



UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL

CAMPUS ERECHIM

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL

JÉSSICA SAMARA HEREK

GLIFOSATO E SEUS EFEITOS SOBRE DUAS ESPÉCIES DE ANFÍBIOS NATIVOS
DA AMÉRICA DO SUL *Physalaemus cuvieri* e *Physalaemus gracilis*.

ERECHIM

2017

JÉSSICA SAMARA HEREK

GLIFOSATO E SEUS EFEITOS SOBRE DUAS ESPÉCIES DE ANFÍBIOS NATIVOS
DA AMÉRICA DO SUL *Physalaemus cuvieri* e *Physalaemus gracilis*.

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

Orientadores:

Prof. Dr (a). Marília Teresinha Hartmann.

Prof. Dr. Paulo Afonso Hartmann.

ERECHIM

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL

CAMPUS ERECHIM

ERS 135 – Km 72, nº 200

CEP: 99700-970

Caixa Postal 764

Erechim - RS

Brasil

JÉSSICA SAMARA HEREK

**GLIFOSATO E SEUS EFEITOS SOBRE DUAS ESPÉCIES DE ANFÍBIOS NATIVOS
DA AMÉRICA DO SUL *Physalaemus cuvieri* e *Physalaemus gracilis*.**

Dissertação de mestrado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Erechim, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental. Orientadores: Prof^a Dra. Marília Teresinha Hartmann e Prof. Dr. Paulo Afonso Hartmann.

Defendido e aprovado pela banca examinadora em _____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dra. Marília Teresinha Hartmann
Orientadora
Universidade Federal Fronteira Sul - UFFS

Prof. Dr. Paulo Afonso Hartmann
Orientador
Universidade Federal Fronteira Sul - UFFS

Prof. Dr. André Luís de Sá Salomão
Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ

Prof Dr. Elaine Lucas Gonsales
Universidade Federal de Santa Maria - UFSM

ERECHIM/RS, DEZEMBRO DE 2017.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que nos momentos difíceis desta caminhada, carregou-me no colo, dando-me forças para continuar...

Agradeço imensamente às pessoas que conseguiram entender minhas ausências e as noites em claro, buscando fazer melhor aquilo a que me propus. Ao meu noivo Welker dos Santos, obrigada pela compreensão, apoio, incentivo e ajuda em todas as etapas deste Mestrado, aos meus pais José Herek e Clenir Herek pelo apoio, porto seguro e carinho, a minha irmã Gisele Herek e cunhado Cassiano Pazzi pelos conselhos pela amizade e pela motivação sempre! Sem vocês eu não teria conseguido chegar até aqui.

Agradeço aos meus orientadores Prof^a Dr^a Marília Hartmann e Prof Dr. Paulo Hartmann pelos conselhos, pela força e principalmente pela confiança em abrir as portas do laboratório e me permitir fazer parte da liderança de uma equipe no Laboratório. Experiência que me trouxe muito conhecimento e possibilitou-me crescer em muitas áreas da minha vida profissional e pessoal!

Agradeço a equipe e amigos do Laboratório de Ecologia e Conservação. Camila Rutkoski, Guilherme Vanzetto, Jéssica Slaviero Luana Vargas e Nadie Mikolaiczik, Natani Macagnan e Suelen Trindade. Pela colaboração independente do dia e hora, estavam sempre prontos para ajudar incansavelmente!

Agradeço às técnicas dos laboratórios que se tornaram amigas, pelos conselhos, palavras de motivação e principalmente pelo empenho em me ajudar sempre que precisei. Aos professores do Mestrado e Graduação Dra. Helen Treichel, Dr. Rodrigo Fornel e Dra. Rosilene Perin que se fizeram presentes de alguma forma nos momentos de laboratório ou escrita desta dissertação.

Agradeço aos meus amigos e colegas, a turma do PPGCTA 2016, enfim todos os que torceram para que tudo desse certo, e que compreenderam minha ausência nestes últimos dois anos.

RESUMO

A expansão agrícola e o consumo de agrotóxicos em especial do herbicida Glifosato têm aumentado em valores alarmantes no Brasil e mundo. Em relação a isso surge uma grande preocupação sobre como animais não alvo são afetados por esses químicos. Dentre os vertebrados que mais tem sido ameaçados pelos agrotóxicos, estão os anfíbios, que devido a sua fisiologia e hábitos de vida são suscetíveis a contaminação aquática, e vêm enfrentando declínio no número de espécies nas últimas décadas. O presente estudo avaliou os efeitos agudos e crônicos (tóxicos e genotóxicos) de uma formulação comercial de Glifosato sobre girinos de duas espécies de anfíbios anuros nativos da América do Sul *Physalaemus cuvieri* e *Physalaemus gracilis*. Os girinos foram submetidos a concentrações ambientalmente relevantes e permitidas pela legislação brasileira. A partir de análises morfológicas constatou-se que o Glifosato causou alterações morfológicas principalmente na boca, intestino, cauda e membros, além de problemas no desenvolvimento dos girinos, como girinos menores e com atrasos de metamorfose. No ensaio de genotoxicidade, ocorreu alteração na frequência de aparecimento ou formação de Micronúcleos e outras anormalidades nucleares eritrocíticas (ENAs) significativas em relação ao controle, indicando danos genotóxicos. Este estudo mostrou que concentrações ambientalmente relevantes de Glifosato (65, 144, 280, 500, 700 e 1000µg/L) em períodos curtos de tempo foram capazes de causar anormalidades morfológicas e eritrocitárias em girinos das duas espécies estudadas.

Palavras Chave: Anfíbios nativos, Alterações morfológicas, Herbicida, Toxicidade em girinos, Genotoxicidade em grinos.

ABSTRAT

Agricultural expansion and consumption of agrochemicals in particular of the herbicide Glyphosate have increased in alarming values in Brazil and worldwide. In relation to this arises a great concern about how non-target animals are affected by these chemicals. Among the vertebrates that have been most threatened by agrochemicals are amphibians, which due to their physiology and life habits are susceptible to aquatic contamination, and have been facing decline in the number of species in the last decades. The present study evaluated the acute and chronic effects (toxic and genotoxic) of a commercial formulation of Glyphosate on two species of tadpole of native anuran amphibians from South America *Physalaemus cuvieri* and *Physalaemus gracilis*. The tadpoles were submitted to concentrations that are environmentally relevant and allowed by Brazilian legislation. From morphological analyzes it was verified that Glyphosate caused morphological changes mainly in the mouth, intestine, tail, limbs, besides problems in the development of the tadpoles, as minor tadpoles and with metamorphosis delays. In the genotoxicity test, the caused a change in the frequency of formation of Micronuclei and other significant Erythrocyte Nuclear Abnormalities (ENAs) compared to the control, indicating genotoxic damages. This study shows that environmentally relevant concentrations of glyphosate in short periods of time are capable of causing morphological and erythrocyte abnormalities in both species studied.

Keywords: Amphibians natives, Morphological changes, Herbicide, Toxicity in tadpoles, Genotoxicity in tadpoles.

LISTA DE TABELAS

CAPITULO I

Tabela 1 - Mortalidade de girinos de *Physalaemus cuvieri* e *Physalaemus gracilis* submetidos ao ensaio agudo, em relação ao tempo de exposição a formulação comercial de Glifosato.....38

Tabela 2 - Mortalidade de girinos de *Physalaemus cuvieri* e *Physalaemus gracilis* expostos a formulação comercial de Glifosato por 14 dias.....41

Tabela 3 - Média, desvio padrão e amplitude do comprimento (mm) e massa (g) de girinos de *Physalaemus cuveiri*, no início e no final dos 14 dias de ensaio.....45

Tabela 4 - Comprimento (mm) e massas (g) em média dos girinos de *Physalaemus gracilis*, no início e no final dos 14 dias de ensaio.....45

Tabela 5 - Estágios de Desenvolvimento dos girinos de *P. cuvieri* e *P. gracilis*, diferenças de estágio entre o controle e expostos a 280µg/L de Glifosato.....53

Tabela 6 - Valores de NOAEC, LOAEL, MATC e Risco crônico ecológico (HQ) para mortalidade e alterações morfológica de cada espécie.....54

CAPITULO II

Tabela 1 - Frequência de eritrócitos micronucleados em *Physalaemus cuvieri* e *Physalaemus gracilis* expostos a Glifosato83

Tabela 2 - Números de outras Anormalidades Nucleares Eritrocíticas (ENAs) em girinos de *Physalaemus cuvieri* e *Physalaemus gracilis*, expostos a diferentes concentrações de uma formulação comercial do herbicida Glifosato. Para cada anormalidade está apresentado o número absoluto e entre parênteses a porcentagem85

Tabela 3 - Resultados da ANOVA e Dunnett`s para Micronúcleo e outras Anormalidades Eritrocítica Nuclear (ENAs).....86

Tabela 4 - Valores de NOAEC, LOAEL, MATC e Risco crônico ecológico (HQ) para Micronúcleo e outras Anormalidades Nucleares Eritrocíticas (ENAs) observadas para cada espécie.90

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO I

- Figura 1** - Indivíduos adultos de *Physalaemus cuvieri* adulto (A) e *Physalaemus gracilis* adulto (B) e Girinos de *Physalaemus cuvieri* (C) *Physalaemus gracilis* (D)29
- Figura 2** - Charcos e lagoas onde foram realizadas as coletas das desovas: (A e B) Propriedade Particular do município de Paulo Bento – RS; (C) Horto Florestal Municipal de Erechim – RS; (D) Universidade Federal da Fronteira Sul, Erechim, RS31
- Figura 3** - Coleta manual de desovas (A) e Desova de *Physalaemus cuvieri* no açude da Universidade Federal da Fronteira Sul - Campus Erechim (B)31
- Figura 4** - Aquários com a criação dos girinos para os ensaios, Laboratório de Ecologia e Conservação da Universidade Federal Fronteira Sul, Campus Erechim32
- Figura 5** - Ensaio agudo de *Physalaemus cuvieri* expostos ao agrotóxico Roundup original® DI, Laboratório de Ecologia e Conservação da Universidade Federal Fronteira Sul, Campus Erechim.....33
- Figura 6** - Ensaio agudo de *Physalaemus gracilis* expostos ao agrotóxico Roundup original®DI, aeração artificial, Laboratório de Ecologia e Conservação da Universidade Federal Fronteira Sul, Campus Erechim33
- Figura 7** - Mortalidade de girinos de *Physalaemus cuvieri* expostos a concentrações de Glifosato de 24 a 96 horas.....37
- Figura 8** - Mortalidade de girinos de *Physalaemus gracilis* expostos a concentrações de Glifosato de 24 a 96 horas.....38
- Figura 9** - Mortalidade de girinos de *Physalaemus cuvieri* expostos a concentrações de Glifosato em ensaio agudo39
- Figura 10** - Mortalidade de girinos de *Physalaemus gracilis* expostos a concentrações de Glifosato em ensaio agudo39
- Figura 11** - Mortalidade de girinos de *Physalaemus cuvieri* expostos a diferentes concentrações de Glifosato em ensaio crônico, com mortalidade significativa em 280µg/L.....40
- Figura 12** - Mortalidade de girinos de *Physalaemus gracilis* expostos a diferentes concentrações de Glifosato em ensaio crônico, com mortalidade significativa em 280µg/L.40
- Figura 13** - Mortalidade de girinos de *Physalaemus cuvieri* expostos a diferentes concentrações de Glifosato em ensaio crônico em relação ao tempo de exposição41

Figura 14 - Mortalidade de girinos de <i>Physalaemus gracilis</i> expostos a diferentes concentrações de Glifosato em ensaio crônico em relação ao tempo de exposição.....	42
Figura 15 - Comprimento dos girinos (mm) de <i>Physalaemus cuvieri</i> após 14 dias de ensaio expostos a diferentes concentrações de Glifosato. Pontos são médias e linhas verticais se referem as barras de erro	43
Figura 16 - Comprimento dos girinos (mm) de <i>Physalaemus gracilis</i> após 14 dias de ensaio expostos a diferentes concentrações de Glifosato. Pontos são médias e linhas verticais se referem as barras de erro	43
Figura 17 - Massa (g) dos girinos de <i>Physalaemus cuvieri</i> após 14 dias de ensaio expostos a diferentes concentrações de Glifosato. Pontos são médias e linhas verticais se referem as barras de erro.....	44
Figura 18 - Massa (g) dos girinos de <i>Physalaemus gracilis</i> após 14 dias de ensaio expostos a diferentes concentrações de Glifosato. Pontos são médias e linhas verticais se referem as barras de erro.....	44
Figura 19 - Ocorrência de Alterações morfológicas em <i>Physalaemus cuvieri</i> expostos a diferentes concentrações de Glifosato, comparados ao controle.....	46
Figura 20 - Ocorrência de Alterações morfológicas em <i>Physalaemus gracilis</i> expostos a diferentes concentrações de Glifosato, comparados ao controle.....	46
Figura 21 - Tendência dos “Scores” para as Alterações Morfológicas analisadas em <i>P. cuvieri</i> , relacionados com as concentrações de Glifosato testadas.....	47
Figura 22 - Tendência dos “Scores” para as Alterações Morfológicas analisadas em <i>P. gracilis</i> , relacionados com as concentrações de Glifosato testadas	48
Figura 23 - Classificação das de Alterações Morfológicas (Endpoints) por quatro níveis de “scores”, observados em girinos de <i>P. cuvieri</i> e <i>P. gracilis</i> , expostos a diferentes concentrações da formulação comercial de Glifosato.....	49
Figura 24 - Porcentagem de cada malformação observada em <i>Physalaemus cuvieri</i> (A) e <i>Physalaemus gracilis</i> (B) expostos a diferentes concentrações de Glifosato por 14 dias. As porcentagens foram calculadas a partir do número de indivíduos que apresentaram a malformação.	51
Figura 25 - Alterações Morfológicas observadas em girinos de <i>P. cuvieri</i> e <i>P. gracilis</i> A) Pernas atrofiadas abertas sem movimentação de um exemplar de <i>P. cuvieri</i> B) Pernas atrofiadas sem movimentação, juntas ao corpo e esticadas, exemplar de <i>P. cuvieri</i> C) Cauda torta de um exemplar de <i>P. cuvieri</i> D) Cauda torta de dois exemplares de <i>P. gracilis</i> E) Pernas atrofiadas dobradas sem movimentação exemplares de <i>P. cuvieri</i>	52
Figura 26 - Diferenças entre o Controle e os girinos expostos a concentração 280µg/L com relação ao tempo necessário para completar a Metamorfose. (A) <i>P. cuvieri</i> e (B) <i>P. gracilis</i>	52

CAPITULO II

- Figura 1** - Organização dos ensaios crônicos em sextuplicata para *Physalaemus cuvieri* e *Physalaemus gracilis* expostos a diferentes concentrações da formulação comercial de Glifosato.....81
- Figura 2** - Preparação das lâminas com esfregaço de sangue de *Physalaemus cuvieri* e *Physalaemus gracilis* para o ensaio de Micronúcleo82
- Figura 3** - Micronúcleo e Anormalidades nucleares detectadas nos eritrócitos dos girinos de *Physalaemus cuvieri* e *Physalaemus gracilis* expostos a concentrações de Glifosato. (A) Núcleo normal, (B) Micronúcleo; (C) Microcitose; (D) Broto nuclear; (E) Binucleada; (F) Núcleo lobado; (G) Núcleo entalhado; (H) Cariólise; (I) Apoptose; (J) Núcleo com vacúolo; (H) Anucleada84
- Figura 4** - Micronúcleo e Anormalidades Nucleares Eritrocitárias (ENAs) detectadas em girinos de *Physalaemus cuvieri*86
- Figura 5** - Micronúcleo e Anormalidades Nucleares Eritrocitárias (ENAs) detectadas em girinos de *Physalaemus gracilis*87
- Figura 6** – Micronúcleos e Anormalidades eritrocitárias (ENAs) em girinos de *Physalaemus gracilis* expostos a diferentes concentrações de Glifosato, comparados ao controle.....87
- Figura 7** – Micronúcleos e Anormalidades eritrocitárias (ENAs) em girinos de *Physalaemus cuvieri* expostos a diferentes concentrações de Glifosato, comparados ao controle.....88
- Figura 8** - Frequência de células com Micronúcleo e com outras anormalidades nucleares em *Physalaemus cuvieri* expostos a diferentes concentrações de Glifosato88
- Figura 9** - Frequência de células com Micronúcleo e com outras anormalidades nucleares em *Physalaemus gracilis* expostos a diferentes concentrações de Glifosato89

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRAT	7
LISTA DE TABELAS.....	8
LISTA DE FIGURAS	9
INTRODUÇÃO GERAL.....	14
REFERÊNCIAS	18
CAPITULO 1 - EFEITO AGUDO E CRÔNICO DO HERBICIDA GLIFOSATO EM <i>Physalaemus cuvieri</i> e <i>Physalaemus gracilis</i> (ANURA: LEPTODACTYLIDAE)	25
RESUMO	25
INTRODUÇÃO	26
MATERIAL E METODOS.....	28
Agrotóxico	28
Animal ensaio.....	28
Coleta e manutenção das desovas	29
Procedimento amostral	32
Ensaio agudo	32
Ensaio Crônico	33
Ensaio Crônicos: Estágio 28 Até Metamorfose	35
ANÁLISE DE DADOS.....	36
Avaliação De Risco Ecológico.....	36
RESULTADOS.....	37
Ensaio agudo.....	37
Ensaio crônicos.....	39
Ensaio subletais de 14 dias	39
Comprimento e massa	42
Alterações Morfológicas – Malformações	46
Ensaio Crônicos: Estágio 28 até Metamorfóse.....	51
Análise De Risco Ecológico	53
DISCUSSÃO	54
CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS	60
CAPITULO 2 - Concentrações ambientais de Glifosato tem potencial genotóxico em anfíbios? Efeito de uma formulação comercial de Glifosato em <i>Physalaemus cuvieri</i> e <i>Physalaemus gracilis</i> (Anura, Leptodactylidae).....	75
RESUMO	75

INTRODUÇÃO	76
MATERIAL E METODOS.....	78
Agrotóxico	78
Animal Ensaio.....	79
Ensaio crônico.....	80
Ensaio de Micronúcleo e Anormalidades Nucleares Eritrocíticas.....	81
ANÁLISE DOS DADOS	82
RESULTADOS.....	83
Análise De Risco Ecológico	89
DISCUSSÃO	90
CONCLUSÃO	93
REFERÊNCIAS	94
CONSIDERAÇÕES FINAIS	109

INTRODUÇÃO GERAL

As vendas anuais de agrotóxicos no Brasil mais que dobraram entre os anos 2000 e 2013 (aumentando de 246.284,53 ton em 2000 para 495.764,55 ton em 2013), com crescimento acentuado na região Centro-Sul do País (IBGE 2015). O Estado do Rio Grande do Sul configura-se como o quarto estado de maior volume de vendas de agrotóxicos (IBAMA, 2013).

No Brasil os agrotóxicos são classificados e rotulados por grau de toxicidade em relação ao homem e/ou ambiente. De acordo com o decreto nº 4074/2002 de I a IV os agrotóxicos podem ser: extremamente tóxico (I), altamente tóxico (II), medianamente tóxico (III) e pouco tóxico (VI) (Brasil. Lei nº 7802/1989, Decreto Federal nº 4074/2002; Carneiro et al. 2012). De acordo com a 6ª edição dos Indicadores de Desenvolvimento Sustentável (IDS) do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE 2015), os produtos classificados como medianamente tóxicos são os mais vendidos no País (64,1%), seguidos dos produtos altamente tóxicos (27,7%).

A Convenção de Estocolmo sobre Poluentes Orgânicos Persistentes indica que 10 dos 12 produtos químicos mais perigosos e persistentes em água potável são os agrotóxicos (Hassan et al. 2015). A contaminação aquática pode ocorrer através da dispersão dos agrotóxicos por adsorção, lixiviação e erosão com escoamento, assim como por via direta, quando herbicidas são utilizados para controle de plantas aquáticas (Solomon et al. 2014). Os agrotóxicos presentes na água penetram nos organismos aquáticos de diversas formas, sendo as principais pela derme, brânquias e boca (Tomita 2002). Especificamente os anfíbios anuros podem ser afetados tanto nas fases de girino, (entrando em contato com suas brânquias e boca), como na fase de adulto (penetrando em sua pele altamente permeável).

Independentemente da concentração do contaminante no meio aquático, os organismos podem apresentar processos de acumulação, chamados de bioconcentração ou bioacumulação, quando o foco é organismo; e biomagnificação quando se aborda a cadeia trófica (Costa 2008). A bioacumulação de certas substâncias nos organismos pode ter efeitos mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos (Spadotto et al. 2004). Estes efeitos mostram que práticas agrícolas intensivas podem ser altamente impactantes ao ambiente e estão diretamente relacionadas à redução da biodiversidade mesmo em concentrações baixas (Grisolia 2005).

O Glifosato é o princípio ativo mais utilizado em agrotóxicos no mundo devido a sua alta eficácia no controle de ervas daninhas. Recentemente seu uso aumentou devido ao

cultivo de plantas geneticamente modificadas, resistentes ao Glifosato (Howe et al. 2004; Relyea e Jones 2009). O herbicida Roundup® possui registro em mais de 130 países, sendo o mais vendido no mundo para o controle de plantas daninhas em pré-plantio das lavouras (Monsanto 2017).

Ainda que considerado seguro em ambientes terrestres, por ter alto potencial biodegradável e de adsorção (USEPA 1993), alguns estudos relatam que o Glifosato pode ocasionar alterações no equilíbrio da microfauna do solo, retardo no desenvolvimento e bioacumulação em *Oligochaeta*; além de reduzir a população de insetos e aves (Cox 1995; Andréa 2004; Santos et al. 2005). Estudos feitos com algas resultaram em alta mortalidade e inibição de crescimento quando expostas ao Glifosato (Turgut e Fomin 2002; Tsui e Chu 2003; Vendrell et al. 2009). Também foram observadas alterações no crescimento e metabolismo de moluscos (Tate et al. 2000) e alterações nas atividades enzimáticas e mortalidade de peixes (Glusczak et al. 2007; Evrard et al. 2010; Salbego et al. 2010).

Os anfíbios são os vertebrados mais ameaçados de extinção em todo o mundo e vêm sofrendo uma queda no número de espécies em grandes proporções desde a década de 1980 (Almeida 2014). Esta redução do número de espécies e dos tamanhos das populações pode estar atrelada a uma variedade de influências antropogênicas (Collins e Storfer 2003), principalmente no que diz respeito à contaminação das águas por agroquímicos ou outros poluentes de origem antrópica (Reeves 2014).

Anfíbios são dependentes do ambiente aquático, principalmente para a reprodução e desenvolvimento dos estágios iniciais de vida. Devido a sua pele ser altamente permeável são vulneráveis à contaminação química, principalmente proveniente da poluição das águas por agrotóxicos (Hayes et al. 2006). De acordo com Arcaute et al. (2014) além da suscetibilidade a doenças e outros problemas a nível de desenvolvimento, a exposição a agrotóxicos pode induzir efeitos mais relevantes como lesões genéticas no DNA. Ensaios de laboratório encontraram correlações positivas com a exposição a pesticidas e aumento de problemas genotóxicos em anfíbios (Lajmanovich et al. 2005, 2014; Pérez – Iglesias 2015).

