C.; VANCE, C.; ARREGUI, L.; GERMANO, J.; LERMEN, D.; DELLA TOGNA, G. Emerging trends for bio banking amphibian genetic resources: The hope, reality and challenges for the next decade. **Biological Conservation**, v. 164, p. 10-21, 2013.

LAJMANOVICH, R. C.; CABAGNA-ZENKUSEN, M. C.; ATTADEMO, A. M.; JUNGESC. M.; PELTZER, P. M.; BASSÓ, A.; LORENZATTI, E. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in tadpoles of the common toad (*Rhinella arenarum*) treated with glifosinate –ammonium. **Mutation Research**, 2014.

LEITE, P. Z.; MARGARIDO, T. C. S.; LIMA, D.; ROSSA-FERES, D. C.; ALMEIDA, E. A. Esterase inhibition in tadpoles of *Scinax fuscovarius* (Anura, Hylidae) as a biomarker for exposure to organophosphate pesticides. **Environmental Science and Pollution Research International**, n. 8, p. 1411-1421, 2010.

MASSARO, F. C. **Estudos ecotoxicológicos com *Hydra viridissima* (Cnidaria: Hydrozoa)**. 2006. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, 2006.

MMA – MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Agrotóxicos**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/agrotoxicos>>. Acesso em: 11 nov. 2016.

MONTANHA, F. P.; PIMPÃO, C. T. Efeitos Toxicológicos de Piretróides (Cipermetrina e Deltametrina) em peixes – Revisão. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 18, p. 58, 2012.

MONTANHA, F. P.; GALEB, L. A. G.; MIKOS, J. D.; GANECO, L. N.; PEREIRA, T. P.; TANAKA, A.; KIRSCHNIK, P. G.; PIMPÃO, C. L. Pyrethroid toxicity in silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. n. 12, 2012.

MOUTINHO, M. F. **Ecotoxicidade comparativa de herbicidas da cana-de-açúcar para larvas de anfíbios**. 2013. 118 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Programa de Pós Graduação em Ecologia. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2013.

MUGNI, H.; PARACAMPO, A.; MARROCHI, N.; BONETTO, C. Acute toxicity of cypermethrin to the non target organism *Hyalella curvispina*. **Environmental Toxicology And Pharmacology**, v. 35, p. 88-92, 2013.

NAKAGOME, F. K.; NOLDIN, J. A.; RESGALLA, J. R. C. Toxicidade aguda de alguns herbicidas e inseticidas utilizados em lavouras de arroz irrigado sobre o peixe *Danio rerio*. **Pesticida: Revista de ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 17, p. 117-122, 2007.

OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. 2. ed. São Paulo. Editora: Atheneu, 2003. p. 677.

OSTI, S. C.; VAROLI, F. M. F.; MATUSHIMA, E. R.; BERNARDI, M. M. Comparative studies of deltamethrin acute toxicity in exotic and brasilian fish. **Journal of the Brazilian Society Ecotoxicology**, v. 2, p. 101-106, 2007.

PANDEY, R. K., MALVIYA, A.; DAS, V. K. Toxicity of cypermethrin, effects on serum electrolytes (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> and Pi) levels and recovery response in fresh water catfish

*Heteropneustes fossilis* Bloch. **International Journal Of Biological And Chemical Sciences**, v. 5, p. 1182-119, 2009.

PAULOV, S. Potential impact of pyrethroids (cypermethrin) on an experimental amphibian (*Rana temporaria* L.). **Biología (Bratislava)**, n. 2, p. 133-139, 1990.

PELTZER, P. M.; LAJMANOVICH, R. C.; SANCHEZ, L. C.; ATTADEMO, A.; JUNGES, C.; BIONDA, C. L.; MARTINO, A.; BASSÓ, A. Morphological abnormalities in amphibian populations from the mid-eastern region of Argentina. **Herpetological Conservation and Biology**, n. 3, p. 432-442, 2011.

PÉREZ IGLESIAS, J. M. **Biomarcadores de exposição e efeito para avaliação dos efeitos da atrazina a distintos níveis em girinos de anuros neotropicais**. 2015. 83 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – UNESP. São Paulo, 2015.

PÉREZ-IGLESIAS, J. M.; SOLONESKI, S.; NIKOLOFF, N.; NATALE, G. S.; LARRAMENDY, M. L. Toxic and genotoxic effects of the imazethapyr-based herbicide formulation Pivot H on montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 119, p. 15-24, 2015.

PIMPÃO, C. T. **Avaliação aguda dos efeitos toxicológicos da deltametrina em uma espécie de peixe fluvial nativo: estudo bioquímico e imunotóxico**. 2006. 116 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

RATHNAMMA, V. V.; KUMAR, M. V.; PHILIP, G. H. Effect of Deltamethrin on glycogen phosphorylase and glucose-6-phosphatase activity in freshwater fish *Labeo rohita*. **Bulletin of Pure & Applied Sciences-Zoology**, v. 26, 2007.