Estudos tem mostrado que o Glifosato e outros agroquímicos vem afetando anfíbios anuros de diversas formas. Podem bioacumular (Smalling et al. 2015), causar perturbações no sistema endócrino (Mcmahon et al. 2013; Poulsen et al. 2015), alterações na laringe (Shenoy 2012) e perda de estrutura cartilaginosa (Schultz et al. 1985; Riggins e Schultz 1986; Lajmanovich et al. 1998, 2003), atrasos na metamorfose (Bernabó et al. 2016) e alterações morfológicas (Muniswamy et al. 2012). Substâncias químicas bioacumuladas na fase aquática podem permanecer concentradas durante a metamorfose, com transmissão de

contaminantes através das fronteiras ecológicas (água e sedimento para plantas e animais). Esta transferência é relevante para a prole subsequente, ocorrendo também a passagem de contaminantes para os ovos (Metts et al. 2013).

Os ensaios ecotoxicológicos são realizados com organismos indicadores, que devido as suas características de pequeno limite de tolerância ecológica a determinadas substâncias químicas, apresentam alguma alteração, seja ela fisiológica, morfológica ou comportamental, quando expostos a determinados poluentes. Estes ensaios são denominados de bioensaios ou ensaios biológicos (Magalhães e Filho 2008; Rubinger 2009). Dentre os vertebrados, os estudos de ecotoxicologia aquática são realizados geralmente com peixes (Ghisi e Cestari 2013; Roy et al. 2016; Sobjak et al. 2017) e anfíbios (Muniswamy et al. 2012; David e Kartheek 2015; Polo - Cavia et al. 2016). Anfíbios são de particular importância para estudos toxicológicos devido a sua sensibilidade a substâncias químicas, tanto na água como no solo, suas características biológicas (pele permeável, ovos sem casca) e ciclo de vida (metamorfose e fase mais sensível na água), além das interações ecológicas no ambiente aquático e terrestre (Daszak et al. 2003; Relyea et al. 2006).

Os ensaios toxicológicos podem ser agudos e crônicos. Os ensaios agudos, visam avaliar letalidade (sobrevivência ou não dos organismos) em um curto período em relação ao ciclo de vida de um determinado organismo. (Rand e Petrocelli 1985). Estes ensaios têm como objetivo verificar a mortalidade ou imobilidade que geralmente é expressa para 50% dos organismos por EC50, DL50, LC50. Já os ensaios de toxicidade crônica dependem diretamente dos resultados dos ensaios de toxicidade aguda, uma vez que as concentrações subletais são calculadas a partir da CL50. Comparado com os ensaios agudos, estes ensaios são mais sensíveis à diluição esperada em amostras ambientais. Avaliam a ação dos poluentes cujo efeito traduz-se pela resposta a um estímulo que continua por longo tempo (Rand e Petrocelli 1985). Geralmente este tipo de ensaio permite a sobrevivência do organismo, mas afeta uma ou várias de suas funções biológicas, interferindo, por exemplo, na reprodução, desenvolvimento de ovos, no crescimento entre outras anomalias (Magalhães e Filho 2008).

Existem poucos estudos referentes ao efeito de contaminantes em anfíbios Sul Americanos (e.g. Zocche et al. 2013; Wolkowicz et al. 2014; Curi et al. 2017; Peltzer et al. 2017), especialmente agrotóxicos (e.g. Svartz et al. 2012; Arcaute et al. 2014; Lajmanovich et al. 2014). No Brasil, os estudos nesta área são recentes e poucos grupos de pesquisa se dedicam a utilizar anfíbios como animais modelos para efeitos de agrotóxicos (e.g. Oliveira 2016; Rissoli 2016; Macagnan et al. 2017). O Brasil possui a maior diversidade de espécies

de anfíbios do mundo, com 1026 descritas (Sociedade Brasileira De Herpetologia 2015), ao mesmo tempo é um dos líderes mundiais de consumo de agrotóxicos (Faria et al. 2007). Esses fatos mostram a necessidade de estudos ecotoxicológicos com este grupo de vertebrados.

Physalaemus é um dos maiores gêneros da família Leptodactylidae (Lourenço et al. 2015). Atualmente contem 47 espécies reconhecidas (Frost 2017), distribuídas pela região norte e central da Argentina; Bolívia oriental; Paraguai; Uruguai; Brasil e as Guianas; terras baixas do sul da Venezuela e Ilanos do sudeste da Colômbia (Frost 2017). As espécies *Physalaemus cuvieri* e *Physalaemus gracilis*, possuem hábitos de reprodução e distribuição geográfica semelhantes. Atualmente são classificadas na Lista Vermelha como Menos Preocupantes (LC – Least-Concern) devido a sua ampla gama de habitats, sendo conhecidas no Sul, Sudeste, Nordeste e Região Central do Brasil, além da Argentina, Paraguai e Uruguai (Langone 1994; Mijares et al. 2010; Herpeto.org 2017).

Os ambientes de preferência para reprodução e o desenvolvimento larvário são os corpos d'água lênticos, como banhados e piscinas naturais temporárias. Estas espécies depositam seus ovos próximos ou entre a vegetação, em massas de espuma que produzem ao bater as pernas na água durante o amplexo (Barreto e Andrade 1995). Estes ambientes são comumente associados às áreas de agricultura, o que pode facilitar a contaminação por agrotóxicos em seus ambientes de reprodução (Achaval e Olmos 2003; Lenhardt et al. 2015). Por esses motivos e por tolerarem bem ambientes antropizados, as duas espécies constituem bons modelos para avaliação da suscetibilidade de espécies nativas a agrotóxicos.

O presente estudo foi dividido em dois capítulos. No primeiro capítulo, intitulado “Efeito agudo e crônico do herbicida Glifosato em *Physalaemus cuvieri* e *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae)”, foi avaliada a sobrevivência, desenvolvimento e alterações morfológicas nestas duas espécies. No segundo capítulo, intitulado “Concentrações ambientais de Glifosato tem potencial genotóxico em anfíbios? Efeito de uma formulação comercial de Glifosato em *Physalaemus cuvieri* e *Physalaemus gracilis* (Anura, Leptodactylidae)” foram analisados possíveis danos genéticos a partir de ensaio de frequência de Micronúcleo em girinos das duas espécies submetidas aos ensaios crônicos com Glifosato.

REFERÊNCIAS

- Almeida PR (2014) Toxicidade aguda (lc50) e efeitos comportamentais e morfológicos do formulado comercial Roundup Original DI em girinos de *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leptodactylidae) e *Rhinella icterica* (Anura, Bufonidae). Dissertation, Universidade Federal de Alfenas (in Portuguese)
- Amarante JOP, Santos TCR, Brito NM, Ribeiro ML (2002) Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. *Química Nova* 25:589-593. doi:10.1590/S0100-40422002000400014 (in Portuguese)
- Andréa MM, Papini S, Peres TB, Bazarin S, Savoy VLT, Matallo MB (2004) Glyphosate: influência na biota do solo e ação de minhocas sobre sua dissipação em terra agrícola. *Planta Daninha* 22:95-100. doi:10.1590/S0100-83582004000100012 (in Portuguese)
- Arcaute CR, Pérez IJM, Nikoloff N, Natale GS, Natale S, Soloneski S, Larramendy ML (2014) Genotoxicity evaluation of the insecticide imidacloprid on circulating blood cells of Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae) by comet and micronucleus bioassays. *C. Ecological Indicators* 45:632–639. doi:10.1016/j.ecolind.2014.05.034
- Bernabó I, Guardia A, Macirella R, Sesti S, Crescente A, Brunelli E (2016) Effects of long-term exposure to two fungicides, pyrimethanil and tebuconazole, on survival and life history traits of Italian tree frog *Hyla intermedia*. *Aquatic Toxicology* 56–66
- Bridges CM, Semlitsch RD (1999) Linking environmental contaminants and amphibian population declines. *The Glade* 2:3-5
- Calviello G, Piccioni E, Boninsegna A, Tedesco B, Maggiano N, Serini S, Wolf FI, Palozza P (2006) DNA damage and apoptosis induction by the pesticide Mancozeb in rat cells: involvement of the oxidative mechanism. *Toxicology and Applied Pharmacology* 211, 87–96
- Collins JP, Storfer A (2003) Amphibian declines: sorting the hypotheses. *Diversity and Distributions* 9:89–98

Curi LM, Peltzer PM, Martinuzzi C, Attademo MA, Seib S, Simoniello MF, Lajmanovich RC (2017) Altered development, oxidative stress and DNA damage in *Leptodactylus chaquensis* (Anura: Leptodactylidae) larvae exposed to poultry litter Ecotoxicology and Environ Saf 143:62-71. doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.05.007

Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD (2003) Emerging infectious disease and amphibian population declines. Diversity and Distributions 9:141-150

David M, Kartheek RM (2015) Malathion acute toxicity in tadpoles of *Duttaphrynus melanostictus*, morphological and behavioural. The J of Basic & Appl Zoology 72:1-7. doi:10.1016/j.jobaz.2015.01.004

Davidson C, Shaffer HB, Jennings MR (2001) Declines of the California red-legged frog: climate, UV-B, habitat, and pesticides hypotheses. Ecological Applications 11:464-479. doi:10.1890/1051-0761(2001)011[0464:DOTCRL]2.0.CO;2

Evrard E, Marchand J, Theron M, Pichavant-Rafini K, Durand G, Quiniou L, Laroche J (2010) Impacts of mixtures of herbicides on molecular and physiological responses of the European flounder *Platichthys flesus*. Comparative Biochemistry and Physiology 152:321-331. doi:10.1016/j.cbpc.2010.05.009

Faria NMX, Fassa AG, Facchini LZ (2007) Intoxicação por agrotóxicos no Brasil: os sistemas oficiais de informação e desafios para realização de estudos epidemiológicos. Ciência e Saúde Coletiva 12:25-38. doi:10.1590/S1413-81232007000100008 (in Portuguese)

Ghisi NC, Cestari MM (2013) Genotoxic effects of the herbicide Roundup® in the fish *Corydoras paleatus* (Jenyns 1842) after short-term, environmentally low concentration exposure. Environ Monit Assess (2013) 185:3201-3207. doi:10.1007/s10661-012-2783-x

Gluszczak L, Miron DS, Moraes BS, Simões RR, Schetinger MRC, Morsch VM, Loro VL (2007) Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish *Rhamdia quelen*. Comp Biochem Physiol C 146:519-524. doi:10.1016/j.cbpc.2007.06.004

Grisa FT, Ortiz KS, Geremias D, Thiesen FV (2008) Avaliação da contaminação por organofosforados em águas superficiais no município de Rondinha - Rio Grande do Sul. Química Nova 31:1631-1635. doi:10.1590/S0100-40422008000700006 (in Portuguese)

Grisolia CK (2005) Agrotóxicos: mutações, câncer e reprodução. UNB. Brasília, Brasil, pp 392 (in Portuguese)

Harper EB, Rittenhouse TAG, Semlitsch RD (2008) Demographic consequences of terrestrial habitat loss for pool-breeding amphibians: predicting extinction risks associated with inadequate size of buffer zones. *Conserv. Biol.* 22, 1205-1215.

Hartmann MT, Hartmann PA, Haddad CFB (2010) Reproductive modes and fecundity of an assemblage of anuran amphibians in the Atlantic rainforest, Brazil. *Iheringia* 3:207-215. doi: 10.1590/S0073-47212010000300004

Hatch AC, Blaustein AR (2000) Combined effects of UV-B, nitrate, and low pH reduce the survival and activity level of larval cascades frogs *Rana cascadae*. *Arch Environ Contamination and Toxicology* 39:494-499. doi:10.1007/s002440010132

Hayes TB, Stuart AA, Mendoza M, Collins A, Noriega N, Vonk A, Johnston G, Liu R, Kpodzo D (2006) Characterization of atrazine induced gonadal malformations and effects of an androgen antagonist (*Cyproterone acetate*) and exogenous estrogen (estradiol 17β): support for the demasculinization/feminization hypothesis. *Environ Health Perspect* 114:134-141. doi:10.1289/ehp.8067

Herpeto.org (2017) *Physalaemus cuvieri* e *Physalaemus gracilis*. Disponível em: <<http://br.herpeto.org/anfibios/anura/physalaemus-cuvieri/>>. Accessed in 12 march 2017.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Boletim de comercialização de agrotóxicos e afins, histórico de vendas de 2000 a 2012 (2013).https://www.iciet.fiocruz.br/sites/www.iciet.fiocruz.br/files/IBAMA_boletim%20de%20comercializacao_2000_2012.pdf. Accessed in 26 april 2017 (in Portuguese)

Lajmanovich RC, Zaguiitc MF, Casco VH (1998) Paraquat tolerance and alteration of internal gills structures of *Scinax nasicus* tadpoles (Anura: Hylidae). *Environ Contamination and Toxicology* 34:364-369. doi:10.1007/s002449900331

Lajmanovich RC, Sandoval MT, Peltzer PM (2003) Induction of Mortality and Malformation in *Scinax nasicus* Tadpoles Exposed to Glyphosate Formulations. *Environ Contamination and Toxicology* 70:612-618. doi:10.1007/s00128-003-0029-x

Lajmanovich RC, Cabagna M, Peltzer PM, Stringhini GA, Attademo AM (2005) Micronucleus induction in erythrocytes of the *Hyla pulchella* tadpoles (Amphibia: Hylidae)

exposed to insecticide endosulfan. *Mutation Research* 587:67-72. doi:10.1016/j.mrgentox.2005.08.001

Lajmanovich RC, Cabagna-Zenklusen MC, Attademo AM, Junges CM, Peltzer PM, Bassó A, Lorenzatti E (2014) Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in tadpoles of the common toad *Rhinella arenarum* treated with the herbicides Liberty® and glufosinate-ammonium. *Mutation Research* 769:7-12. doi: 10.1016/j.mrgentox.2014.04.009

Langone JA (1994) Ranas y sapos del Uruguay (reconocimiento y aspectos biológicos). Museo Damaso Antonio Larrañaga, Montevideo, Uruguay (In Spanish)

Lips KR (1998) Decline of a tropical montane amphibian fauna. *Conservation Biology* 12:106-117

Lourenço LB, Targueta CP, Baldo D, Nascimento J, Garcia PCA, Andrade GV, Haddad CFB, Recco-Pimentel SM (2015) Phylogeny of Frogs From The Genus *Physalaemus* (anura, Leptodactylidae) Inferred From Mitochondrial And Nuclear Gene Sequences. Academic Press Inc Elsevier Science. doi:10.1016/j.ympev.2015.06.011

Macagnan N, Rutkoski CF, Kolcenti C, Vanzetto GV, Macagnan LP, Sturza PF, Hartmann PA, Hartmann MT (2017) Toxicity of cypermethrin and deltamethrin insecticides on embryos and larvae of *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae). *Environ Science and Pollut Res* 24:20699-20704. doi:10.1007/s11356-017-9727-5

Mcmahon TA, Romansic JM, Rohr JR (2013) Nonmonotonic and monotonic effects of pesticides on the pathogenic fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in culture and on tadpoles. *Environ. Sci. Technol.* n.47, p.7958–7964

Magalhães DP, Filho ASF (2008) Ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecol Bras* 12:355-381. (in Portuguese)

Mijares A, Rodrigues MT, Baldo D (2010) *Physalaemus cuvieri*. IUCN Red List. <http://www.iucnredlist.org/details/57250/0>. Accessed in 23 March 2017

Muniswamy D, Shambanagouda R, Vineetkumar K, Ramesh H (2012) 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* 103:127-137. doi:10.1016/j.pestbp.2012.04.009

- Peltzer PM, Lajmanovich RC, Attademo AM, Junges CM, Teglia CM, Martinuzzi C, Curi L, Culzoni MJ, Goicoechea HC (2017) Ecotoxicity of veterinary enrofloxacin and ciprofloxacin antibiotics on anuran amphibian larvae. *Environ Toxicol Pharmacol* 51:114-123. doi:10.1016/j.etap.2017.01.021
- Pérez-Iglesias JM, Soloneski S, Nikoloff N, Natale GS, Larramendy ML (2015) Toxic and genotoxic effects of the imazethapyr-based herbicide formulation PivotHs on montevideotreefrog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae) *Ecotoxicol and Environ Saf* 119:15–24. doi:10.1016/j.ecoenv.2015.04.045
- Polo-Cavia N, Burraco P, Gomez-Mestre I (2016) Low levels of chemical anthropogenic pollution may threaten amphibians by impairing predator recognition. *Aquatic Toxicology* 172:30-35. doi:10.1016/j.aquatox.2015.12.019
- Rand GM, Petrocelli SR (1985) *Fundamentals of aquatic toxicology: Methods and applications*. Hemisphere Publishing. New York, United States
- Reeves RA (2014) *Amphibian stress, survival, and habitat quality in restored agricultural wetlands in central Iowa*. Tese, State University Ames, Iowa
- Relyea RA (2006) Response to Letters to the Editor: The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. *Ecol Appl* 16:2027–2034
- Relyea RA, Jones DK (2009) The toxicity of Roundup Original Max® to 13 species of larval amphibians. *Environ Toxicology and Chemistry* 13:2004-2008. doi:10.1897/09-021.1
- Rissoli RZ, Abdalla FC, Costa MJ, Rantin FT, McKenzie DJ, Kalinin AL (2016) Effects of glyphosate and the glyphosate based herbicides Roundup Original® and Roundup Transorb® on respiratory morphophysiology of bullfrog tadpoles. *Chemosphere* 156:37-44. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.04.083
- Roy NM, Ochs J, Zambrzycka E, Ariann A (2016) Glyphosate induces cardiovascular toxicity in *Danio rerio*. *Environ Toxicology and Pharmacology* 46:292-300. doi:10.1016/j.etap.2016.08.010
- Salbego J, Pretto A, Gioda C, De Menezes C, Lazzari R, Radünz NJ, Baldisserotto B, Loro V (2010) Herbicide Formulation with Glyphosate Affects Growth, Acetylcholinesterase

Activity, and Metabolic and Hematological parameters in Piava (*Leporinus obtusidens*). Arch Environ Contam Toxicol 58:740-745. doi:10.1007/s00244-009-9464-y

Shenoy K (2012) Environmentally realistic exposure to the herbicide atrazine alters some sexually selected traits in male guppies. Plos One 07:01-10. doi:10.1371/journal.pone.0030611

Sobjak TM, Romão S, Do Nascimento CZ, Dos Santos AFP, Vogel L, Guimarães ATB (2017) Assessment of the oxidative and neurotoxic effects of glyphosate pesticide on the larvae of *Rhamdia quelen* fish. Chemosphere 182:267-275. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.05.031

Sociedade Brasileira De Herpetologia 2015 <http://www.sbherpetologia.org.br/index.php/anfibios>. Accessed in 16 may 2017. (in Portuguese)

Svartz GV, Herkovits J, Coll CSP (2012) Sublethal effects of atrazine on embryo-larval development of *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae). Ecotoxicol. doi: 10.1007/s10646-012-0880-9

Tate T, Jackson R, Christian F (2000). Effects of glyphosate and dalapon on total free amino acid profiles of *Pseudosuccinea columella* Snails. Bull Environ Contamination Toxicology 64:258–262

Tsui MTK, Chu LM (2003) Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. Chemosphere 52:1189-1197. doi:10.1016/S0045-6535(03)00306-0

Turgut C, Fomin A (2002) Sensitivity of the rooted macrophyte *Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verdcourt to seventeen pesticides determined on the basis of EC50. Bull Environ Contamination Toxicology 69:601-608. doi:10.1007/s00128-002-0103-9

Vendrell E, Ferraz DG, Sabater C, Carrasco JM (2009) Effect of glyphosate on growth of four freshwater species of phytoplankton: a microplate bioassay. Bull Environ Contamination Toxicology 82:538-42. doi:10.1007/s00128-009-9674-z

Wauchope RD, Buttler TM, Hornsby AG, Augustijn-Beckers PW, Burt JP (1992) The SCS/ARS/CES pesticide properties database for environmental decision making. Rev Environ Contamination Toxicology 123:1-155

Wolkowicz IRH, Herkovits J, Pérez CCS (2014) Stage-dependent toxicity of bisphenol a on *Rhinella arenarum* (anura, bufonidae) embryos and larvae. Environ Toxicology 29:146-154. doi:10.1002/tox.20781

Young BE, Boucher TM; Chanson JS, Cox NA, Stuart SN (2004) Joyas que están desapareciendo: el estado de los anfibios en el Nuevo Mundo. Nature Serve. Arlington, Virginia

Zocche JJ, Damiani AP, Hainzenreder G, Mendonca RA, Peres PB, Santos CE, Debastiani R, Dias JF, Andrade VM (2013) Assessment of heavy metal content and DNA damage in *Hypsiboas faber* (Anuran Amphibian) in coal open-casting mine. Environ Toxicology Pharmacol 36:194-201. doi:10.1016/j.etap.2013.03.015

CAPITULO 1

EFEITO AGUDO E CRÔNICO DO HERBICIDA GLIFOSATO EM *Physalaemus cuvieri* e *Physalaemus gracilis* (ANURA: LEPTODACTYLIDAE)

RESUMO

Anfíbios anuros vêm enfrentando um declínio populacional nos últimos anos, que está atrelado a diversas causas, entre elas, a perda de habitat e a poluição dos ambientes aquáticos, provenientes de químicos agrícolas. Os agrotóxicos mais utilizados nas lavouras atualmente são herbicidas e entre os herbicidas mais utilizados no mundo está o Glifosato. Herbicidas são considerados seguros a biota, porém, têm se mostrado perigosos para espécies não alvo, incluindo anfíbios. O presente estudo avaliou os efeitos agudos e crônicos de uma formulação comercial de Glifosato sobre girinos de duas espécies de anfíbios anuros nativos da América do Sul, *Physalaemus cuvieri* e *Physalaemus gracilis*. Para tanto, foram coletadas desovas em meio natural e encaminhadas ao Laboratório de Ecologia e Conservação da Universidade Federal Fronteira Sul – UFFS, onde foram mantidas em condições controladas. Os ensaios toxicológicos agudos e crônicos iniciaram no estágio 25 de Gosner (1960). A CL_{50-96h} foi de 1360µg/L para *P. cuvieri* e 1530µg/L para *P. gracilis*. Nos ensaios crônicos os girinos foram submetidos a doses permitidas pela legislação brasileira e a concentrações encontradas em ambientes naturais, para águas do Brasil e Argentina (65, 144, 280, 500, 700 e 1000µg/L). Nos ensaios de desenvolvimento até metamorfose os girinos foram submetidos a concentração 280µg/L, permitida pela legislação brasileira (Conama 357/2005) para águas de classe III, que fazem parte de locais semelhantes aos habitats utilizados por estes animais em época reprodutiva. Os ensaios subletais de 14 dias ocasionaram efeitos agudos de mortalidade a partir de 48 horas de exposição para as duas espécies em estudo. O Glifosato causou malformações em praticamente todas as concentrações testadas. Nos ensaios de desenvolvimento metamórfico foi observado retardo da metamorfose para as duas espécies expostas, permanecendo em clímax metamórfico por uma média de 8 dias a mais do que o controle, bem como ocorreram anormalidades nos membros posteriores e cauda. Nas análises de avaliação de risco, a Máxima Concentração de Toxicante aceitável (Maximum Acceptable Toxicant Concentration – MATC) de Glifosato para mortalidade e malformação foi menor do que é permitido para águas brasileiras. A formulação de Glifosato testada nesta pesquisa apresentou alto risco ambiental agudo e crônico para as duas espécies estudadas.

Palavras Chave: Anuros, Glifosato, Risco ambiental agudo, Toxicidade em girinos.

INTRODUÇÃO

O aumento no uso de agroquímicos para produção agrícola tem despertado grande preocupação à população, principalmente no que diz respeito à contaminação dos recursos hídricos (Thompson et al. 2007; Ribeiro et al. 2013). A presença de agrotóxicos em ecossistemas naturais pode ser resultado de ampla aplicação destes produtos; aplicação ao longo de muitos anos, e o armazenamento de pesticidas com a data vencida em locais inadequados (Konstantinou et al. 2006; Hildenbrandt et al. 2008; Foit et al. 2010). Estima-se que mais de 90% dos agrotóxicos aplicados convencionalmente não atingem seu alvo, em um tempo definido, nas quantidades precisas (Singh et al. 2009; Ying et al. 2011). Com o objetivo de compensar estas perdas, são utilizadas quantidades exacerbadas de substâncias químicas (Chevillard et al. 2012).

Os agrotóxicos mais intensamente aplicados no Brasil são os herbicidas (Costa et al. 2017). O amplo uso de herbicidas está associado às práticas de cultivo mínimo, plantio direto, além de técnicas agrícolas que usam mais intensamente o controle químico de ervas daninhas (IBGE, 2010). O herbicida o mais utilizado é o Glifosato (IBAMA 2013). O Glifosato tem como princípio ativo o Glifosato Di-amônio de N- (phosphonomethyl) glycine pertencendo ao grupo químico dos organofosforados. Não é seletivo e, desta forma, atinge uma grande quantidade de plantas (Amarante Junior et al. 2002). Sistêmico, age rapidamente, ocasionando a mortalidade das ervas espontâneas consideradas pragas agrícolas (Lajmanovich et al. 2003).

A classe dos organofosforados é considerada biodegradável, com persistência curta no solo, normalmente de 1 a 3 meses. No entanto, podem transformar-se em fosfatos, resultando em compostos potencialmente perigosos ao meio ambiente (Peres e Moreira 2003; Andréa 2004; Toni et al. 2006). Geralmente não atingem águas subterrâneas devido à sua forte característica de adsorção, porém, justamente por isso contaminam facilmente as águas superficiais pelo escoamento e uso direto na água (USEPA 1993; Solomon e Thompson 2003; Scribner et al. 2007).

As formulações comerciais de agrotóxicos utilizam solventes (ingredientes inertes) junto com o princípio ativo. Esses solventes podem alterar as propriedades toxicológicas dos produtos, sendo por muitas vezes mais tóxicos do que o próprio princípio ativo (Almeida 2014; Itho 2014). Estudos tem revelado que as formulações comerciais de Glifosato, com ingredientes surfactantes, além do ingrediente ativo, tem sido significativamente mais tóxico

do que o Glifosato puro para, moluscos, peixes, anfíbios, répteis e invertebrados aquáticos e terrestres (e.g. Tsui e Chu 2003, 2004; Pettersson e Ekelund 2006; Moore et al. 2012).

Anfíbios anuros são considerados o grupo de vertebrados aquáticos mais sensível aos efeitos tóxicos do Glifosato (Edginton et al. 2004; Relyea 2004; Moore et al. 2012). Estudos feitos com Glifosato e anfíbios tem revelado aumento da mortalidade e efeitos no crescimento e desenvolvimento de girinos (Edginton et al. 2004; Fuentes et al. 2011). Foram relatados também anormalidades gonadais, diminuição do tamanho e taxas de desenvolvimento de girinos com possíveis relações à ruptura do caminho da tireoide (Howe et al. 2004; Relyea e Jones 2009; Jones et al. 2010; Williams e Semlitsch 2010), deformidades craniofaciais e da boca, anomalias oculares e caudas curvas dobradas (Lajmanovich 2003). Em relação aos ecossistemas aquáticos, foram observados efeitos indiretos na abundância de girinos (Edge et al. 2012).

Anfíbios são conhecidos como bioindicadores de fatores que afetam a vegetação aquática e ciliar, sendo sensíveis a alterações ambientais (Hartmann et al. 2010, Brodeur et al. 2012). Em função da sua biologia e ciclo de vida, anfíbios habitam ambientes aquáticos e terrestres e se alimentam de plantas e animais que podem ser rotas importantes de captação de poluentes (Wells 1977; Besten e Munawar 2005). Além disso, possuem pele semipermeável e ovos sem cascas, que ficam diretamente expostos ao solo, água e luz solar, possibilitando a entrada de substâncias nocivas, tais como pesticidas (Hayes et al. 2006). Estas características tornam anfíbios modelos apropriados para estudos ecotoxicológicos (Burliba e Gavril 2011).

Physalaemus cuvieri, conhecida popularmente como rã-cachorro, apresenta tolerância a uma ampla gama de habitats e se distribui pela Argentina, Brasil e Paraguai. (Frost 2017). Espécie de ampla distribuição e de hábitos noturnos, ocorre em muitos habitats, incluindo pastagens abertas e savanas inundadas. Pode ser encontrada em corpos d' água temporários, como poças de água, onde pode colocar de 277 a 725 ovos (Barreto e Andrade 1995), colocados em ninhos de espuma, unidos a hastes de grama na margem da lagoa. É ameaçada localmente na Argentina pela destruição dos habitats para agricultura e extração de madeira, além da poluição da terra e água ocasionada pelo escoamento (Mijares 2010).

Physalaemus gracilis, conhecida como rã-chorona, tem ampla distribuição ocorrendo no sul do Brasil, Uruguai, Argentina, e provavelmente no Paraguai (Frost 2017). É frequentemente associada a formações vegetais abertas e pode ocorrer em ambientes antropizados (Colombo et al. 2008). É uma espécie terrestre que se reproduz usando um ninho de espuma em piscinas naturais temporárias, podendo ovipositar entre 400 e 800

óvulos por fêmea (Camargo et al. 2008; Lavilla et al. 2010). Não há registros de ameaças a esta espécie pois adapta-se a áreas antropizadas (Lavilla et al. 2010).

Este estudo teve como principal objetivo avaliar a toxicidade aguda e crônica da formulação comercial do herbicida Glifosato analisando sobrevivência e desenvolvimento de duas espécies de anfíbios sulamericanas: *Physalaemus cuvieri* e *Physalaemus gracilis*.

MATERIAL E METODOS

Agrotóxico

Foi utilizado Glifosato na formulação comercial Roundup original® DI, herbicida não seletivo, formulado pela Monsanto do Brasil LTDA, registrado no Ministério da Agricultura, da Pecuária e Abastecimento – MAPA sob nº 00513. Tem em sua composição: Sal de Di-amônio de N- (phosphonomethyl) glycine (Glifosato) 445 g/L (44,5% m/v), equivalente ácido de N- (phosphonomethyl) glycine (Glifosato) 370 g/L (37,0% m/v) além de outros Ingredientes, 751 g/L (75,1% m/v).

O Glifosato tem meia vida entre 7 e 21 dias (Giesy et al. 2000; Paterson 2007; Edge et al. 2012), a taxa de aplicação é de 1 - 6 g-a.i/ ha; Coeficiente de partição octanol-água é de 5,4 LogK_{ow} (Macbean et al. 2010), considerado com baixa hidrofobicidade, e elevada sorção (Prata 2002); O Coeficiente de adsorção ou força de adsorção é (Koc > 5.000) (Zimdahl 1999); A Pressão de vapor 2,1X10⁻³ mPa a 25 ° C / 1,58 x 10⁻⁸ mm Hg / a 25 ° C (Macbean et al. 2010) e a solubilidade na água é de 1,05X10⁻⁶ mg / L a 25 ° C (Macbean et al. 2010); considerada por Prata (2002) alta solubilidade (S_w = 11,6 g L⁻¹). O Glifosato e todos os seus sais não são voláteis, não se degradam fotoquimicamente e são estáveis no ar.

O Glifosato tem ação sistêmica, faz parte do grupo químico glicina substituída, considerado o seu grupo de formulação solúvel (SL). De acordo com a bula do Roundup Original® DI, possui classificação Toxicológica Classe II – Altamente tóxico e Classificação do Potencial de Periculosidade Ambiental Classe III – Produto Perigoso ao Meio Ambiente.

Animal ensaio

Para realização desta pesquisa foram utilizadas duas espécies de anfíbios anuros, *Physalaemus cuvieri* (rã-cachorro) e *Physalaemus gracilis* (rã-chorona) (Figura 1).



Figura 1 – Indivíduos adultos de *Physalaemus cuvieri* (A) e *Physalaemus gracilis* (B) e girinos de *Physalaemus cuvieri* (C) e *Physalaemus gracilis* (D). Fonte: O autor.

Coleta e manutenção das desovas

As coletas das desovas foram efetuadas em propriedade particular, localizada na zona rural do município de Paulo Bento ($- 27^{\circ} 42' 5.76''$, $- 52^{\circ} 25' 33.6''$); no Horto Florestal Municipal de Erechim, localizado na área rural do município de Erechim, próximo a BR 135, ($27^{\circ} 42' 43''$ e $27^{\circ} 43' 13''$ Sul e $52^{\circ} 18' 05''$ e $52^{\circ} 18' 43''$ Oeste), e nos açudes da Universidade Federal da Fronteira Sul, localizada na Rodovia ERS 135, km 72, Erechim ($- 27^{\circ} 43' 43.2''$; $- 52^{\circ} 17' 9.07''$), todos situados na região norte do estado do Rio Grande do Sul. Estas áreas foram consideradas de referência por não terem aplicação de agrotóxicos nas proximidades (Figura 2). No total foram realizadas onze coletas no período de outubro de 2017 a março de 2018. Todas as desovas coletadas tinham menos de 24 horas de oviposição (Figura 3).

Imediatamente após a coleta as desovas, foram levadas até o laboratório de Ecologia e Conservação da Universidade Federal Fronteira Sul, *campus* Erechim. As desovas foram mantidas em aquários, com aproximadamente 10 litros de água. Para criar um ambiente artificial semelhante ao do habitat natural dos girinos, foram utilizadas plantas aquáticas e partículas de solo, ambos retirados do mesmo local das coletas (Figura 4). Como os girinos apresentam fótotaxia negativa e preferência por ambientes com baixa iluminação (Anderson e Graham 1967; Anderson e Williamson 1974; Marangio 1975), foi utilizado fotoperíodo

natural (Iluminação natural), e os aquários e ensaios foram protegidos da luz direta, com papel pardo. Desde a entrada no laboratório até o final dos ensaios os girinos permaneceram com aeração artificial. A água utilizada para a criação e ensaios tinha os seguintes parâmetros: Oxigênio Dissolvido (OD) entre 4,0 e 6,0mg/L; Temperatura $23^{\circ}\text{C} \pm 2$, pH entre 6,8 e 7,2, Condutividade entre 151 e 178 $\mu\text{S}/\text{cm}$ e Alcalinidade 9.74 mg CaCO_3/L . Turbidez < 5; Ca 6.76 mg/L, Na 44.1 mg/L, Mg 1.35 mg/L, Fe 0.08 mg/L e Ni < 0.001 mg/L.

Os girinos foram alimentados diariamente *ad libitum* com ração completa para peixes e animais aquáticos (Alcon - MEP 200 complex), composta de minerais orgânicos quelatados, enzimas digestivas e probiótico favorecendo o desenvolvimento da flora intestinal, além de 45% de proteína bruta e vegetal em flocos. A alimentação foi iniciada a partir do estágio 25 de Gosner (1960), no qual a boca tem sua formação completa. Os girinos não utilizados nos experimentos foram devolvidos ao local de coleta. Esta pesquisa teve licença do Ibama para coleta, nº54939-1, e autorização do comitê de ética no uso de animais (CEUA) da Universidade Federal da Fronteira Sul.



Figura 2 – Charcos e lagoas onde foram realizadas as coletas das desovas: (A e B) Propriedade Particular do município de Paulo Bento – RS; (C) Horto Florestal Municipal de Erechim – RS; (D) Universidade Federal da Fronteira Sul, Erechim, RS. Fonte: O autor.

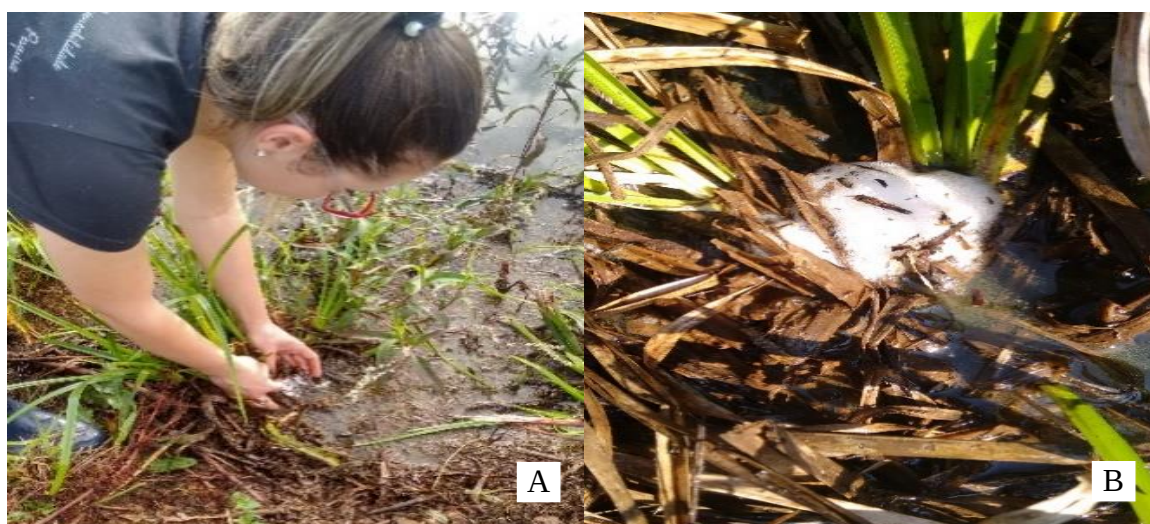


Figura 3 – Coleta manual de desovas (A) e Desova de *Physalaemus cuvieri* no açude da Universidade Federal da Fronteira Sul - Campus Erechim (B). Fonte: O autor.



Figura 4 – Aquários com a criação dos girinos para os ensaios, Laboratório de Ecologia e Conservação da Universidade Federal Fronteira Sul, *Campus Erechim*. Fonte: O autor.

Procedimento amostral

Ensaio agudo

Os ensaios agudos iniciaram no estágio 25-26 (Gosner 1960), pois neste período os girinos apresentam melhores condições como peças bucais completas e a alimentação é possível (McDiarmid e Altig 1999), desta forma podem ser submetidos a ensaios toxicológicos. As brânquias externas são atrofiadas formando-se um espiráculo do lado esquerdo que permite a respiração mesmo com brânquias internas e estruturas especializadas para uma melhor natação também já estão formadas neste período (Duellman e Trueb 1986).

Os girinos testados foram provenientes de duas desovas para cada espécie. Somente foram escolhidos e submetidos aos ensaios animais em condições comportamentais e de mobilidade normais. O ensaio agudo teve duração de 96 horas, sendo monitorado a cada 24 horas para contabilização da mortalidade, análise de temperatura e oxigenação da água.

O ensaio agudo foi organizado em sextuplicada. Foram utilizados cinco girinos por recipiente de unidade experimental, de vidro extéril e cilíndrico com capacidade para 450mL de água, totalizando 30 girinos expostos em cada uma das seguintes concentrações de Roundup original®DI: 100; 300; 1500; 2500; 3500µg/L para *P. cuvieri* e 300; 500; 1500; 2500; 3500; 4500µg/L para *P. gracilis*, e um controle sem adição de agrotóxico para cada espécie também com 30 girinos cada (Figuras 5 e 6).

A escolha das concentrações foi baseada na literatura e de acordo com valores de CL50 encontrados para anfíbios submetidos a ensaios com Glifosato (Lajmanovich 2003; Perez et al. 2011; Almeida 2014; Costa et al. 2014).

No início dos ensaios os girinos foram medidos e pesados. O comprimento total (CT) medido do rostro até o final da cauda dos girinos foi medido com paquímetro digital de 0.001mm de precisão e a massa em gramas foi registrada em balança analítica de precisão (0,0001g).



Figura 5 – Ensaio agudo de *Physalaemus cuvieri* expostos ao agrotóxico Roundup original® DI, Laboratório de Ecologia e Conservação da Universidade Federal Fronteira Sul, *campus* Erechim. Fonte: O autor.



Figura 6 – Ensaio agudo de *Physalaemus gracilis* expostos ao agrotóxico Roundup original®, DI, aeração artificial, Laboratório de Ecologia e Conservação da Universidade Federal Fronteira Sul, *campus* Erechim. Fonte: O autor.

Ensaio Crônico

As concentrações para exposição dos girinos nos ensaios crônicos, foram determinadas a partir da resolução CONAMA 357/2005, que determina qual o valor máximo de agrotóxicos é permitido para água doce e da portaria do Ministério da Saúde 2914/2011.

Em conformidade com a lei para águas de classe I são permitidos 65µg/L de Glifosato e para águas de classe III é permitido 280µg/L (Brasil - Conama 357/2005). As espécies em estudo convivem bem com ambientes parcialmente poluídos e ou poluídos, portanto, podem estar frequentemente relacionados as águas de classe III durante as épocas reprodutivas. (Barreto e Andrade 1995; Achaval e Olmos 2003; Lenhardt 2015). De acordo com a portaria do Ministério da Saúde 2914/2011, a concentração máxima permitida de Glifosato para água potável é 500µg/L. Para complementar, foram utilizadas as concentrações de 144µg/L; 700µg/L e 1000µg/L de Glifosato, encontradas em lagos e águas lânticas do Brasil e Argentina, (Mattos et al. 2002; Rodrigues e Almeida 2005; Peruzzo 2008; Dornelles 2013).

Desta maneira, nos ensaios crônicos semi – estáticos, foram testadas as concentrações 65; 144; 280; 500; 700; e 1000µg/L de Roundap Original DI, sendo utilizadas no total seis desovas para *P. cuvieri* e oito desovas para *P. gracilis*. Os girinos utilizados nos ensaios estavam entre os estágios 25-26 de acordo com a tabela de Gosner (1960), e permaneceram nos ensaios por 14 dias. Só foram submetidos aos ensaios girinos que estavam em condições de comportamento e mobilidade normais. Durante os 14 dias de ensaio os girinos foram alimentados diariamente, *ad libitum*. A água com os tratamentos químicos foi renovada a cada sete dias (considerando a meia vida do Glifosato de 7 a 8 dias; Jones et al. 2010) e os ensaios foram inspecionados diariamente, como nos ensaios agudos.

O delineamento experimental seguiu os mesmos padrões do ensaio agudo, porém foram utilizados 10 girinos por unidade experimental, de vidro extéril e cilíndrico com capacidade de 450ml de solução de Glifosato, com densidade de 1 girino para cada 45ml. Foram expostos 60 girinos por concentração testada e mais 60 girinos de controle, para cada espécie. Para medidas de comprimento e massa foram utilizados aleatoriamente 10 girinos do início do ensaio (primeiro dia) e 10 girinos do final do ensaio (14 dias). Para verificar diferenças entre as concentrações, foram medidos e pesados 10 girinos de cada concentração testada ao final do ensaio. O comprimento (CT) - rostro final da cauda dos girinos foi medido com paquímetro digital de 0.001mm de precisão no início e no final de ensaio, bem como foi obtida a massa em gramas, registrada em balança analítica de precisão (0,0001g). Os girinos de *P. cuvieri* expostos a estes ensaios tiveram CT de 9,59mm±2,11mm (7,61mm – 8,38mm) e massa de 0,014g ± 0,007g (0,0045g - 0,0085g) e *P. gracilis* apresentou CT de 9,934mm ± 1,5mm (8,3mm – 12,71mm) e massa de 0,023g ±0,009g (0,0045g – 0,0085g).

Alterações Morfológicas

Para análise de alterações morfológicas os girinos foram eutanasiados ao término dos ensaios, de acordo com o Guia Brasileiro de boas práticas para eutanásia de animais (Conselho Federal de Medicina Veterinária 2012), e posteriormente conservados em formol 5%, para análise morfológica. As alterações morfológicas foram analisadas a partir de nove parâmetros fenotípicos ou *endpoints*, baseados em Hu et al. (2015): Intestino (Edema e Morfologia); Anomalias oculares (Lente turva e Morfologia); Coluna (curvatura); Epitélio (Pigmentação); Corpo (Morfologia e Edema); Boca (Ausência de dentículos e morfologia dos lábios).

As alterações observadas foram analisadas a partir de um sistema de pontuação fenotípica de seis graus para cada fenótipo em uma escala de (0 - 5), onde estruturas anatômicas normais foram atribuídas uma pontuação de 0; a pontuação de 1 - 5 significam anormalidades com aumento de gravidade de acordo com a numeração, (1 - 2 = anormalidade leve, 3 = anormalidade moderada e 4 - 5 = anomalia grave; Hu et al. 2015). As análises foram realizadas visualmente, com o auxílio de um estereomicroscópio Nikon SMZ 745T, com sistema de imagem acoplado a um Tablet e iluminação com fibra ótica NI-30. Todas alterações morfológicas encontradas foram consideradas malformações.

Ensaios Crônicos: Estágio 28 Até Metamorfose

Os ensaios crônicos até metamorfose iniciaram no estágio 28-30 de acordo com a tabela de Gosner (1960). A partir deste estágio os girinos apresentam maior tamanho e mobilidade e inicia-se a formação de brotos para posteriores membros (Gosner 1960; Mcdiarmid e Altig 1999).

O período de exposição neste caso foi dependente do tempo em que os girinos levaram para completar a metamorfose. Durante estes ensaios foi analisada a sobrevivência, comportamento, duração de período larval, assim como o surgimento de alterações morfológicas dos girinos em resposta aos tratamentos experimentais em comparação com o grupo controle.

A metamorfose completa foi definida 24h após o aparecimento dos membros anteriores (etapa 43-44; Gosner 1960). Concluída a metamorfose os anfíbios foram eutanasiados de acordo com o Guia Brasileiro de boas práticas para eutanásia de animais (Conselho Federal de Medicina Veterinária 2012).

Para este estudo, os girinos foram expostos somente a concentração 280µg/L de Glifosato (Brasil - Conama 357/2005), pois esta é a concentração permitida em águas de classe III, o que combina com águas utilizadas pelas espécies deste estudo (e.g. Barreto e Andrade 1995; Achaval e Olmos 2003; Lenhardt 2015). Para *P. cuvieri* foram utilizados cinco girinos por unidade experimental, de vidro extéril e cilíndrico de 450ml, montados em sextuplicata totalizando 30 girinos expostos a concentração e um controle com 10 girinos. Para *P. gracilis* foram utilizados cinco girinos por unidade experimental, de vidro extéril e cilíndrico, com capacidade para 450ml, em triplicata, totalizando 15 girinos expostos e um controle com cinco girinos. A quantidade de girinos expostos se refere a disponibilidade de indivíduos em estágio 28, que poderiam ser colocados em ensaio. Foi feito monitoramento a cada 24h e a água com a solução química foi trocada a cada 7 dias.

ANÁLISE DE DADOS

Os resultados dos ensaios de toxicidade aguda foram analisados no programa GBasic, pelo método Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton et al. 1977). A toxicidade aguda foi avaliada a partir da CL₅₀ (Concentração Letal Média), concentração capaz de causar mortalidade a 50% da população em ensaio. Para avaliar o efeito das diferentes concentrações de Glifosato nos ensaios agudo e crônico foi utilizada análise de variância (ANOVA), seguida do ensaio post-hoc Tukey ou Dunnett's, quando $p < 0,05$.