RELYEA, R. A. A cocktail of contaminants: how pesticide mixtures at low concentrations affect aquatic communities. **Oecologia**, v. 159, p. 363-376, 2009.

ROSSI, P. A. **Alterações bioquímico-fisiológicas em pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887) exposto a um inseticida à base de deltametrina**. 2013. 91 f. Dissertação (Mestrado em Genética Evolutiva e Biologia Molecular) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Paulo. São Carlos, 2013.

RUBINGER, C. F. **Seleção de métodos biológicos para a avaliação toxicológica de efluentes industriais**. 2009. 89 f. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) - Programa de Pós Graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos. Universidade Federal de Minas Gerais, 2009.

SALIBIÁN, A. Effects of Deltamethrin on the South American Toad, *Bufo arenarum*, Tadpoles. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, n. 48, p. 616-621, 1992.

- SANTANA, J. M.; REIS, A.; TEIXEIRA, P. C.; FERREIRA, F. C.; FERREIRA, C. M. Median lethal concentration of formaldehyde and its genotoxic potential in bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*). **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, p. 1-5, 2015.
- SANTOS, M. A. T.; AREAS, M. A.; REYES, F. G. R. Piretróides – Uma visão geral. **Alimentos e Nutrição**, n. 3, p. 339-349, 2007.
- SEGALLA, M. V.; CARAMASCHI, U.; CRUZ, C. A. G.; GARCIA, P. C. A.; GRANT, T.; HADDAD, C. F. B; LANGONE, J. **Brazilian amphibians – List of species**. Sociedade Brasileira de Herpetologia. 2014. Disponível em: <<http://www.sbherpetologia.org.br>>. Acesso em 08 de jun de 2015.
- SILVA, H. S. V. P.; SANTOS, C. L.; FERREIRA PEREIRA, S. R.; LUVIZOTTO SANTOS, R.; VASCONCELOS DE ANDRADE, G.; NUNES, G. S. Toxicidade aguda e genotoxicidade do agrotóxico comercial folisuper 600BR a girinos de *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leiuperidae). **Pesticidas: Revista de ecotoxicologia e meio ambiente**, v. 23, p. 1-10, 2013.
- SUVETHA, L.; SARAVANAN, M.; HUR, J. H.; RAMESH, M.; KRISHNAPRIYA, K. Acute and sublethal intoxication of deltamethrin in an Indian major carp, *Labeo rohita*: Hormonal and enzymological responses. **The Journal Of Basic & Applied Zoology**, v. 72, p. 58-65, 2015.
- SVARTZ, G.; ARONZON, C.; COLL, C. P. Comparative sensitivity among early life stages of the South American toad to cypermethrin-based pesticide. **Environmental Science and Pollution Research International**, n. 3. p. 2096-13, 2015.
- UNFPA. Fundo de População das Nações Unidas. **Situação da população mundial 2016**. Disponível em: <<http://unfpa.org.br/novo/index.php/situacao-da-populacao-mundial>>. Acesso em: 11 nov. 2016
- VELISEK, J.; WLASOW, T.; GOMULKA, P.; SVOBODOVA, Z.; DOBSIKOVA, R.; NOVOTNY, L.; DUDZIK, M. Effects of cypermethrin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Veterinari Medicina**, v. 51, p. 469-476, 2006.
- VIRAN, R.; UNLU, E. F.; POLAT, H.; KOÇAK, O. Investigation of acute toxicity of deltamethrin on guppies (*Poecilia reticulata*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, n. 1, p. 82-85, 2003.
- WELLS, K. D. **The ecology and behavior of amphibians**. Chicago. The University of Chicago Press, 2007. p. 1400.
- WRUBLEWSKI, J. **Toxicidade aguda e crônica de agrotóxicos em girinos de Physalaemus cuvieri (Anura, Leptodactylidae)**. 2016. 50 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental. Universidade Federal da Fronteira Sul. Erechim. Rio Grande do Sul, 2016.

YU, S.; WAGES, M. R.; CAI, Q.; MAUL, J. D.; COBB, G. P. Lethal and sublethal effects of three insecticides on two developmental stages of *Xenopus laevis* and comparison with other amphibians. **Environmental Toxicology and Chemistry**, n. 9, p. 2056-2064, 2013.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Alterações**. 2. ed. São Carlos, 2008. p. 486.

ZOCHE, J. J.; DAMIANI, A. P.; HAINZENREDER, G.; MENDONÇA, R. Á.; PERES, P. B.; SANTOS, C. E. I.; DEBASTIANI, R.; DIAS, J. F.; ANDRADE, V. M. Assessment of heavy metal content and DNA damage in *Hypsiboas faber* (anuran amphibian) in coal open-casting mine. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, n. 36, p. 194-201, 2013.