A maior Concentração de Efeito Não Observado (NOAEC - No Observed Adverse Effect Concentration) e a menor Concentração de Efeito Observado (LOAEL – Lowest Observed Adverse Effect Level) foram determinadas para os efeitos de malformação e mortalidade no ensaio crônico. Para NOAEC e LOAEL a normalidade dos dados foi avaliada pelo ensaio de Shapiro Wilks e a homogeneidade das variâncias foi testada por Bartlett. Para ensaio de hipóteses utilizou-se ANOVA seguida do ensaio de Dunnett's para comparar as médias de cada tratamento com o controle. Também foi determinada a Máxima Concentração Aceitável de Toxicante (MATC - Maximum Acceptable Toxicant Concentration), que é a média aritmética de NOAEC e LOAEL. Foi utilizado nível de confiança de 95% e o software Statistica 8.

Avaliação De Risco Ecológico

Para a avaliação de risco ecológico, foi utilizada a abordagem de quociente de risco (HQ - hazard quotient), que foi calculada como EEC / LC50 de letalidade (onde EEC se refere a concentração ambiental estimada = EEC - Estimated Environmental Concentration

e LC 50 = CL50). A EEC foi obtida a partir da literatura, como a máxima concentração estimada de Glifosato no ambiente. Após o cálculo do quociente de risco agudo, foi comparado com o nível de preocupação da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA - United States Environmental Protection Agency). A agência usa um parâmetro de nível de preocupação, o LOC (Level of concern) como uma ferramenta de política para interpretar e analisar o risco potencial para organismos não-alvo, onde a presunção de risco agudo para animais aquáticos é LOC = 0,5 (alto risco) (USEPA 2016).

Para os ensaios crônicos, o risco ecológico foi avaliado utilizando a mesma abordagem de quociente de risco (HQ), onde EEC / NOAEC (USEPA 1998), sendo a EEC proveniente da literatura e NOAEC a Concentração de Efeito Não Observado (no observable-effect concentration, NOAEC). Após calcular o coeficiente de risco, foi comparado ao nível de preocupação da USEPA (LOC). Neste caso, o valor LOC para risco é 1. Se o HQ > 1, os efeitos prejudiciais são prováveis devido ao contaminante em questão (USEPA 2016).

RESULTADOS

Ensaio agudo

A formulação comercial de Glifosato Roundup original DI, foi mais tóxica para *P. cuvieri* ($CL_{50-96h} = 1360\mu g/L$) do que para *P. gracilis* ($CL_{50-96h} = 1530\mu g/L$) (Tabela 1). A mortalidade das duas espécies foi significativa em relação ao tempo, ou seja, quanto maior o tempo de exposição, maior a mortalidade de *P. cuvieri* ($F_{(3,20)} = 9,81$; $p < 0,01$ significativa em 96h, Tukey = $p < 0,01$) e *P. gracilis* ($F_{(3,20)} = 4,42$; $p < 0,05$, significativa a partir das 24h, Tukey = $p < 0,01$) (Figura 7 e 8; Tabela 1).

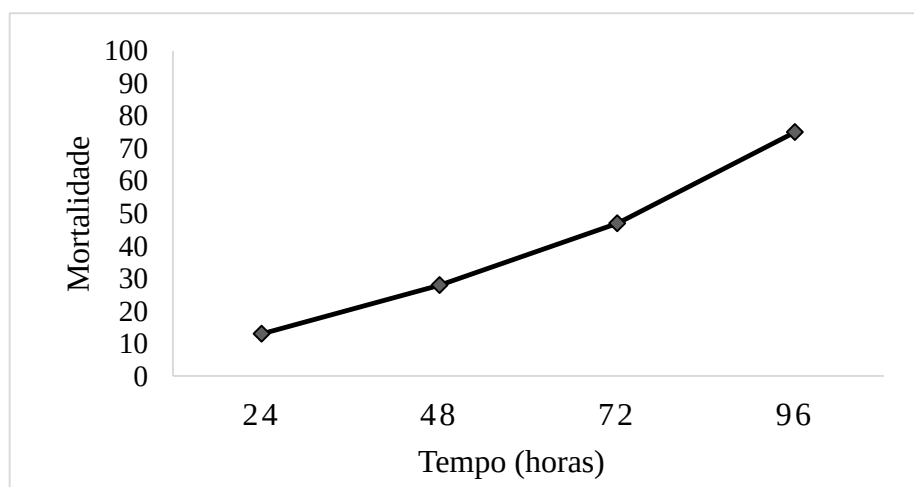


Figura 7 – Mortalidade de girinos de *Physalaemus cuvieri* expostos a concentrações de Glifosato de 24 a 96 horas.

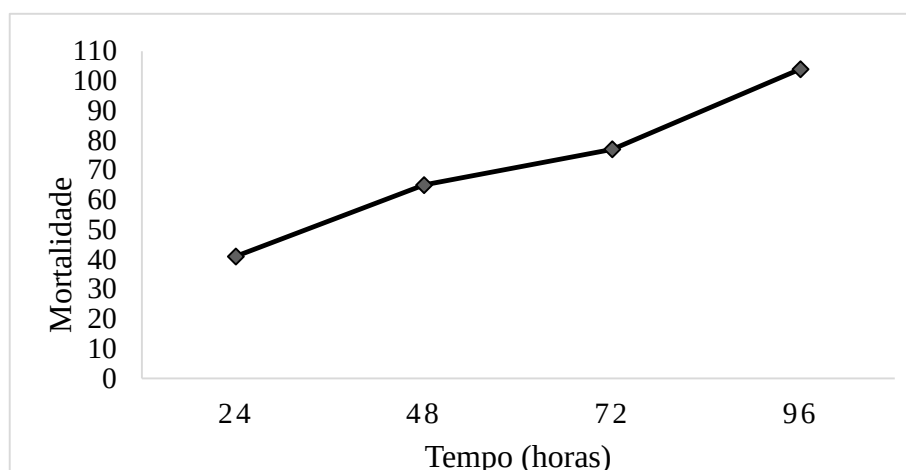


Figura 8 – Mortalidade de girinos de *Physalaemus gracilis* expostos a concentrações de Glifosato de 24 a 96 horas.

Tabela 1 – Mortalidade de girinos de *Physalaemus cuvieri* e *Physalaemus gracilis* submetidos ao ensaio agudo, em relação ao tempo de exposição a formulação comercial de Glifosato.

Espécie	Concentração (µg/L)	Mortalidade				Mort. (%)	Total	CL50 (µg/L)
		24h	48h	72h	96h			
<i>Physalaemus cuvieri</i>	100	0	0	0	4	13%	4	1360µg/L
	300	0	0	1	8	30%	9	-95%
	1500	0	1	1	10	40%	12	CL: 930µg/L
	2500	3	7	9	5	80%	24	+ 95%
	3500	10	7	8	1	87%	26	CL:1980µg/L
Mortalidade Total		13	15	19	28		75	
<i>Physalaemus gracilis</i>	300	0	0	0	1	3%	1	1530µg/L
	400	0	0	0	7	23%	7	-95%
	1500	0	0	2	13	50%	15	CL:
	2500	6	12	4	2	80%	24	1220µg/L
	3500	13	6	4	4	81%	27	+ 95%
	4500	22	6	2	0	100%	30	CL:1910µg/L
Mortalidade Total		41	24	12	27		104	

A mortalidade foi significativa em relação a concentração a partir de 1500µg/L, para *P. cuvieri* ($F_{(4, 25)} = 5,97$; $p < 0,01$, significativa Tukey = $p < 0,05$) e *P. gracilis*, a partir de 2500µg/L ($F_{(5, 30)} = 13,91$; $p < 0,01$, Tukey = $p < 0,05$), (Figuras 9 e 10). O controle não teve mortalidade.

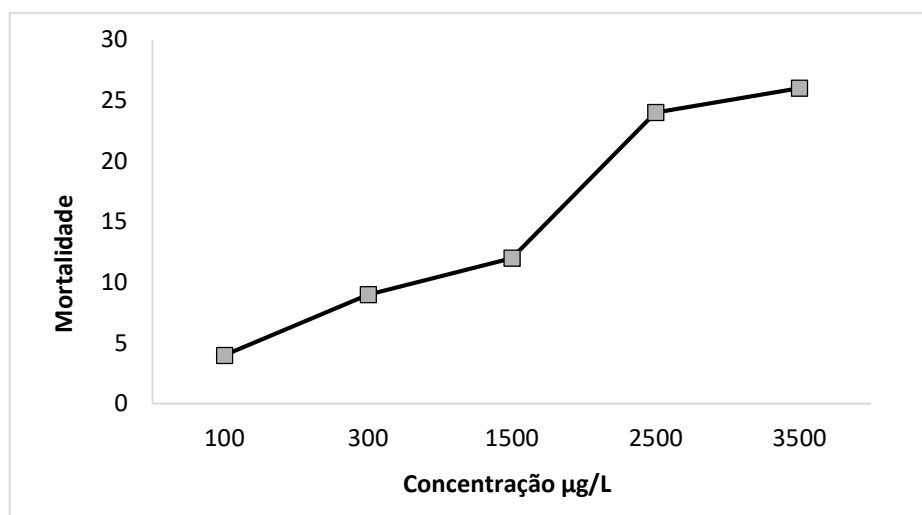


Figura 9 – Mortalidade de girinos de *Physalaemus cuvieri* expostos a concentrações de Glifosato em ensaio agudo.

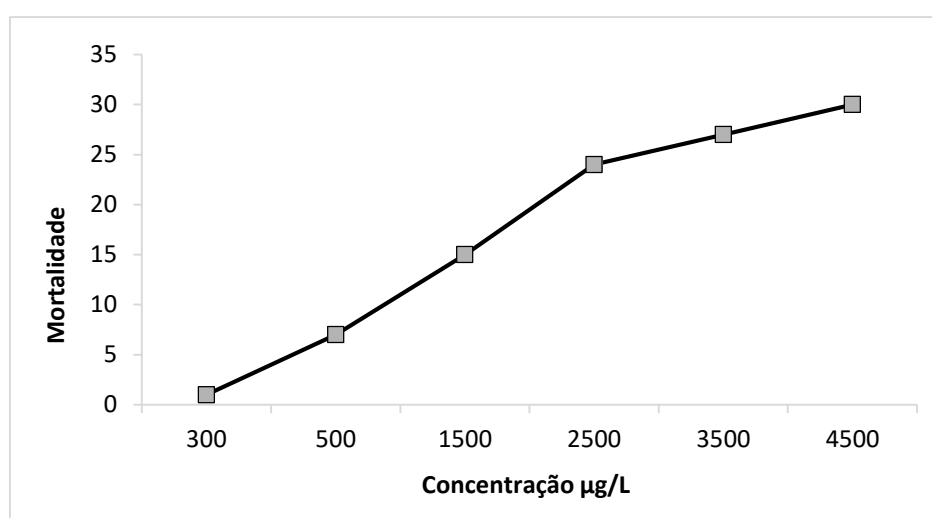


Figura 10 – Mortalidade de girinos de *Physalaemus gracilis* expostos a concentrações de Glifosato em ensaio agudo.

Ensaio crônicos

Ensaio subletais de 14 dias

A mortalidade foi significativa em relação as concentrações testadas para *P. cuvieri* ($F_{(5, 30)} = 7,87$; $p < 0,01$) e para *P. gracilis* ($F_{(5, 30)} = 9,74$; $p < 0,01$, ambos os ensaios foram significativos em $280\mu\text{g/L}$, Tukey = $p < 0,01$) (Figuras 11 e 12).

No controle de *P. cuvieri* ocorreu mortalidade de 8,3% (5 indivíduos) e no controle de *P. gracilis* não ocorreu mortalidade (Tabela 2).

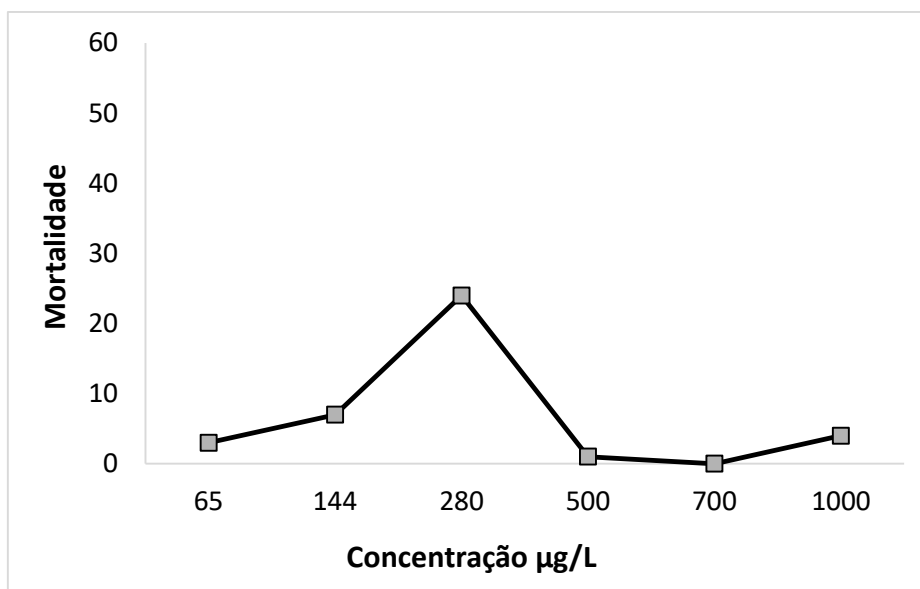


Figura 11 – Mortalidade de girinos de *Physalaemus cuvieri* expostos a diferentes concentrações de Glifosato em ensaio crônico, com mortalidade significativa em 280µg/L.

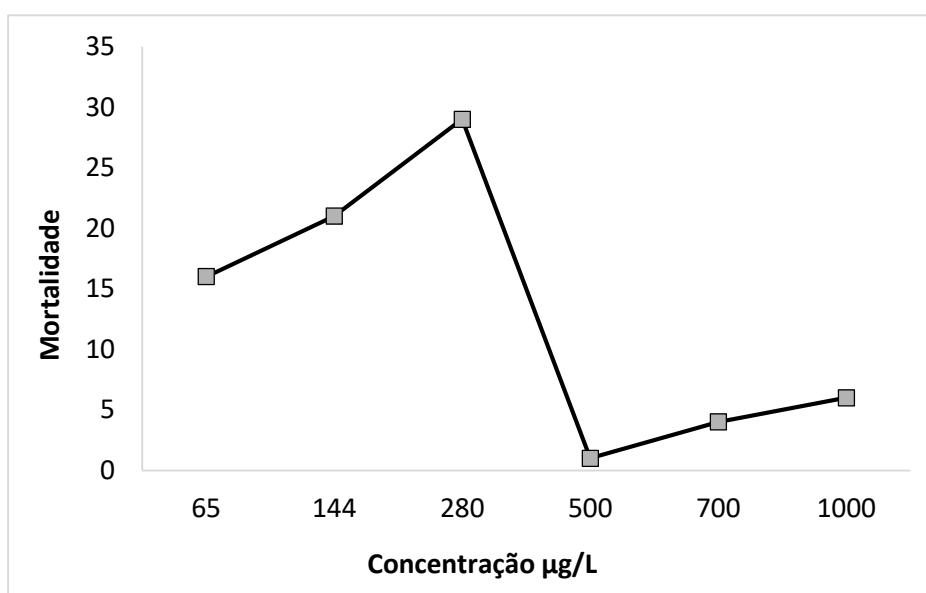


Figura 12 – Mortalidade de girinos de *Physalaemus gracilis* expostos a diferentes concentrações de Glifosato em ensaio crônico, com mortalidade significativa em 280µg/L.

Tabela 2 – Mortalidade de girinos de *Physalaemus cuvieri* e *Physalaemus gracilis* expostos a formulação comercial de Glifosato por 14 dias.

	Concentração µg/L	Nº expostos	Nº de vivos	Nº de mortos	Mortalidade (%)
<i>P. cuvieri</i>	Controle	60	60	0	0
	65	60	57	3	5
	144	60	53	7	12
	280	60	36	24	40
	500	60	59	1	2
	700	60	60	0	0
	1000	60	56	4	7
<i>P. gracilis</i>	Controle	60	55	5	8
	65	60	44	16	27
	144	60	39	21	35
	280	60	31	29	48
	500	60	59	1	2
	700	60	56	4	7
	1000	60	54	6	10

Em relação ao tempo de exposição a mortalidade foi significativa para os girinos de ambas as espécies (*P. cuvieri*: $F_{(13, 70)} = 4,11$; $p < 0,01$, *P. gracilis*: $F_{(13, 70)} = 5,30$; $p < 0,01$, significativa a partir das 48h de exposição para as duas espécies, Tukey = $p < 0,05$) (Figuras 13 e 14).

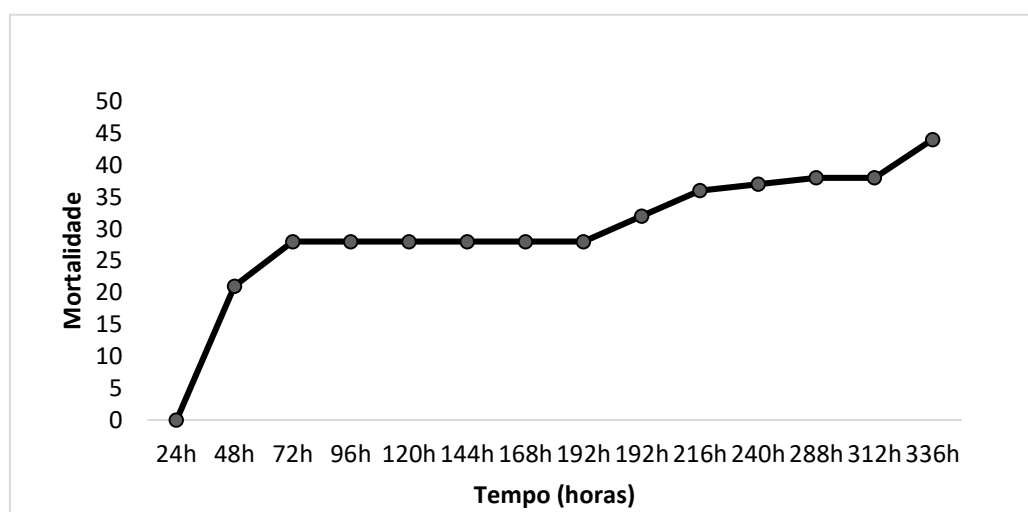


Figura 13 – Mortalidade de girinos de *Physalaemus cuvieri* expostos a diferentes concentrações de Glifosato em ensaio crônico em relação ao tempo de exposição.

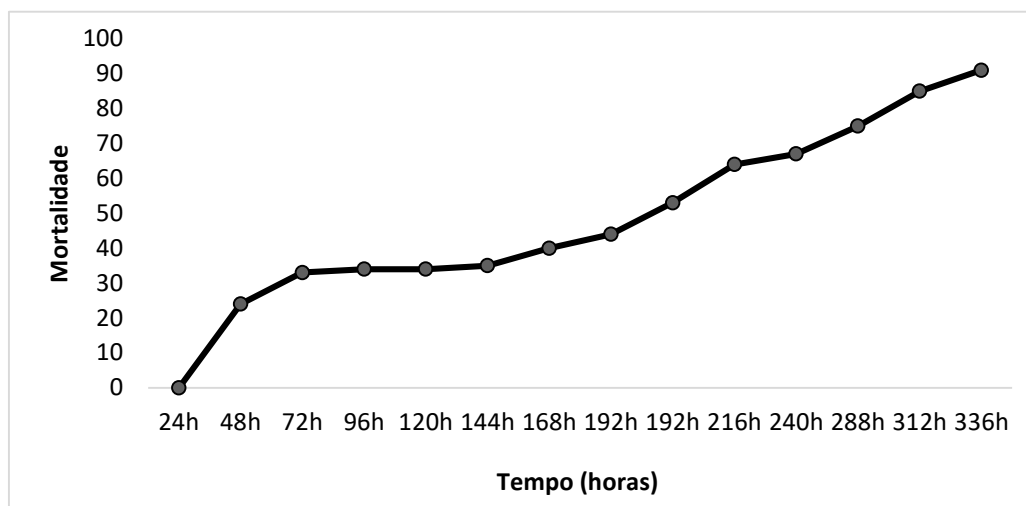


Figura 14 –Mortalidade de girinos de *Physalaemus gracilis* expostos a diferentes concentrações de Glifosato em ensaio crônico em relação ao tempo de exposição.

Comprimento e massa

Os girinos de *P. cuvieri* iniciaram os ensaios crônicos medindo em média $9,59\text{mm} \pm 2,11\text{mm}$ de comprimento total (amplitude = $7,61\text{mm} - 9,72\text{mm}$, $n = 10$) e pesando em média $0,014\text{g} \pm 0,007\text{g}$ ($0,0045\text{g} - 0,0085\text{g}$). Girinos de *P. gracilis* no início dos ensaios tinham comprimento de $9,93\text{mm} \pm 1,56\text{mm}$, (amplitude = $8,3\text{mm} - 12,71\text{mm}$, $n = 10$) e massa de $0,023\text{g} \pm 0,009\text{g}$ ($0,0045\text{g} - 0,0085\text{g}$).

Houve diferença significativa em relação ao comprimento (mm) dos girinos no início e no final dos ensaios crônicos (*P. cuvieri* = $F_{(1, 18)} = 16,335$, $p < 0,01$ e *P. gracilis* = $F_{(1, 18)} = 9,4942$, $p < 0,01$). Durante os ensaios os girinos expostos ao Glifosato tiveram tamanho final menor em relação ao controle (*P. cuvieri* = $F_{(6, 63)} = 14,075$, $p < 0,01$ significativa em $280\mu\text{g/L}$, Dunnett's $p < 0,05$; *P. gracilis* $F_{(6, 63)} = 5,0013$, $p < 0,05$ significativa em 144 e $280\mu\text{g/L}$ Dunnett $p < 0,01$). Com relação às concentrações testadas, os girinos também apresentaram diferenças de tamanho significativa (*P. cuvieri* = $F_{(5, 54)} = 17,535$, $p < 0,01$ significativo a partir de $500\mu\text{g/L}$ Tukey $p < 0,01$ (Figura 15; Tabela 3); *P. gracilis* = $F_{(5, 54)} = 4,9550$, $p < 0,01$, significativo a partir da concentração $700\mu\text{g/L}$ Tukey $p < 0,05$ (Figura 16; Tabela 3).

Em relação a massa (g), houve diferença significativa dos girinos no início e no final do ensaio, em ambas as espécies (*P. cuvieri* = $F_{(1, 18)} = 9,9166$, $p < 0,01$ e *P. gracilis* = $F_{(1, 18)} = 14,672$, $p < 0,01$).

Durante os ensaios ocorreram diferenças significativas na massa (g) dos girinos expostos, em relação ao controle, (*P. cuvieri* = $F_{(6, 63)} = 4,7148$, $p < 0,01$; *P. gracilis* $F_{(6, 63)} = 3,0977$, $p < 0,05$) ambas as espécies significativas em $280\mu\text{g/L}$ (*P. cuvieri* Dunett $p < 0,01$) (*P. gracilis* Dunett $p < 0,05$), (Figuras 17 e 18; Tabela 4).

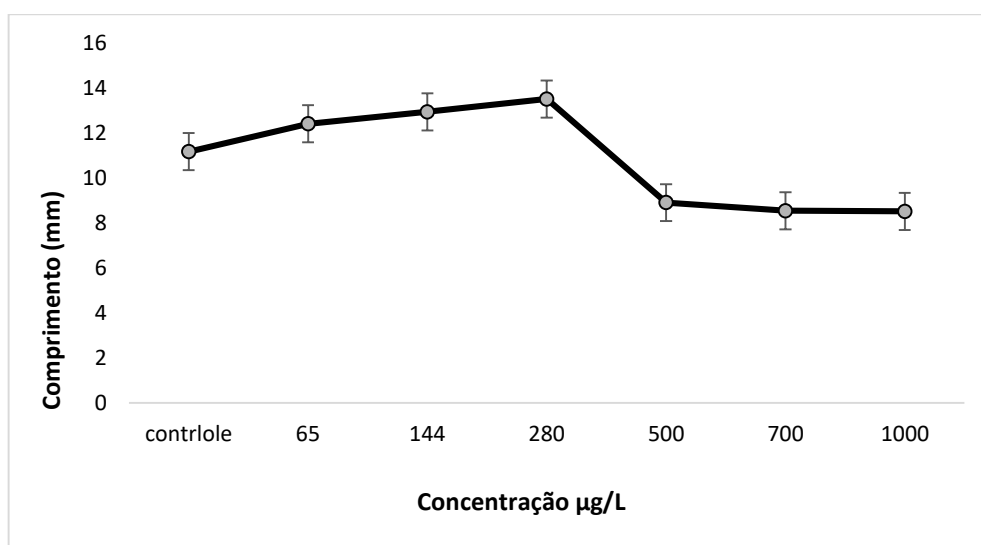


Figura 15 – Comprimento dos girinos (mm) de *Physalaemus cuvieri* após 14 dias de ensaio expostos a diferentes concentrações de Glifosato. Pontos são médias e linhas verticais se referem as barras de erro.

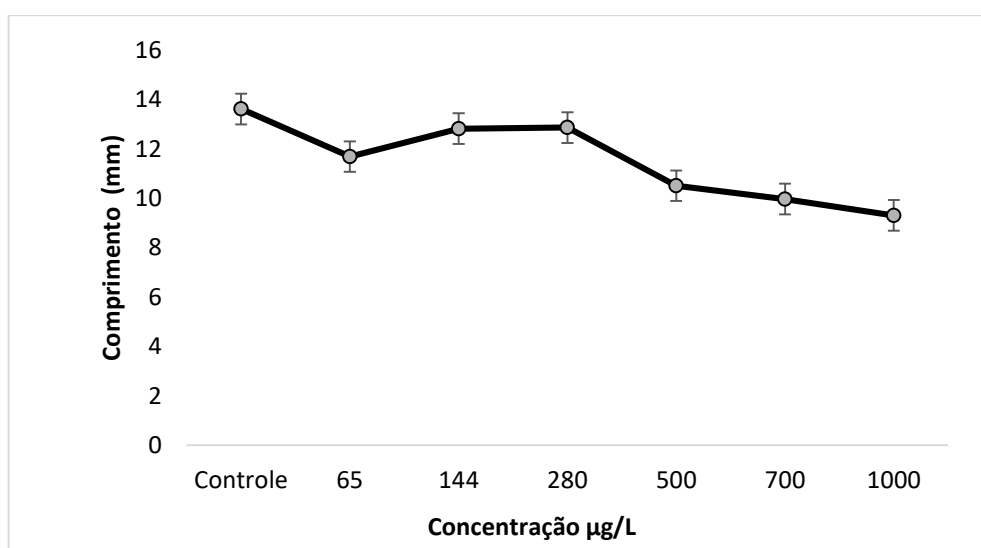


Figura 16 – Comprimento dos girinos (mm) de *Physalaemus gracilis* após 14 dias de ensaio expostos a diferentes concentrações de Glifosato. Pontos são médias e linhas verticais se referem as barras de erro.

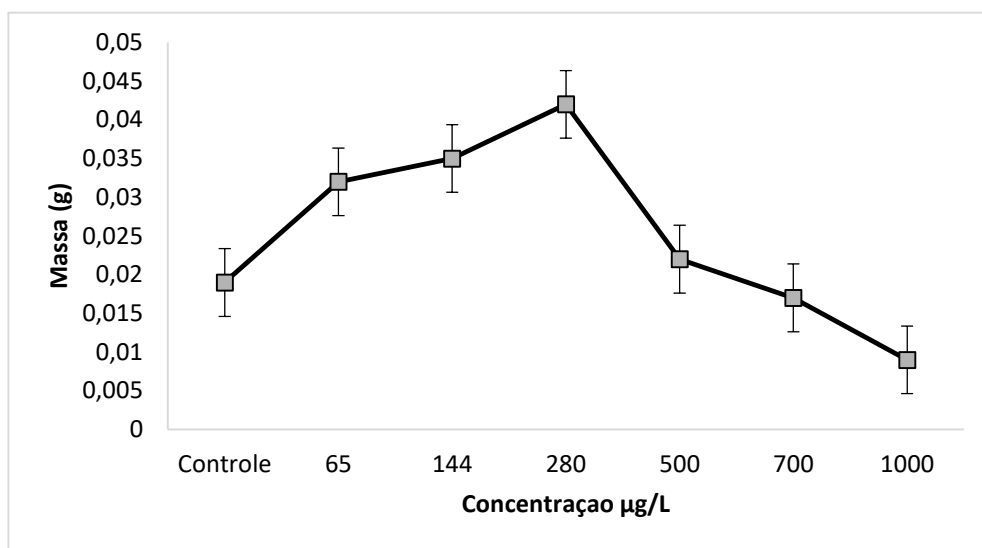


Figura 17 – Massa (g) dos girinos de *Physalaemus cuvieri* após 14 dias de ensaio expostos a diferentes concentrações de Glifosato. Pontos são médias e linhas verticais se referem as barras de erro.

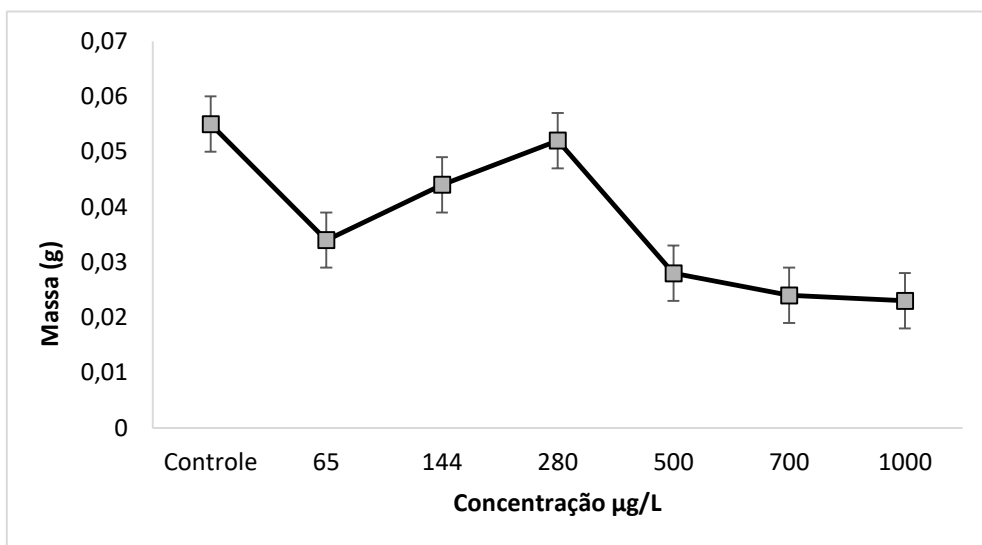


Figura 18 – Massa (g) dos girinos de *Physalaemus gracilis* após 14 dias de ensaio expostos a diferentes concentrações de Glifosato. Pontos são médias e linhas verticais se referem as barras de erro.

Entre as concentrações para *P. cuvieri* ocorreram diferenças significativas de massa (g) ($F_{(5, 54)} = 4,7405$, $p < 0,01$, significativa a partir de $700 \mu\text{g/L}$ Tukey $p < 0,05$); mas *P. gracilis* não apresentou diferença significativa entre as concentrações $F_{(5, 54)} = 2,5920$, $p > 0,05$ Tukey $p > 0,05$).

Tabela 3 – Média, desvio padrão e amplitude do comprimento (mm) e massa (g) de girinos de *Physalaemus cuvieri*, no início e no final dos 14 dias de ensaio.

Espécie	Parâmetro	Concentração	N	Média ± DP	Min - Max
	Entrada nos ensaios comp. (mm)		10	9,59 ± 2,11	7,23 - 14,38
<i>Physalaemus cuvieri</i>	Final dos ensaios Comprimento (mm)	Controle 0µg/L	10	11,19 ± 2,05	6,78 - 13,48
		65µg/L	10	12,43 ± 1,61	9,20 - 14,26
		144µg/L	10	12,96 ± 2,45	9,26 - 16,52
		280µg/L	10	13,53 ± 2,23	9,21 - 16,18
		500µg/L	10	8,92 ± 1,65	7,01 - 12,25
		700µg/L	10	8,56 ± 1,12	6,71 - 10,68
		1000µg/L	10	8,53 ± 1,36	6,57 - 10,11
	Entrada nos ensaios massa (g)		10	0,014 ± 0,007	0,007 – 0,035
	Final dos ensaios Massa (g)	Controle 0µg/L	10	0,019 ± 0,008	0,016 - 0,042
		65µg/L	10	0,032 ± 0,01	0,017 - 0,64
		144µg/L	10	0,035 ± 0,01	0,011 - 0,066
		280µg/L	10	0,042 ± 0,01	0,013 - 0,068
		500µg/L	10	0,022 ± 0,03	0,005 - 0,10
		700µg/L	10	0,017 ± 0,015	0,003 - 0,055
		1000µg/L	10	0,009 ± 0,003	0,028 - 0,014

Tabela 4 – Comprimento (mm) e massas (g) em média dos girinos de *Physalaemus gracilis*, no início e no final dos 14 dias de ensaio.

Espécie	Parâmetro	Concentração	N	Média ± DP	Min - Max
	Entrada dos ensaios comp. (mm)		10	9,93±1,56	8,32 - 12,31
<i>Physalaemus gracilis</i>	Final dos ensaios Comprimento (mm)	Controle	10	13,62 ± 1,55	7,71 - 13,57
		65µg/L	10	11,69 ± 2,20	8,61 - 16,45
		144µg/L	10	12,82 ± 2,78	9,12 - 17,13
		280µg/L	10	12,87 ± 2,58	9,02 - 17,39
		500µg/L	10	10,51 ± 1,74	6,64 - 12,40
		700µg/L	10	9,97 ± 1,41	6,78 - 11,45
		1000µg/L	10	9,31 ± 1,69	6,52 - 12,33
	Entrada nos ensaios massa (g)		10	0,015±0,006	0,009 - 0,028
	Final dos ensaios Massa (g)	Controle	10	0,055 ± 0,010	0,012 - 0,049
		65µg/L	10	0,034 ± 0,023	0,012 - 0,090
		144µg/L	10	0,044 ± 0,030	0,019 - 0,10
		280µg/L	10	0,052 ± 0,029	0,022 - 0,10
		500µg/L	10	0,028 ± 0,029	0,086 - 0,089
		700µg/L	10	0,024 ± 0,007	0,031 - 0,086
		1000µg/L	10	0,023 ± 0,022	0,014 - 0,036

Alterações Morfológicas – Malformações

A ocorrência de malformações nos indivíduos expostos a formulação comercial de Glifosato foi significativa em relação ao controle. Quanto maior foi a concentração exposta, maior a quantidade de alterações morfológicas, em todas as concentrações para *P. cuvieri* ($F_{(6,35)}=10,003$; $p<0,01$, Dunnett's $p<0,05$) e a partir de $144\mu\text{g/L}$ para *P. gracilis* ($F_{(6,35)}=4,37$; $p<0,01$, Dunnett's $p<0,01$; Figuras 19 e 20).

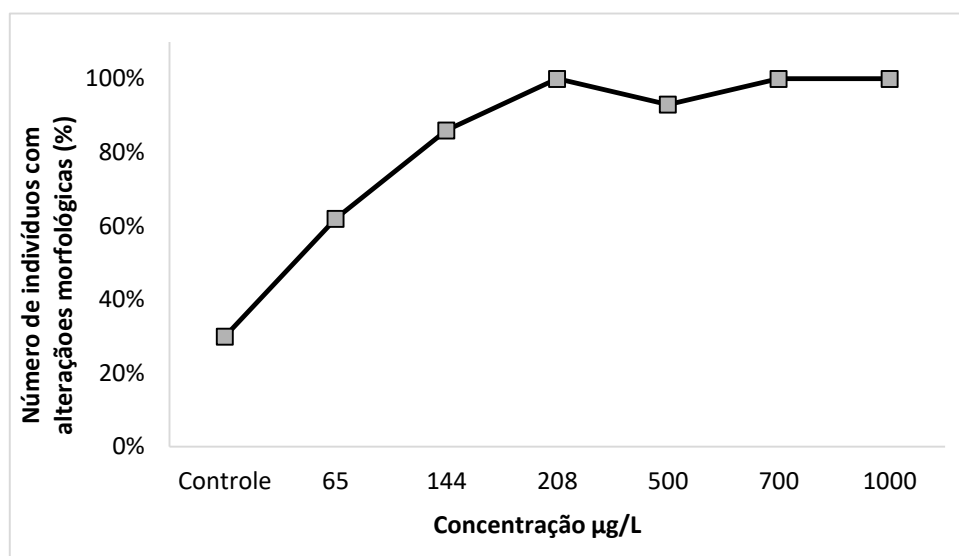


Figura 19 – Ocorrência de Alterações morfológicas em *Physalaemus cuvieri* expostos a diferentes concentrações de Glifosato, comparados ao controle.

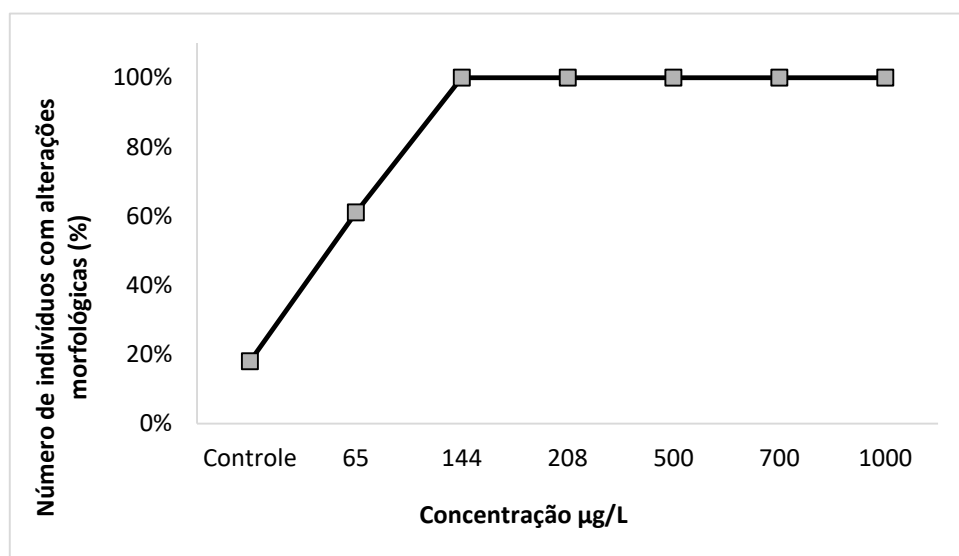


Figura 20 – Ocorrência de Alterações morfológicas em *Physalaemus gracilis* expostos a diferentes concentrações de Glifosato, comparados ao controle.

As análises das alterações morfológicas foram classificadas em seis scores (0 a 5) de acordo com a gravidade das alterações. A medida que se aumentaram as concentrações de Glifosato nos ensaios, aumentou também a gravidade (Scores) das malformações tanto para *P. cuvieri* como para *P. gracilis*, passando de sem alteração (0) à leves (1-2) nas primeiras concentrações, para moderadas (3) a graves (4-5) nas ultimas concentrações (Figuras 21, 22 e 23).

Figura 21 – Tendência dos “Scores” para as Alterações Morfológicas analisadas em *Physalaemus cuvieri*, relacionados com as concentrações de Glifosato testadas.

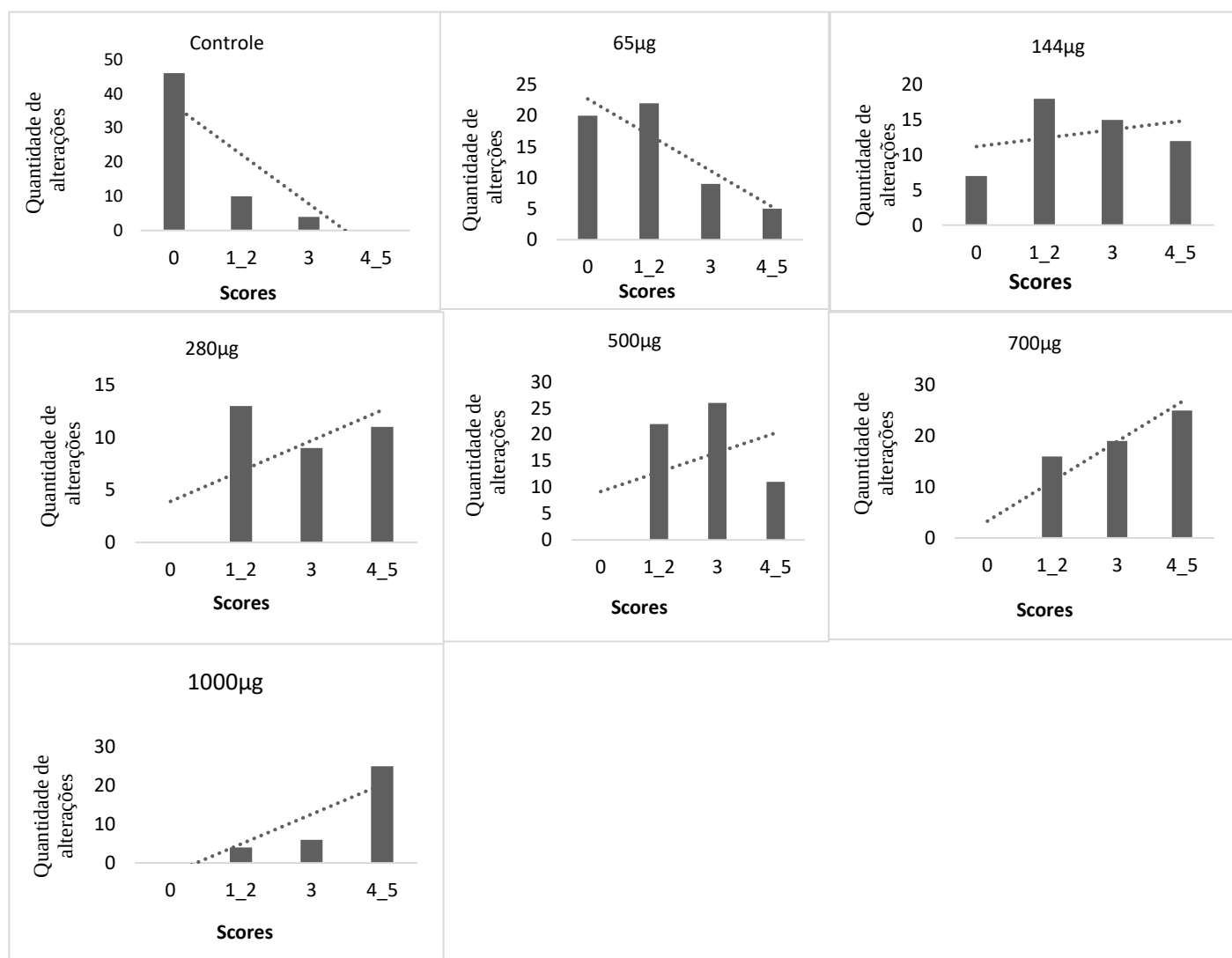


Figura 22 – Tendência dos “Scores” para as Alterações Morfológicas analisadas em *Physalaemus gracilis*, relacionados com as concentrações de Glifosato testadas.

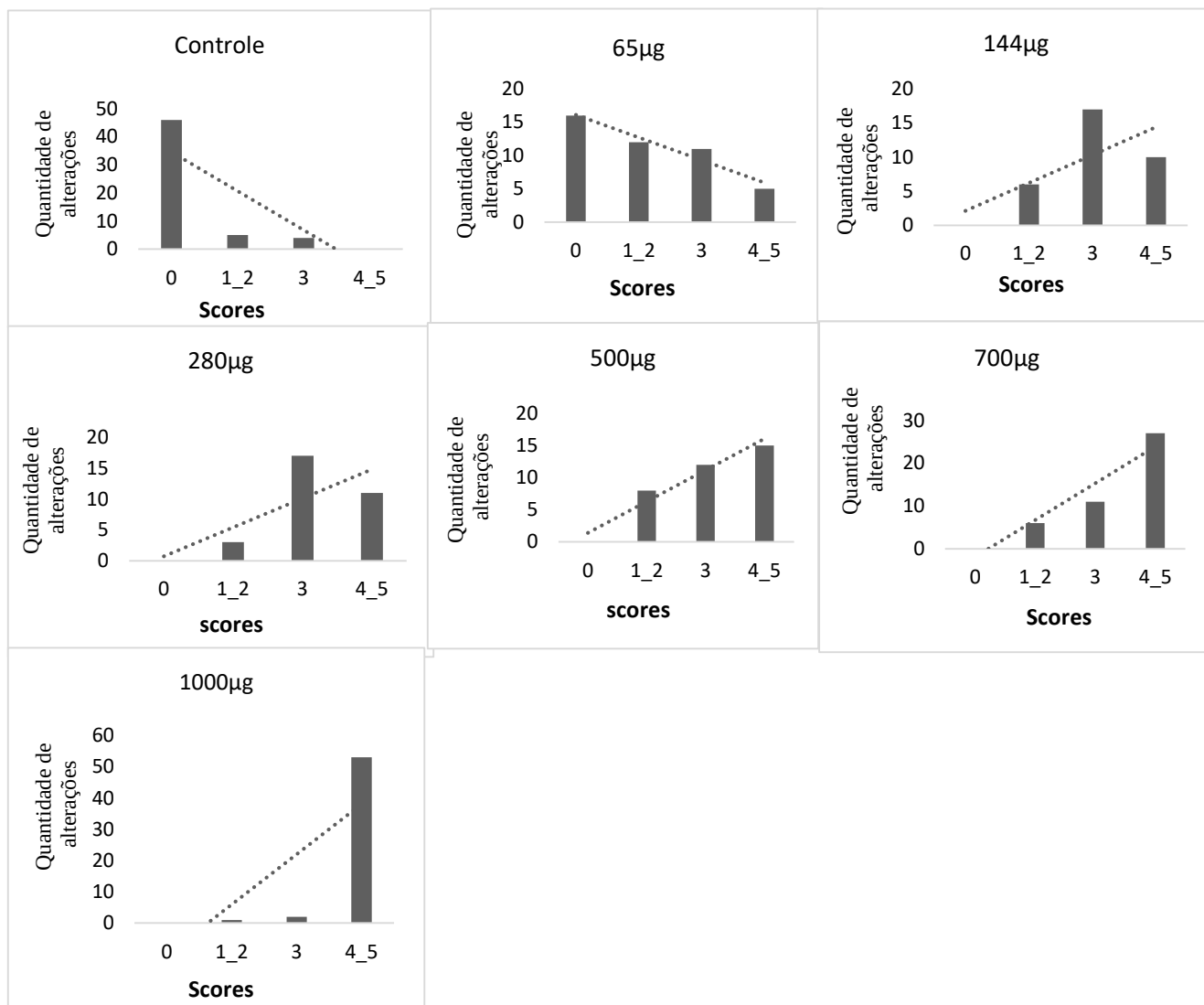
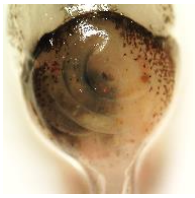
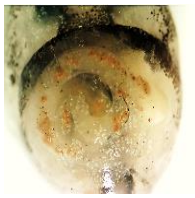
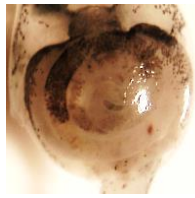
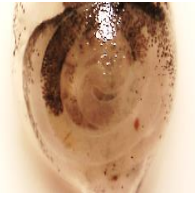
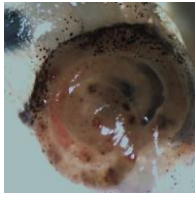
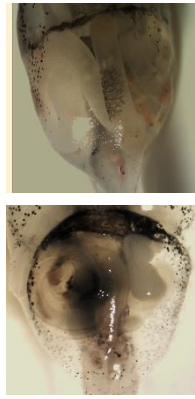
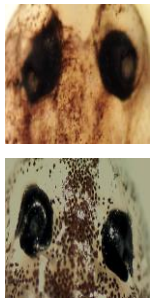
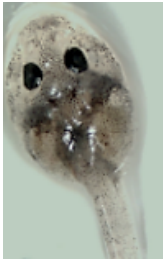
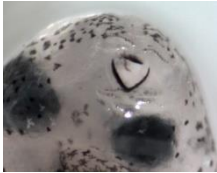
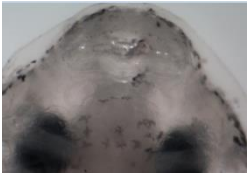


Figura 23 – Classificação das de Alterações Morfológicas (Endpoints) por quatro níveis de “scores”, observados em girinos de *P. cuvieri* e *P. gracilis*, expostos a diferentes concentrações da formulação comercial de Glifosato.

Endpoints	Scores			
	0	1-2	3	4-5
Edema de intestino				
Morfologia do intestino				
Lente turva do olho				
Morfologia do olho				

Cor do epitélio				
Edema do corpo				
Morfologia do corpo				
Desvios na coluna				
Boca				

As malformações mais frequentes para *P. cuvieri* foram alterações na boca (285 indivíduos); Cor do epitélio (230 indivíduos); e Edema de intestino (222 indivíduos). Para *P. gracilis* as malformações mais frequentes foram alterações na boca (209 indivíduos), morfologia do corpo (159 indivíduos) e cor do epitélio (147 indivíduos; Figura 24).

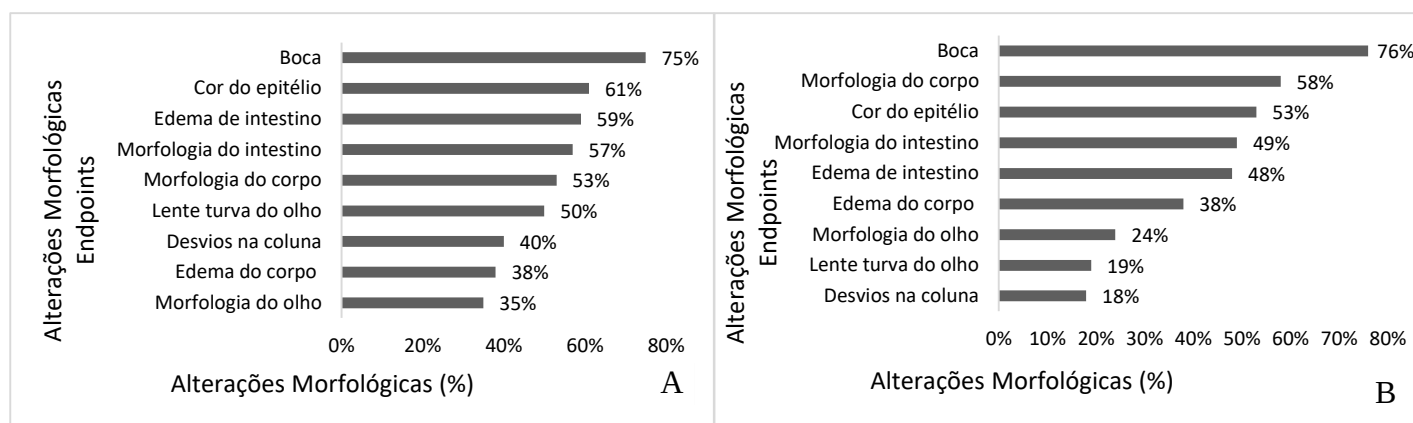


Figura 24 – Porcentagem de cada malformação observada em *Physalaemus cuvieri* (A) e *Physalaemus gracilis* (B) expostos a diferentes concentrações de Glifosato por 14 dias. As porcentagens foram calculadas a partir do número de indivíduos que apresentaram a malformação.

Ensaio Crônicos: Estágio 28 até metamorfose

O tempo de desenvolvimento necessário para completar a metamorfose foi diferente para cada espécie. Em *P. cuvieri*, foi necessário entre 18 e 32 dias, permanecendo em ensaio por 80 dias e *P. gracilis* entre, 15 e 22, dias permanecendo em ensaio por 63 dias. Contando o primeiro e o último indivíduo do ensaio apresentar pernas dianteiras.

Alguns indivíduos expostos apresentaram alterações morfológicas nas pernas traseiras, como pernas atrofiadas esticadas e/ou encolhidas e sem movimentação. Em *P. cuvieri* foram 43% (13 indivíduos) e em *P. gracilis*, 27% (4 indivíduos; Figura 25 - A, B, C, D e E).

Nas duas espécies, 20% dos indivíduos testados apresentaram tortuosidades observadas na base ou final da cauda (Figura 25 - C e D). Em decorrência destas alterações, os girinos nadavam com dificuldades. O controle não apresentou nenhum tipo de alteração morfológica.

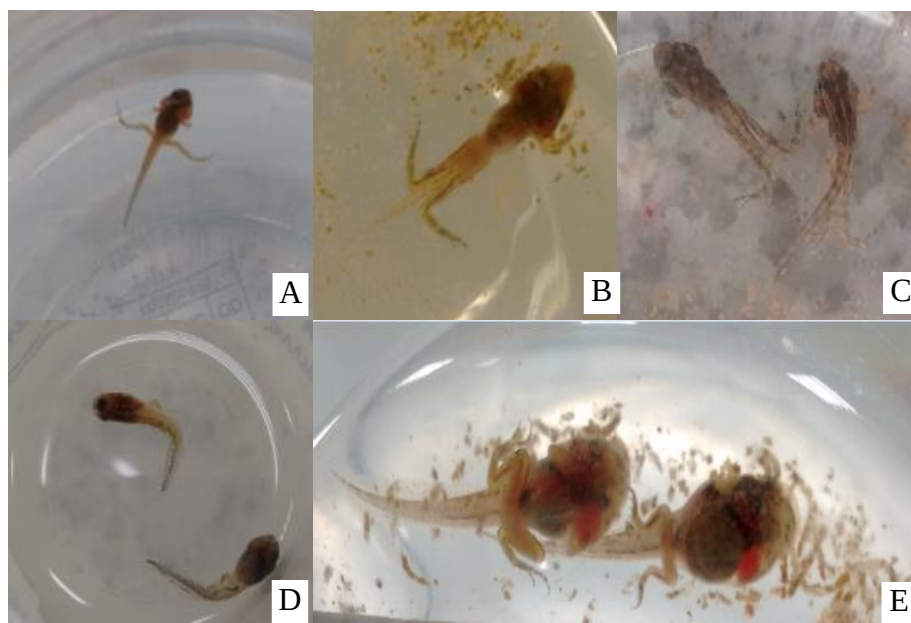


Figura 25 – Alterações Morfológicas observadas em girinos de *P. cuvieri* e *P. gracilis* A) Pernas atrofiadas abertas sem movimentação de um exemplar de *P. cuvieri*; B) Pernas atrofiadas sem movimentação, juntas ao corpo e esticadas, exemplar de *P. cuvieri*; C) Cauda torta de um exemplar de *P. cuvieri*; D) Cauda torta de dois exemplares de *P. gracilis*; E) Pernas atrofiadas dobradas e sem movimentação em exemplares de *P. cuvieri*.

Para as duas espécies, o tempo necessário para completar o desenvolvimento metamórfico, foi diferente entre os indivíduos do controle e os indivíduos expostos a concentração 280µg/L de Glifosato (*P. cuvieri* = $F_{(1, 31)} = 85,781$, $p < 0,01$ e *P. gracilis* = $F_{(1, 12)} = 5,4663$, $p < 0,05$). O controle para ambas as espécies concluiu a metamorfose com uma média de 8 dias a menos do que os indivíduos expostos ao Glifosato (Figura 26).

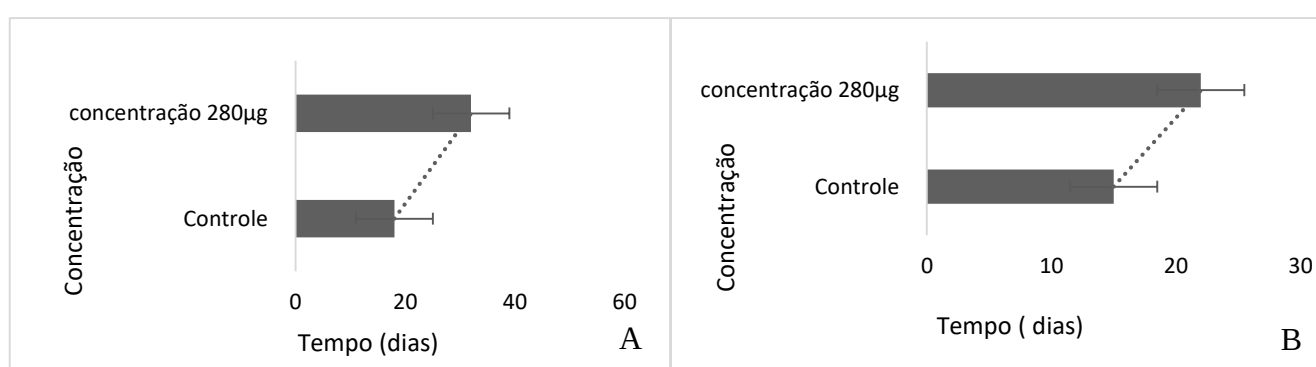


Figura 26 – Diferenças entre o controle e os girinos expostos a concentração 280µg/L com relação ao tempo necessário para completar a Metamorfose. (A) *Physalaemus cuvieri* e (B) *Physalaemus gracilis*.

A fase pró metamórfica demorou mais tempo para iniciar no controle, porém, após iniciar foi mais rápida, enquanto que os girinos expostos ao toxicante iniciaram a fase pró

metamórfica antes do controle e permaneceram nesta fase e na fase de clímax metamórfico por mais tempo (Tabela 5).

Tabela 5 – Estágios de Desenvolvimento dos girinos de *Physalaemus cuvieri* e *Physalaemus gracilis*, diferenças de estágio entre o controle e expostos a 280µg/L de Glifosato.

<i>Physalaemus cuvieri</i> Estágio de Gosner (1960)			<i>Physalaemus gracilis</i> Estágio de Gosner (1960)		
Tempo (Semanas)	Controle	280µg/L	Tempo (Semanas)	Controle	280µg/L
1	27- 28	27 - 28	1	27- 28	27 - 28
2	27-28	28	2	27-28	28
3	27- 28	30	3	27- 28	30
4	29	30	4	29	30
5	30	36	5	30	36-39
6	36	39	6	36-39	39
7	36-39	42	7	39-42	42
8	42	42	8	43	42-43
9	43	42	9		43
10		42-43			
11		43			

Análise De Risco Ecológico

O Quociente de risco (HQ) agudo para *P. cuvieri* foi 0,62 e para *P. gracilis* foi 0,70 acima da LOC = 0,5. Na Análise de Risco crônico, todos os HQ calculados foram acima de LOC>1 (Tabela 6).

A Máxima Concentração Aceitável para o Toxicante (MATC) calculada para malformações variou de 104 µg/L a 850 µg/L (Tabela 6).

Tabela 6 – Valores de NOAEC, LOAEL, MATC e Risco crônico ecológico (HQ) para mortalidade e alterações morfológica observada de cada espécie.

	NOAEC (µg/L)	LOAEL(µg/L)	MATC(µg/L)	(HQ)
<i>Physalaemus cuvieri</i>				
Mortalidade	65	144	104	33,2
Boca	65	144	104	33,2
Cor do epitélio	65	144	104	33,2
Edema de intestino	65	144	104	33,2
Lente turva do olho	65	144	104	33,2
Morfologia do corpo	65	144	104	33,2
Morfologia do intestino	144	280	212	15,0
Edema do corpo	500	700	600	4,3
Desvios na coluna	700	1000	850	3,1
Morfologia do olho	700	1000	850	3,1
<i>Physalaemus gracilis</i>				
Mortalidade	144	280	212	15
Boca	65	144	104	33,2
Cor do epitélio	65	144	104	33,2
Morfologia do corpo	65	144	104	33,2
Edema do corpo	144	280	212	15,0
Edema de intestino	280	500	390	7,7
Morfologia do intestino	280	500	390	7,7
Desvios na coluna	500	700	600	4,3
Lente turva do olho	500	700	600	4,3
Morfologia do olho	500	700	600	4,3

DISCUSSÃO

As duas espécies de *Physalaemus* estudadas apresentaram sensibilidade ao Glifosato, e os dados mostraram efeitos claros e preocupantes deste herbicida sobre elas. Em relação a toxicidade aguda, a CL₅₀ destas duas espécies está entre as menores registradas, inferior a *Rana clamitans* e *Rana pipiens* (Howe et al. 2004); *Scinax nasicus* (Lajmanovich 2003) e *Bufo americanus* (Edginton et al. 2004). Entre *P. cuvieri* e *P. gracilis* a diferença na CL₅₀ foi pequena, com *P. cuvieri* mais sensível que *P. gracilis*, mas ambas com toxicidade aguda entre 1360 e 1530µg/L, semelhante ou abaixo do que pode ser encontrado em águas superficiais: 2160µg/L no Sul do Brasil (Rodrigues e Almeida 2005); 1502µg/L (Aparicio 2013) e 1900µg/L (Primost 2017) na Argentina; 1430µg/L no Canadá (Govindarajulu 2008) e 7600µg/L e nos Estados Unidos (Jones et al. 2010).

Espécies nativas podem ser suscetíveis aos efeitos tóxicos do Glifosato em sua formulação comercial (Chen et al. 2004; Cauble e Wagner 2005; Lanctôt 2014). Diferente de estudos com espécies nativas, uma das maiores CL₅₀ registradas para Glifosato é com *Xenopus laevis*, que foi padronizada para estudos ecotoxicológicos com anfíbios (9400µg/L;

Perkins et al. 2000). Isso reforça a necessidade de estudos com espécies nativas, para entender os possíveis danos no ambiente natural.

Os ensaios crônicos deste estudo foram realizados com concentrações permitidas pela legislação brasileira e encontradas no ambiente. Dentro desta lógica, a concentração 280µg/L de Glifosato, que é permitida por lei para águas de classe III (Brasil - Conama 357/2005) que podem ser consideradas águas semelhantes aos habitats de reprodução de anfíbios, causaram efeitos crônicos de mortalidade a partir de 48 horas de exposição para as duas espécies em estudo. Isso significa que em dois dias de exposição a concentração de Glifosato que a lei considera válida, a mortalidade seria significativa. Ao mesmo tempo, em concentrações a partir de 500µg/L a mortalidade foi menor, ou seja, a taxa de sobrevivência não foi linear. Esse resultado se soma ao fato dos girinos terem menor comprimento e massa nestas concentrações, ou seja, embora sobrevivam, apresentam efeitos crônicos de crescimento e peso, ou fitness individual.

Estudos anteriores com agrotóxicos, também apresentaram maior sobrevivência em doses mais altas (e.g. Storrs e Kiesecker 2004; McMahon et al. 2011; Brodeur et al. 2013; Bernabó et al. 2016). Há evidências de que estes resultados não lineares, entre concentração e mortalidade, tenham relação com químicos de ação desreguladora endócrina (Storrs e Kiesecker 2004; Beausoleil et al. 2013; Lagarde et al. 2015). Para Relyea e Mills (2001) mesmo que os animais sobrevivam a taxas mais altas de qualquer químico, durante o período de exposição, acabam sofrendo outras consequências negativas. Nossos resultados corroboram com essa afirmativa, já que a medida que se aumentaram as concentrações, além do menor comprimento e peso, houve aumento de malformações. Na natureza, girinos menores poderiam ter atraso na metamorfose ou resultar em adultos de tamanho reduzido (Boone e Semlitsch 2002; Altwegg e Reyer 2003; Boone e James 2003; Brunelli et al. 2009). O tamanho do corpo também está ligado diretamente ao sucesso ou fracasso reprodutivo, influenciando na seleção intra e intersexual, podendo ainda determinar o número e tamanho máximo de ovos que uma fêmea pode produzir (Mays et al. 2006; Hayes 2010). Portanto maiores tamanhos de girinos garantem mais chances de uma metamorfose de sucesso e maior chance de sobrevivência (Cabrera-Guzmán et al. 2013; Montalvão 2017).

O Glifosato causou malformações em todas as concentrações testadas. Inibições dos hormônios relacionados à glândula tireoide podem ocasionar malformações em anuros tanto em fase de embrião como girinos, incluindo defeitos craniofaciais, malformações de órgãos bem como, no formato dos olhos e enrolamento intestinal (Bronchain et al. 2017). Lanctôt et al. (2014) em seu estudo com girinos de *Lithobates sylvaticus* apresentaram evidências de que

formulações comerciais, a base de Glifosato, são capazes de alterar genes relacionados à glândula tireoide, além de ter o potencial de alterar a resposta hormonal durante a metamorfose.

De acordo com Paganelli et al. (2010) o Glifosato foi capaz de induzir distúrbios em sinalizadores como slug, otx2 e shh causando elevação de ácido retinóico. Estes sinalizadores agem como uma cascata genética crítica para o desenvolvimento do cérebro e esqueleto craniofacial. Portanto estão correlacionados com a interrupção dos mecanismos de desenvolvimento envolvendo a crista neural, a formação da linha média dorsal embrionária e o padrão cefálico. Desta forma este tipo de alteração pode ocasionar malformações oculares, cerebrais e faciais, como alterações mandibulares, além de alterações caudais (Paganelli et al. 2010).

Uma das principais malformações observadas foi alteração na boca, como perda das linhas de dentículos queratinosos ou até mesmo perda total das cartilagens labiais (mandíbulas). Perdas de dentículos e ou lábios influencia negativamente a vida destes animais comprometendo sua alimentação, e respiração (Duellman e Trueb 1986). Os girinos tem um metabolismo acelerado, e para isso, passam boa parte do tempo se alimentando, são herbívoros e, portanto, usam suas mandíbulas e as estruturas queratinosas para cortar partículas suspensas na água e raspar substratos onde encontram alimento. A boca também é responsável por um sistema de bomba bucal que auxilia nas trocas de gases (Alonso 2003). Alterações bucais prejudicam a nutrição que pode causar um desenvolvimento retardado e falhas reprodutivas (Hayes et al. 2010).

Malformações bucais também podem ser causadas pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* [Bd] (Blaustein et al. 2005; Smith et al. 2007; Mutschmann 2015). No entanto, não houve malformações significativas na boca do controle, para nenhuma das espécies. Também existe a evidência na literatura de que o herbicida Glifosato atua sobre fungos (Dallmann et al. 2010), portanto se descarta a hipótese de alterações bucais causadas por fungos neste estudo.

Outra malformação que apareceu em mais de metade dos expostos foi no intestino. Devido aos hábitos alimentares herbívoros dos girinos, foi necessária uma grande área de superfície intestinal para absorção de nutrientes (Duellman e Trueb 1986). Assim, o intestino é longo e enrolado sobre si (Shreiber et al. 2005; Seixas Filho et al. 2013). Nos girinos expostos a Glifosato apareceram alterações no formato, posição ou edema no intestino. Há evidencias de que estas alterações podem ocasionar problemas na absorção de alimentos e nutrição deste grupo de animais comprometendo sua sobrevivência (Bahia 2007). Alterações

intestinais também foram observadas em outros estudos (Lenkowski et al. 2010; Almeida 2014; Wagner et al. 2017). Grande parte dos girinos apresentaram despigmentação de pele, quando expostos as concentrações de Glifosato, esta anormalidade também foi observada em outros estudos com agrotóxicos (Brunelli et al. 2009; Almeida 2014).

Em relação aos olhos, o aspecto da lente e a morfologia foram afetadas pela exposição ao Glifosato. Os olhos dos girinos são estruturas sensíveis a contaminantes pois não têm qualquer cobertura protetora, as pálpebras são ausentes (Duellman e Trueb 1986). Não se sabe ao certo qual o nível de visão de um girino, porém estudos relatam que os mesmos apresentam uma série de respostas a luz, preferem ambientes com baixa iluminação, e utilizam a luz para orientação, para se manter em interação social, na busca por alimento e para proteção mudando sua localização na lagoa durante o dia ou a noite e em dias mais ou menos quentes (Laurens 1914; Marangio 1975; Dunlap e Satter 1985; Duellman e Trueb 1986). Portanto, sabe-se que alterações oculares podem prejudicar os girinos na detecção de predadores (Chovanec 1992), bem como, na procura por alimento e até mesmo na orientação social, podendo ficar mais suscetível a predadores se se perder do grupo (Duellman e Trueb 1986).

Anormalidade na morfologia do corpo (corpo, cauda, pernas) foi observada tanto na fase de girino quanto na fase de metamorfose, tanto neste estudo como em outros (e.g Lajmanovich 2003; Paganelli 2010; Dornelles 2013; Wagner et al. 2017). Anormalidades caudais pode ser associada ao surfactante no herbicida que interfere na síntese de colágeno em anfíbios (Mann e Bidwell 2001). As outras malformações prejudicam a natação nos animais afetando negativamente a sobrevivência individual e o sucesso da população em ambientes naturais, aumentando a suscetibilidade à predação e reduzindo o sucesso de forrageamento (Feder 1982; Jung e Jagoe 1995). Deformidades dos membros, crescimento diminuído e atrasos na metamorfose são efeitos de desenvolvimento que limitariam o potencial reprodutivo. Este cenário pode ser pior para espécies que tem períodos reprodutivos curtos, onde o recrutamento fracassado para uma ou duas estações de reprodução pode ser desastroso para populações (Hayes 1997; Harper et al. 2008).

Além de malformações, a metamorfose foi retardada para os girinos das duas espécies expostas, permanecendo em clímax metamórfico por uma média de 8 dias a mais que o controle. De acordo com Pough et al. (2006) o desenvolvimento larval se divide em três períodos: pré metamorfose, pró metamorfose e clímax metamórfico. Na fase Pré-Metamórfica os girinos aumentam de tamanho, com pouca mudança de forma. Na Pró Metamórfica aparecem os membros traseiros e o crescimento do corpo continua em ritmo lento. No Clímax Metamórfico, os membros dianteiros emergem e a cauda começa a regredir. Nesta fase os

girinos possuem quatro pernas e cauda, portanto não conseguem nadar nem saltar com eficiência, ficando mais suscetíveis a predadores (Pough et al. 2006). Um estudo realizado com *Lithobates sylvaticus* mostrou um atraso de 7 dias na metamorfose de girinos expostos a 2900µg/L de Glifosato (Lancôt et al. 2014). De acordo com os mesmos autores, este atraso pode aumentar a vulnerabilidade dos girinos à predação, fornecimento de alimentos insuficiente e reduzir o sucesso reprodutivo. Além de serem presas fáceis neste período, o aumento do tempo para completar a metamorfose é motivo de preocupação em condições de campo, pois algumas lagoas que servem de habitat para os girinos são propensas a secar precocemente (Howe et al. 2004). Portanto, herbicidas à base de Glifosato são tóxicos, afetam as taxas de crescimento e causam atrasos no alcance do clímax metamórfico em girinos expostos em condições laboratoriais (Lancôt et al. 2014).

Na avaliação de risco, a Máxima Concentração de Toxicante (MATC) de Glifosato para mortalidade e malformação foi menor do que é permitido para águas brasileiras. Em águas de classe III é permitido 280µg/L de Glifosato (Brasil - Conama 357/2005) e 500µg/L para água potável (Brasil - Ministério da Saúde 2011). Nos Estados Unidos é permitido 700µg/L; 280µg/L no Canada e 370 µg/L na Austrália, para água potável. Todos os valores permitidos por lei no Brasil e demais países citados ficam bem acima do MATC estimado para as duas espécies.

Em relação a avaliação de risco, o Glifosato apresentou alto risco ambiental agudo e crônico para as duas espécies estudadas. Isso significa que a concentração ambiental encontrada para este herbicida, causa efeitos danosos a *P. cuvieri* e *P. gracilis*. Desta forma concentrações ambientais encontradas no Sul do Brasil e Argentina (e.g. 300µg/L, Silva 2003; 700µg/L, Peruzzo et al. 2008; 630µg/L, 24h após aplicação Queiroz 2011) podem causar malformações graves, que impedem a fuga de predadores, busca por alimento e a sobrevivência, deste grupo de animais.

A meia vida do Glifosato no ambiente pode atingir até seis semanas (Peterson et al. 1994; Wojtaszek et al. 2004). Em lagoas, principais locais de reprodução e onde passam as fases mais críticas de vida, a meia vida do Glifosato pode ser ainda maior, chegando a 120 dias (Barolo 1993; Mattos 2002). De acordo com nossos dados, qualquer um destes tempos é mais que suficiente para exercer efeitos negativos nas espécies de anfíbios estudadas.

O uso do Glifosato tem causado preocupação a alguns países devido a riscos comprovados a saúde animal e humana (Paganelli 2010). A França já proíbe o Glifosato em áreas não agrícolas desde o início de 2017. Recentemente, o primeiro-ministro da França pediu ao Ministério da Agricultura e Alimentação e ao Ministério da Transição Ecológica e Inclusiva

a elaboração de um plano para a eliminação progressiva do Glifosato nas áreas agrícolas, o objetivo é banir o herbicida no país até o ano de 2022 (Gouvernement 2017).

CONCLUSÃO

O Glifosato apresentou risco agudo e crônico mesmo em períodos curtos de exposição e concentrações baixas, para os girinos das duas espécies em estudo. As alterações observadas nesta pesquisa são capazes de comprometer a sobrevivência, capacidade de forrageamento e fuga de predadores, prejudicando também o desenvolvimento metamórfico, o que poderia diminuir a possibilidade de sucesso reprodutivo, e, portanto, contribuir para possíveis extinções das populações de anfíbios.

A legislação brasileira permite concentrações acima do que causa efeitos negativos para as duas espécies de *Physalaemus*. No entanto, mais ensaios com anfíbios são necessários para reavaliar as concentrações de químicos permitidas no ambiente natural, pelas leis Brasileiras e dos países da América do Sul onde habitam estes animais.

REFERÊNCIAS

Achaval F, Olmos A (2003) Anfíbios y Reptiles del Uruguay. In: Achaval, F; Olmos, A. Anfíbios y reptiles del Uruguay, Facultad de Ciencias. Montevideo, Uruguay, pp 136 (in Spanish)

Almeida PR (2014) Toxicidade aguda (lc50) e efeitos comportamentais e morfológicos do formulado comercial Roundup Original em girinos de *Physalaemus cuvieri* (anura, leptodactylidae) e *Rhinella icterica* (anura, bufonidae). Dissertation, Universidade Federal de Alfenas (in Portuguese)

Alonso DG (2003) Desarrollo y diferenciación de las branquias externas e internas em embriones y larvas de *Bufo arenarum*: análisis descriptivo y experimental. Tese, Universidad de Buenos Aires (in spanish)

Altwegg R, Reyer HU (2003) Padrões de seleção natural em tamanho na metamorfose em sapos-da-água. *Evolution* 57:872-82

Amarante JOP, Santos TCR, Brito NM, Ribeiro ML (2002) Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. *Quimica Nova* 25:589-593. doi:10.1590/S0100-40422002000400014 (in Portuguese)

Anderson JD, Williamson GK (1974) Nocturnal stratification in larvae of the mole salamander, *Ambystoma talpoideum*. *Herpetologica* 30:28-29

Anderson JD, Graham RE (1967) Vertical migration and stratification of larval *Ambystoma*. *Copeia* 371-374

Aparicio VC, De Gerónimo E, Marino D, Primost J, Carriquiriborde P, Costa JL (2013) Environmental fate of glyphosate and aminomethyl phosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins. *Chemosphere* 93:1866-73. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.06.041

Bahia, VRLO (2007) Morfologia e enzimologia do sistema digestório dos girinos da rã-touro (*Rana catesbeiana*) durante o desenvolvimento e metamorfose. Dissertação Universidade Estadual Paulista Centro de Aquicultura da UNESP *Campus* de Jaboticabal

Barolo D (1993) Reregistration eligibility decision for glyphosate. Environmental Protection Agency. Washington, United States

Barreto L, Andrade GV (1995) Aspects of the reproductive biology of *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leptodactylidae) in northeastern Brazil. *Amphibia-Reptilia* 16: 67-76. doi: 10.1163/156853895X00208

Beausoleil C, Ormsby JN, Gies A, Hass U, Heindel JJ, Holmer ML, Nielsen PJ, Munn S, Schoenfelder G (2013) Low dose effects and non-monotonic doseresponses for endocrine active chemicals: science to practice workshop: workshop summary. *Chemosphere* 93, 847–856, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere>.

Besten PJ, Munawar M (2005) Ecotoxicological testing of marine and freshwater ecosystems: emerging techniques, trends and strategies. Taylor e Francis Group. London, New York

Blaustein AR, Romansic JM, Scheessele EA, Han BA, Pessier AP (2005) Interspecific variation in susceptibility of frog tadpoles to the pathogenic fungus *atrachochytrium dendrobatidis*. *Cons Biol* 19: 1460–1468. doi: 10.1111/j.1523-1739.2005. 00195.x

Hartmann MT, Hartmann PA, Haddad CFB (2010) Reproductive modes and fecundity of an assemblage of anuran amphibians in the Atlantic rainforest, Brazil. *Iheringia* 3:207-215. doi: 10.1590/S0073-47212010000300004

Blaustein A R, Kiesecker J M (2002) Complexity and conservation: lessons for the global decline of amphibian populations. *Ecology Letters* 5: 577- 608. doi: 10.1046/j.1461-0248.2002. 00352.x

Boone MD, Semlitsch RD (2002) Interações de um inseticida com competição e secagem de lagoas em comunidades de anfíbios. *Ecol. Appl.* 12: 307-316

Boone MD, James SM (2003) Interactions of an insecticide, herbicide and natural stressors in mesocosms of the amphibian community. *Ecol. Appl* 13: 829-841

BRASIL. Decreto Federal nº 4074, de 04 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei nº 7802, de 11 de julho de 1989. Brasília: DOU Diário Oficial da União. Publicado no D.O.U de 08 de janeiro de 2002

BRASIL. Resolução CONAMA nº357 de 17 de março de 2005. Classificação de águas, doces, salobras e salinas do Território Nacional. <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>. Accessed in 10 september 2016

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria MS nº 518, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. Brasília. http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/portaria_518_2004.pdf. Accessed in 02 september 2017

Brodeur J, Candioti VJ, Soloneski S, Larramendy ML, Ronco AE (2012) Evidence of Reduced Feeding and Oxidative Stress in Common Tree Frogs *Hypsiboas pulchellus* from an Agroecosystem Experiencing Severe Drought, J of Herpetology 46:72-78. doi: 10.1670/10-200

Brodeur JC, Sassone A, Hermida GN, Codugnello N (2013) Environmentally-relevant concentrations of atrazine induce non-monotonic acceleration of developmental rate and increased size at metamorphosis in *Rhinella arenarum* tadpoles. Ecotoxicol. Environ. Saf. 92, 10–17, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.01.019>

Bronchain OJ, Chesneau A, Monsoro-Burq AH, Jolivet P, Paillard E, Scanlan TS, Pollet N (2017). Implication of thyroid hormone signaling in neural crest cells migration: Evidence from thyroid hormone receptor beta knockdown and NH3 antagonist studies. Molecular and Cellular Endocrinology 439: 233-246. doi: 10.1016/j.mce.2016.09.007

Brunelli E, Bernabo I, Berg C, Lundstedt-Enkel K, Bonacci A, Tripepi S (2009) Environmentally relevant concentrations of endosulfan impair development, metamorphosis and behaviour in *Bufo bufo* tadpoles. Aquatic Toxicology 91:135–142, doi: 10.1016/j.aquatox.2008.09.006

Bunzel K, Liess M, Kattwinkel M (2014). Landscape parameters driving aquatic pesticide exposure and effects. Environ Pollut 90–97. doi: 10.1016/j.envpol.2013.11.021

Burliba SAL, Gavril AL (2011). Amphibians as model organisms for study environmental genotoxicity. *Ecol Env* 9:11–15

Cabrera-Guzmán E, Crossland MR, Brown GP, Shine R (2013) Larger body size at metamorphosis enhances survival, growth and performance of young cane toads (*Rhinella marina*). *Plos One* 8:701-21. doi: 10.1371/journal.pone.0070121

Camargo A, Sarroca M, Maneyro R (2008) Reproductive effort and the egg number vs. size tradeoff in *Physalaemus frogs* (Anura: Leiuperidae). *Acta Oecologica* 34: 163-171. doi: 10.1016/j.actao.2008.05.003

Carneiro F F, Pignati W, Rigotto R M, Augusto LGS, Rizollo A, Muller NM (2012) Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Rio de Janeiro https://www.abrasco.org.br/dossieagrototoxicos/wp-s/2013/10/DossieAbrasco_2015_web.pdf Accessed in 05 september 2016

Cauble K, Wagner RS (2005) Sublethal effects of the herbicide glyphosate on amphibian metamorphosis and development. *Bull. Environ. Contam. and Toxicol.* 75:429–435. doi: 10.1007/s00128-005-0771-3

Chen CY, Hathaway KM, Folt CL (2004) Multiple stress effects of Vision herbicide, pH, and food on zooplankton and larval amphibian species from forest wetlands. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23:823–831

Chevillard A, Coussy HÁ, Guillard V, Gontard N, Gastaldi EJ, Hazard (2012) Controlling pesticide release via structuring agropolymer and nanoclays based materials *J of Hazard Mater* 29: 205-206. doi: 10.1016/j.jhazmat.2011.11.093

Chovanec A, (1992) The influence of tadpole swimming behaviour on predation by dragonfly nymphs. *Amphibia-reptilia* 13: 341–349. doi: 10.1163/156853892X00049

Colombo P, Kindel A, Vinciprova G, Krause L (2008) Composition and threats for conservation of anuran amphibians from Itapeva State Park, Municipality of Torres, Rio Grande do Sul, Brazil. *Biota Neotrop.* 8 pp 3

Conselho Federal de Medicina Veterinária. Guia Brasileiro de boas práticas para eutanásia de animais. São Paulo, 2012. Disponível em

<http://www.fcav.unesp.br/Home/Comissoes/ceua/guia-brasileiro-de-boas-praticas-para-a-eutanasia.pdf>>. Accessed in 22 april 2016

Costa CR, Olivi PA (2008) Toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de Avaliação. *Química Nova* 31: 1820- 1830. doi: 10.1590/S0100-40422008000700038

Costa RN (2014) Medindo os Impactos do Glifosato e do Estresse Ambiental com uma Régua: Assimetria Flutuante e Mortalidade em Girinos (Amphibia: Anura) de *Physalaemus cuvieri* (Leptodactylidae) e *Scinax fuscomarginatus* (Hylidae). Tese, Universidade Federal de Goiás

Costa V, Sarpa de Campos de Mello M, Friedrich K (2017) Exposição ambiental e ocupacional a agrotóxicos e o linfoma não Hodgkin Saúde <http://insp.redalyc.org/articulo.oa?id=406350708006>. Accessed in 15 september 2017

Cox C (1995) Human exposure and ecological effects. *J of Pesticide Reform*

Dallmann CM, Scheneider L, Bohm GMB, Kuhn CR, (2010). Impacto da aplicação de Glifosato na microbiota do solo cultivado com soja geneticamente modificada. *Rev Thema* 7 pp 1

David M, Kartheek RM (2015) Malathion acute toxicity in tadpoles of *Duttaphrynus melanostictus*, morphological and behavioural. *The J of Basic and Appl Zoology* 72:1-7. doi: 10.1016/j.jobaz.2015.01.004

Dornelles MF (2013) Efeito dos herbicidas atrazina, Glifosato e quinclorac sobre a composição bioquímica, a peroxidação lipídica e a sobrevivência de girinos de *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802). Dissertação. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Duellman WE; TRUEB L (1985) *Biology of Amphibians* William, pp 1994 – 670.

Dunlap DG, Satterfield CK (1985). Habitat selection in larval anurans: early experience and substrate pattern selection in *Rana pipiens*. *Dev. Psychobiol.* 18: 37–58

Edge CB, Thompson DG, Hao C, Houlahan JE (2012) Uma aplicação silvicultura do herbicida à base de glifosado Visionmax para zonas húmidas tem efeitos diretos limitados nas larvas de anfíbios. *Toxicologia Ambiental e Química* 31: 2375-2383

Edginton A, Sheridan PM, Stephenson GR, Thompson DG, Boermans HJ (2004). Comparative effects of pH and Vision® herbicide on two life stages of four anuran amphibian species. *Environ. Toxicol. and Chem.* 23:815–822

Feder ME (1982) Efeitos do estágio de desenvolvimento e do tamanho corporal no consumo de oxigênio das larvas de anuros: uma reavaliação. *J. Exp. Zool.* 220, 33-43

Foit A, Chatzinotas M, Liess K (2010) Short-term disturbance of a grazer has long-term effects on bacterial communities - Relevance of trophic interactions for recovery from pesticide effects. *Aquat Toxicol* 99: 205 - 211

Frost DR (2017) Amphibian species of the world: an online reference. American Museum of Natural History, New York. 2014 Accessed in 10 september 2017 <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia>

Fuentes L, Moore LJ, Rodgers JH, Bowerman WW, Yarrow GK, Chao WY (2011) Comparative toxicity of two glyphosate formulations (Original formulation of Roundup and Roundup Weather Max) toxic north American larval amphibians. *Environ Toxicol Chem* 30: 2756–2761

Giesy J, Dobson S, Solomon K (2000) Avaliação dos riscos ecotoxicológicos para Roundup herbicida. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 167, 35 - 120

Gosner KL (1960) A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetological* 16:183-190

Gouvernement (2017) Glyphosate: rather than a sudden, outright ban, there will be a gradual phasing-out of pesticides posing a risk to health or biodiversity. <http://www.gouvernement.fr/en/glyphosate-rather-than-a-sudden-outright-ban-there-will-be-a-gradual-phasing-out-of-pesticides>. Accessed 02 october 2017

Govindarajulu PP (2008) Literature review of impacts of glyphosate herbicide on amphibians: What risks can the silvicultural use of this herbicide pose for amphibians in B.C.? Ministry of Environment, Victoria, BC. Wildlife Report 28

Hamilton MA, Russo CR, Thurston RV (1977) Trimmed Spearman - Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays Environmental Science Technology 7: 714-719

Hassan AA, Anwar ZM, Rizk MA, Khairy GM, Elasmfoury MH (2015) Determination of organophosphorus pesticides in water samples by using a new sensitive luminescent probe of Eu (III) complex. J of Luminescence 157: 371–382

Hayes TB, Stuart AA, Mendoza M, Collins A, Noriega N, Vonk A, Johnston G, Liu R, Kpodzo D (2006) Characterization of atrazine induced gonadal malformations and effects of an androgen antagonist (cyproterone acetate) and exogenous estrogen (estradiol 17 β): support for the demasculinization/feminization hypothesis. Environ Health Perspect 114:134-141. doi:10.1289/ehp.8067

Hayes T (1997) Hormonal mechanisms as potential constraints on evolution: Examples from the Anura. Am. Zool. 37: 482-490

Hayes TB, Khoury V, Narayan A, Nazir M, Park A, Brown T (2010) Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs *Xenopus laevis*. Current issue 107:4612 – 4617 doi: 10.1073/pnas.0909519107

Hildenbrandt A, Guillaumon M, Lacore S, Tauler R, Barcelo D (2008) Impact of pesticides used in agriculture and vineyards to surface and groundwater quality (North Spain). Water Res 42:3315–3326

Howe CM, Berrill M, Pauli BD, Helbing CC, Werry K, Veldhoen N (2004) Toxicity of glyphosate-based pesticides to four north American frog species. Environmental Toxicology and Chemistry 8:1928–1938.

Hu L, Zhu J, Rotchell JM, Wu L, Gao J, Shi H (2015) Use of the enhanced frog embryo teratogenesis assay-*Xenopus* (FETAX) to determine chemically-induced phenotypic effects Science of the Total Environment 50 258–265. doi:10.1016/2014.11.086

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Boletim de comercialização de agrotóxicos e afins, histórico de vendas de 2000 a 2012 (2013). https://www.icict.fiocruz.br/sites/www.icict.fiocruz.br/files/IBAMA_boletim%20de%20comercializacao_2000_2012.pdf. Accessed in 26 april 2017. (In Portuguese)

IBGE - Instituto Brasileiro De Geografia E Estatística - Indicadores de desenvolvimento sustentável. Brasil. 2010. <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv46401.pdf>. Accessed in 20 may 2017

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores de desenvolvimento sustentável. Rio de Janeiro. 2015. <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomashtml.shtm>. Accessed in 20 may 2016

Itho SF (2014) Toxicologia. módulo XII: intoxicações por agrotóxicos. Herbicidas Glifosato. <http://lct.nutes.ufrj.br/toxicologia>. Accessed in 23 June 2017

IUCN - International Union for Conservation of Nature Red List of Threatened Species. 2009. <http://www.iucnredlist.org>. Accessed in 14 April 2017

Jones DK, Hammond JI, Relyea RA (2010) Roundup and amphibians: the importance of concentration, application time, and stratification Environmental Toxicology and Chemistry, 29: 2016–2025

Jung RE, Jagoe CH (1995) Efeitos do baixo pH e do alumínio sobre o tamanho do corpo, desempenho da natação e susceptibilidade à predação de girinos de sapo verde *Hyla cinerea*. Lata. J. Zool. 73: 2171-2183

Konstantinou IK, Hela DG, Albanis TA (2006) The status of pesticide pollution in surface waters (rivers and lakes) of Greece. Part I. Review on occurrence and levels. Environ Pollut. pp. 555–570

Lagarde F, Beausoleil C, Belcher SM, Belzunces LP, Emond C, Guerbet M, Roussell C (2015) Non-monotonic dose-response relationships and endocrinedisruptors: a qualitative method of assessment. Environ. Health 14, 13, <http://dx.doi.org/10.1186/1476-069x-14-13>

Lajmanovich RC, Zaguiitc MF, Casco VH (1998) Paraquat tolerance and alteration of internal gills structures of *Scinax nasicus* tadpoles (Anura: Hylidae). Environ Contamination and Toxicology 34:364-369. doi:10.1007/s002449900331

Lajmanovich RC, Sandoval MT, Peltzer PM (2003) Induction of Mortality and Malformation in *Scinax nasicus* Tadpoles Exposed to Glyphosate Formulations. *Environ Contamination and Toxicology* 70:612-618. doi:10.1007/s00128-003-0029

Lanctôt C, Navarro-Martín L, Robertson C, Park B, Jackman P, Pauli DB, Trudeau VL (2014) Effects of glyphosate-based herbicides on survival, development, growth and sex ratios of wood frog *Lithobates sylvaticus* tadpoles. II: Agriculturally relevant exposures to Roundup WeatherMax® and Vision® under laboratory conditions *Aquatic Toxicology* 13 pp 3862

Laurens H (1914) The reactions of normal and eye-less amphibian larvae to night. *J. Exp. Zool.* 16, 195–210

Lavilla E, Kwet A, Segalla MV, Langone J, Baldo D (2010) *Physalaemus gracilis*. The IUCN Red List of Threatened Species. doi:10.2305/IUCN.UK.2010-2.RLTS.T57258A11610839.en

Lenhardt PP, Bruhla CA, Berger GERT (2015) Temporal coincidence of amphibian migration and pesticide applications on arable fields in spring. *Basic and Applied Ecology* 16: 54–63

Lenkowski JR, Sanchez-Bravo G, McLaughlin KA (2010) Low concentrations of atrazine, glyphosate, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, and triadimefon exposures have diverse effects on *Xenopus laevis* organ morphogenesis. *J Environ Sci* 22:1305–1308. doi:10.1016 /S1001-0742(09)60254-0

MacBean C (2010) Manual de e-Pesticide. 15º ed., Ver. 5.1, Alton, Reino Unido: British Crop Protection Council. Glyphosate isopropylammonium. <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/r?dbs+hsdb:@term+@rn+@rel+38641-94-0>. Accessed in 12 september 2017

Magalhães DP, Filho ASF (2008) Ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecol Bras* 12:355-381. (in Portuguese)

Mann RLV, Bidwell JR, (1999) The toxicity of glyphosate and several glyphosate formulations to four species of southwestern Australian frogs 36:193-9

Marangio MS (1975) Phototaxis in larvae and adults of the marbled salamander *Ambystoma opacum*, *J herpetol* 9:293-297

Mattos ML, Peralba T, Dias MCR, Prata SLPF, Camargo L (2002) Monitoramento ambiental do glyphosate e do seu metabólito (ácido aminometilfosfônico) na água de lavoura de arroz irrigado. *Pesticidas: Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, 12:145-154

Mays HL, Doucet SM, Yao CT, Yuan HW (2006) sexual dimorphism and dichromatism in Steere's Liocichla *Liocichla steerii*. *J. Field Ornithol* 77: 437- 443

McDiarmid RW, Altig R (1999) Diversity. Familial and generic characterizations. *In* McDiarmid RW and Altig R (editors), *Tadpoles. The biology of anuran larvae*: 295–337. Chicago: The University of Chicago Press

McMahon TA, Halstead NT, Johnson S, Raffel TR, Romansic JM, Crumrine PW, Boughton RK, Martin LB, Rohr JR (2011) The fungicide chlorothalonil nonlinearly associated with corticosterone levels, immunity, and mortality in amphibians. *Environ. Health Perspect.* 119, 1098–1103, <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1002956>

Metts BS, Buhlmann KA, Tuberville TD, Scott D, Hopkins WA (2013). Maternal transfer of contaminants and reduced reproductive success of southern toads (*Bufo* [*Anaxyrus*] *terrestris*) exposed to coal combustion waste. *Environ. Sci. Technol* 47: 2846–2853

Mijares A, Rodrigues MT, Baldo D (2010) *Physalaemus cuvieri*. IUCN Red List. <http://www.iucnredlist.org/details/57250/0>. Accessed in 23 March 2017

Mitchell DG, Chapman PM, Long TJ (1987) Acute toxicity of Roundup® herbicides to rainbow trout, chinook and coho salmon. *Bull Environ* 39:1028-35

Monsanto. Roundup. <http://www.monsanto.com/global/br/produtos/pages/roundup.aspx> >. Accessed in 20 May 2017

Montalvão MF, Da Silva Castro AL, De Lima Rodrigues AS, De Oliveira Mendes B, Malafaia G (2017) Impacts of tannery effluent on development and morphological characters in a neotropical tadpole, *Sci Total Environ* 1595-1606. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.06.134

Moore, L.; Fuentes L, Rodgers J, Bowerman W, Yarrow G, Chao W, Bridges W (2012) Relative toxicity of the components of the original formulation of Roundups to five North American anurans. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 78:128–133

Mutschmann F (2015) Chytridiomycosis in Amphibians, J of Exotic Pet Medicine 24: 276–282

Oliveira IS (2016) Conhecimento ecológico local sobre espécies de anfíbios anuros e biocontrole de insetos pragas em sistemas agrícolas de região semiárida brasileira: subsídios à etnoconservação. Tese. Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Paganelli A, Gnazzo V, Acosta H, López SL, Carrasco AE (2010) Glyphosate-Based Herbicides Produce Teratogenic Effects on Vertebrates by Impairing Retinoic Acid Signaling Chem. Res. Toxicol 23:1586–1595

Paterson M (2007) Glyphosate Analysis of Risks to Endangered and Threatened Salmon and Steelhead. Disponível em: <http://www.epa.gov/oppfead1/endanger/effects/glyphosate-analysis.pdf>, Accessed in 12 october 2017

Peres F, Moreira Jc, Dubois Gs (2003) Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema, Parte I. In: PERES, F; MOREIRA, J. C; (org.). É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003

Perez LG; Vera MS; Miranda AL (2011) Effects of Herbicide Glyphosate and Glyphosate – Based Formulations on Aquatic Ecosystems. Herbicides and Environment. 10. 5772/12877

Perkins PJ, Boermans HJ, Stephenson GR (2000) Toxicity of glyphosate and triclopyr using the frog embryo teratogenesis assay-Xenopus. Environ. Toxicol. and Chem. 19:940–945

Peruzzo PJ, Porta AA, Ronco AE (2008) Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina Environmental Pollution 156: 61 – 66

Peterson HG, Boutin C, Martin PA, Freemark KE, Ruecker NJ, Moody MJ (1994) Aquatic phyto-toxicity of 23 pesticides applied at expected environmental concentrations. Aquat Toxicol (Amst) 28:275–292

Pettersson M, Ekelund NG (2006). Effects of the Herbicides Roundup and Avans on *Euglena gracilis*. Arch Environ Contam Toxicol 50:175–181

PLANO DE GESTÃO DO HORTO FLORESTAL DE ERECHIM
http://www.pmerechim.rs.gov.br/uploads/files/Plano_Gest%C3%A3o_Horto_Florestal_2012.pdf>. Accessed in 02 april 2016

Pough HF, Janis MC, Heiser JB (2006) A Vida dos Vertebrados. Atheneu editora São Paulo Brasil

Poulsen R, Luong X, Hansen M, Styris have B, Hayes T (2015) Tebuconazole disrupts steroidogenesis in *Xenopus laevis*. *Aquat Toxicol* pp 28–37

Prata F (2002) Comportamento do Glifosato no solo e deslocamento miscível de Atrazina. Tese. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz

Primost JE, Marino DJG, Aparicio VC, Costa JL, Carriquiriborde P (2017) Glyphosate and AMPA, “pseudo-persistent” pollutants under realworld agricultural management practices in the Mesopotamic Pampas agroecosystem, Argentina *Environmental Pollution* 1 e 9

Queiroz GMP, Silva MR, Bianco RJF, Pinheiro A, Kaufmann V (2011) Transporte de Glifosato pelo escoamento superficial e por lixiviação em um solo agrícola. *Quim. Nova*, 34:190-195

Rand GM, Petrocelli SR (1985) Fundamentals of aquatic toxicology: Methods and applications. Hemisphere Publishing. New York, United States

Relyea RA, Mills N (2001) Predator-induced stress makes the pesticide carbaryl more deadly to gray treefrog tadpoles (*Hyla versicolor*). *Proc Natl Acad Sci USA* 98:2491–2496

Relyea RA (2004). Growth and survival of five amphibian species exposed to combinations of pesticides. *Environ. Toxicol. Chem.*, 23, 1737–1742

Relyea RA (2006) Response to Letters to the Editor: The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. *Ecol Appl* 16:2027–2034

Relyea RA, Jones DK (2009) The toxicity of Roundup Original Max® to 13 species of larval amphibians. *Environ Toxicology and Chemistry* 13:2004-2008. doi: 10.1897/09-021.1

Ribeiro ACA, Doris EFGC, Amorim RSS, Lourencetti C (2013) Resíduos de pesticidas em águas superficiais de área de nascente do rio São Lourenço-MT: validação de método por

extração em fase sólida e cromatografia líquida. Química Nova 36. Doi:10.1590/S0100-40422013000200015 (in portuguese)

Riggin GW, Schultz TW (1986) Teratogenic effects of benzoil hydrazine on frog embryos. Trans American Microsc Soc pp 105

Rodrigues BN, Almeida FLS (2005) Guia de Herbicidas. Grafmark, Londrina pp 592

Rubinger FC (2009) Seleção de métodos biológicos para a avaliação toxicológica de efluentes industriais. Dissertation, Universidade Federal de Minas Gerais

Santos AC (2014) A toxidade dos agrotóxicos usados na lavoura de soja na cidade de Catalão - GO, e seus impactos no ambiente – um estudo de caso. Revista Acadêmica do Instituto de Ciências Jurídicas

Santos TLD, Ferreira FA, Barros NF, Siqueira CH, Santos IC, Machado AFL (2005) Exsudação radicular do glyphosate por *Brachiaria decumbens* e seus efeitos em plantas de eucalipto e na respiração microbiana do solo. Planta daninha 23:143-152

Schultz TW, Dumontj N, Epler RG (1985) The embryotoxic and osteolathyrogenic effects of semicarbazide. Toxicology P pp183-198

Scribner EA, Battaglin WA, Gilliom RJ, Meyer MT (2007) Concentration of glyphosate, its degradation product, aminomethylphosphonic acid and glufosinat in ground and surface water, rainfall, and soil samples collected in the United States, 2001-2006. www.usgs.gov. Accessed in 14 october 2017

Seixas Filho JT, Silva ACGC, Lima JLP, Fernandes SS, Navarro RD, Maia M (2013) Estudo anatômico e morfométrico do intestino de girinos da rã-touro em estágios de clímax metamórfico. Sabios Revista de Saúde e Biologia 8. <http://revista.grupointegrado.br/revista/index.php/sabios2/article/view/1323>. Accessed in 02 october 2017

Shreiber AM, Cai L, Brown D (2005) Remodeling of the intestine during metamorphosis of *Xenopus laevis*. Developmental Biology. 10 3720 – 3725

Silva MD, Peralba MCR, Mattos MLT (2003) Determinação de Glifosato e ácido aminometilfosfônico em águas superficiais do arroio Passo do Pilão. *Pesticidas: R Ecotoxicol. e Meio Ambiente* 13:19-28

Singh B, Sharma DK, Kumar R, Gupta A (2009) Controlled release of the fungicide thiram from starch–alginate–clay based formulation. *Applied Clay Science* 45:76-82

Smalling KL, Reeves R, Muths E, Vandever, M, Battaglin WA, Hladik ML, Pierce CL (2015) Pesticide concentrations in frog tissue and wetland habitats in a landscape dominated by agriculture. *Sci. Total Environ*, n. 502, p. 80–90. 2015

Smith KG, Weldon C, Conradie W, du Preez LH (2007) Relationship among size, development, and *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in African tadpoles. *Dis Aquat Org* 74:159-164

Solomon KR; Thompson DG (2003) Ecological risk assessment for aquatic organisms from over-water uses of glyphosate. *Journal of Toxicology and Environmental Health B*, Philadelphia, v.6, n.3, p.211-246

Solomon KR et al (2014) Effects of Herbicides On Fish. In: Tierney KB, Farrel AP, Brauner CJ. *Organic chemical toxicology of fishes*. Elsevier 7:370-403.

Spadotto CA, Gomes MAF, Luchini LC (2004) Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente pp 29.

Storrs, S. I., & Kiesecker, J. M. (2004). Survivorship Patterns of Larval Amphibians Exposed to Low Concentrations of Atrazine. *Environmental Health Perspectives*, 112(10), 1054–1057. <http://doi.org/10.1289/ehp.6821>

Tomita RY, Beyruth Z (2002) Toxicologia de agrotóxico em ambiente aquático. *O Biológico* 64:135-142

Toni LRM, Santana H, Zaia DAM (2006) Adsorção de glyphosate sobre solos e minerais. *Química Nova* 29:829-833.

USEPA (1993) Glyphosate. United States Environmental Protection Agency. R.E.D Facts

Wagner N, Müller H Viertel B (2017) Effects of a commonly used glyphosate-based herbicide formulation on early developmental stages of two anuran species. *Environ Sci Pollut Res* 24:1495-1508. doi:10.1007/s11356-016-7927-z

Wells KD (1977) The social behavior of anuran amphibians. *Anim Behav* 25: 666-693.

Thompson T, Fawell J, Kunikane S, Jackson D, Appleyard S, Callan P (2007) Chemical safety of drinking water: assessing priorities for risk management. WHO World Health Organization

Tsui MTK, Chu LM (2003) Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere* 52:1189-1197. doi:10.1016/S0045-6535(03)00306-0

Tsui MTK, Chu LM (2004) Comparative toxicity of glyphosate-based herbicides: Aqueous and sediment porewater exposures. *Arch. Environ. Contam. Toxicol*, 46, 316–323

Williams BK, Semlitsch RD (2010) Larval responses of three Midwestern anurans to chronic, low-dose exposures of four herbicides. *Arch Environ Contam Toxicol* 58:819-827.

Wojtaszek BF, Staznik B, Chartrand DT, Stephenson GR, Thompson DG (2004) Effects of Visiont herbicide on mortality, avoidance response, and growth of amphibian larvae in two forest wetlands. *Environ Toxicology and Chemistry* 23:832-842.

Ying Y, Xu S, Sun H, Chang D, Yin Y, Zheng H, Xu H, Lou Y (2011) Gelation of photocrosslinkable carboxymethyl chitosan and its application in controlled release of pesticide. *Carbohydrate Polymers* 86:1007-1013. doi: 10.1016/j.carbpol.2011.05.057

Zimdahl RL (1999) Fundamentals of weed science. Fort Collins: Colorado State University pp 324-332.

CAPITULO 2

Concentrações ambientais de Glifosato tem potencial genotóxico em anfíbios? Efeito de uma formulação comercial de Glifosato em *Physalaemus cuvieri* e *Physalaemus gracilis* (Anura, Leptodactylidae).

RESUMO

Estudos de genotoxicidade tem revelado que pesticidas, principalmente organofosforados tem potencial de ligação com o material genético de vertebrados não alvo, desta forma ocasionam danos genéticos que podem prejudicar a integridade genéticas destes animais. Este estudo teve como objetivo principal, avaliar a ocorrência de danos genotóxicos em eritrócitos de duas espécies de anfíbios nativas da América do Sul: *Physalaemus cuvieri* e *Physalaemus gracilis*, expostas a uma formulação comercial a base de Glifosato, utilizando o Ensaio do Micronúcleo e outras Anormalidades Nucleares Eritrocíticas como biomarcador. Para a realização do estudo foram coletadas desovas em meio natural. Os ensaios crônicos para posterior análise de Micronúcleo tiveram duração de 14 dias e iniciaram no estágio 25 de Gosner (1960). Os girinos foram submetidos a doses permitidas pela legislação brasileira, e a concentrações encontradas em ambientes naturais, para águas do Brasil e Argentina (500, 700 e 1000µg/L). O Glifosato causou Micronúcleos e diversos tipos de anormalidade nucleares eritrocíticas, nas duas espécies de *Physalaemus*. Todas as concentrações testadas foram capazes de ocasionar danos que aumentaram com o aumento das concentrações. Tendo em vista as concentrações encontradas em ambiente natural, pode-se considerar que o Glifosato oferece risco em potencial, principalmente em relação a integridade genética das populações nativas de determinadas espécies de anfíbios, particularmente à espécie *P. cuvieri* e *P. gracilis*.

Palavras chave: Anfíbios, Danos, Eritrócitos, Micronúcleo, Toxicidade em girinos.

INTRODUÇÃO

Anfíbios anuros são reconhecidos como os vertebrados mais ameaçados de extinção em todo o mundo, e vêm sofrendo uma crise de grandes proporções desde a década de 1980 (IUCN 2009; 2014), enfrentando extinção ou o declínio populacional (Lannoo et al. 2011; Adams et al. 2013). Os declínios são ainda mais preocupantes, quando ocorrem em regiões de alta riqueza e endemismos, como é o caso do Brasil (Toledo et al. 2010; Frost 2017).

Entre as causas do declínio dos anfíbios estão os contaminantes residuais aquáticos, devido a seus efeitos fisiológicos e toxicológicos (Egea-Serrano et al. 2012). Os agrotóxicos tem sido considerados os poluentes aquáticos que mais contribuem para o declínio mundial das populações de anfíbios (Mann et al. 2009; Hayes et al. 2010; Lavorato et al. 2013), principalmente pelo fato de muitas espécies viverem associadas a lagoas temporárias e pequenos cursos d'águas adjacentes às áreas agrícolas (Howe et al. 2004; Hayes et al. 2010; Muniswamy et al. 2012).

Anfíbios passam as fases mais críticas de seu desenvolvimento na água (ovos e primeiros estágios de vida), além disso seus ovos são desprotegidos e a pele tanto de adulto como de girino é altamente permeável (Besten e Munawar 2005; Hayes et al. 2006). Desta forma estão suscetíveis a qualquer contaminante aquático (Govindarajulu 2008; Bouhafs et al. 2009; Sparling e Fellers 2009; Brühl 2011). Por esses motivos, os anfíbios são reconhecidos como um grupo apropriado de vertebrados para se examinar o potencial genotóxico de diversas formulações de pesticidas no ambiente aquático (Howe et al. 2004).

Uma técnica eficaz para testar a genotoxicidade de contaminantes aquáticos, principalmente de herbicidas em vertebrados nativos, se dá pela detecção de eritrócitos com núcleos anormais (De Flora et al. 1993; Minissi et al. 1996; Nessler e Marzin 1999; Caliani et al. 2014) especialmente para animais aquáticos (Bolognesi et al. 1999, 2004; Campana 2003). Técnicas de Micronúcleo são consideradas biomarcadores que funcionam como indicadores de alerta precoce da poluição, uma vez que suas respostas ocorrem antes de danos irreversíveis ao ecossistema (Adams 2000, 2001; Ribeiro 2003; Furnus et al. 2014).

O ensaio do Micronúcleo in vivo é um ensaio muito utilizado para avaliar a indução de aberrações cromossômicas (Hayashi 2016). Esse ensaio verifica a presença de Micronúcleos nas células do sangue, ou seja, de pequenos núcleos, separados e adicionais aos núcleos principais, produzidos durante a telófase da mitose (OECD 2016).

Em anfíbios (Barni et al. 2007; Arcaute et al. 2014; Lajmanovich et al. 2014; Pérez - Iglesias et al. 2015) e peixes (Carrasco et al. 1990; Ayllon e Vazquez 2000; Cavas e Ergene-

Gözükara 2003; Souza e Fontanetti 2006) também são consideradas outras categorias de anormalidades nucleares eritrocíticas como núcleos entalhados, lobulados, com bolha e vacuolizados. Estas anormalidades foram descritas pela primeira vez em peixes por (Carrasco et al. 1990) como, entalhados, binucleados, brotos nucleares, lobados, eritrócitos segmentados e núcleos com outras alterações morfológicas (Gonçalves et al. 2012). Essas anormalidades eritrocitárias nucleares evidenciam atividade citotóxica, genotóxica, mutagênica ou cancerígena das substâncias testadas (Attademo et al. 2011; Gökalp-Muranli et al. 2011; Rocha 2012).

O ensaio do Micronúcleo faz parte de diretrizes de ensaios genotóxicos para muitas classes de produtos químicos, incluindo agrotóxicos (Hayashi 2016). Existem casos em que o princípio ativo do agrotóxico é fracamente mutagênico, no entanto o produto comercial é capaz de induzir mutagenicidade (Titenko-Holland et al. 1997). Estudos de genotoxicidade com pesticidas envolvendo espécies de anuros vêm avaliando a exposição a esses compostos em suas formulações comerciais, reforçando a importância de entender como as formulações comerciais, podem estar afetando esses animais em ambiente natural. (Feng et al. 2004; Yin et al. 2008; Bernal et al. 2009; Baorong et al. 2010; King e Wagner 2010; Meza-Joya et al. 2013; Yadav et al. 2013; Pérez-Iglesias et al. 2014).

No Brasil e no mundo, o Glifosato é o princípio ativo mais utilizado em agrotóxicos, principalmente pelo fato de plantas transgênicas serem resistentes a ele (Myers et al. 2016). O Glifosato inibe a atividade da enzima 5-enolpiruvisticato-3-fosfato sintase que catalisa a síntese de aminoácidos aromáticos em plantas, por este motivo é considerado seguro para animais (Duke e Powles 2008; Pavani 2016). Porém acumulações de Glifosato sugerem que o mesmo tem causado impactos severos ao ambiente e a saúde humana, (Helander et al. 2012; Vera et al. 2013).

O Glifosato faz parte da classe dos organofosforados, conhecidos por possuírem afinidade de ligação com o material genético de organismos vivos, podendo provocar alterações e/ou danos nas fitas de DNA, sendo, portanto, chamados agentes genotóxicos (Bagchi et al. 1995; Sbrana e Musio 1995; Webster et al. 2002). O DNA e os danos cromossômicos são os eventos críticos mais importantes após a exposição a agentes cancerígenos e / ou genotóxicos. O dano cromossômico, como resultado de um reparo de DNA ineficaz ou incorreto, é expresso durante a divisão celular e representa um índice de efeitos genotóxicos acumulados (Bolognesi et al. 2006).

Estudos de efeitos biológicos com Glifosato em animais aquáticos, principalmente com avaliação de células sanguíneas contribui muito para observação de correlações

significativas entre a exposição a contaminantes, tanto naturais como experimentais, e a modificação do sangue, para anfíbios e peixes (Al-Sabti 1990; Barni 2007; Frenzilli et al. 2009). Este tipo de análise tem sido bastante promissora no que diz respeito a contaminação das águas e a influência de contaminantes ambientais (Barni 2007). Embora ocorram mutações espontâneas em células de vertebrados, a maioria delas é induzida por agentes físicos, químicos ou biológicos, aos quais os organismos podem ser expostos em seus habitats naturais (Calviello et al. 2006).

Várias espécies de anfíbios reproduzem em locais associados a áreas agrícolas e tem alto potencial de terem contato com pesticidas, como é o caso de *Physalaemus cuvieri* (rã-cachorro) e *Physalaemus gracilis* (rã-chorona). Essas duas espécies apresentam tolerância a uma ampla gama de habitats, e ocorrem em vários locais da Argentina, Brasil e Paraguai (Frost 2017). Podem ser encontradas em corpos d' água temporários, como poças de água, frequentemente em formações vegetais abertas e ambientes antropizados (Achaval e Olmos 2003; Camargo et al. 2008; Lavilla et al. 2010). São espécies de ampla distribuição e normalmente abundantes; mas *P. cuvieri* é considerada ameaçada localmente na Argentina pela destruição dos habitats, para agricultura e extração de madeira, além da poluição da terra e água ocasionada pelo escoamento (Mijares 2010). Essas duas espécies podem ser consideradas bons modelos para ensaios ecotoxicológicos (e.g. Barreto e Andrade 1995; Macagnan et al. 2017).

Este estudo teve como objetivo avaliar o potencial genotóxico de Glifosato em duas espécies de anfíbios nativas da América do Sul: *Physalaemus cuvieri* e *Physalaemus gracilis*, utilizando como biomarcador o Ensaio do Micronúcleo.

MATERIAL E METODOS

Agrotóxico

No presente estudo, foi utilizada a formulação comercial de Glifosato Roundup original® DI, herbicida sistêmico, não seletivo, formulado pela Monsanto do Brasil LTDA, registrado no Ministério da Agricultura, da Pecuária e Abastecimento – MAPA sob nº 00513. Tem em sua composição: Sal de Di-amônio de N - (phosphonomethyl) glycine (Glifosato) 445 g/L (44,5% m/v), equivalente ácido de N - (phosphonomethyl) glycine (Glifosato) 370 g/L (37,0% m/v) e outros Ingredientes, 751 g/L (75,1% m/v).

O Glifosato faz parte do grupo químico glicina substituída, considerado o seu grupo de formulação solúvel (SL). De acordo com a bula do Roundup Original® DI, possui

classificação Toxicológica Classe II – Altamente tóxico e Classificação do Potencial de Periculosidade Ambiental Classe III – Produto Perigoso ao Meio Ambiente.

Animal Ensaio e considerações dos experimentos

Para este estudo foram utilizados girinos de duas espécies de anfíbios anuros: *Physalaemus cuvieri* (rã-cachorro) e *Physalaemus gracilis* (rã-chorona). As coletas das desovas ocorreram de outubro de 2016 a março de 2017. As coletas foram realizadas em uma propriedade particular localizada na zona rural do município de Paulo Bento – RS (Latitude: -27° 42' 5.76", longitude: -52° 25' 33.6"), no Horto Florestal Municipal de Erechim – RS (27° 42' 43" e 27° 43' 13" sul e 52° 18' 05" e 52° 18' 43" oeste; Horto Florestal Erechim 2012), e nos açudes da Universidade Federal da Fronteira Sul localizada na Rodovia ERS 135, km 72, nº 200, Erechim – RS (-27° 43' 43.2"; - 52° 17' 9.07"). As áreas de coleta foram consideradas de referência por não terem aplicação de agrotóxicos nas proximidades.

Foram coletadas desovas com menos de 24 horas após a oviposição, e levadas até o laboratório de Ecologia e Conservação da Universidade Federal Fronteira Sul, *campus* Erechim, onde foram mantidas em aquários com aproximadamente 10 litros de água. Como os girinos apresentam fótotaxia negativa, e preferência por ambientes com baixa iluminação (Anderson e Graham 1967; Anderson e Williamson 1974 e Marangio 1975), foi utilizado fotoperíodo natural (Iluminação natural), e os aquários e ensaios foram protegidos da luz direta com papel pardo. Desde a entrada no laboratório até o final dos ensaios os girinos permaneceram com aeração artificial. A água utilizada para criação e ensaios tinha os seguintes parâmetros: Oxigênio Dissolvido (OD) entre 4,0 e 6,0mg/L, Temperatura 23°C ± 2, pH entre 6,8 e 7,2, Condutividade entre 151 e 178 µS/cm, Alcalinidade 9.74 mg CaCO₃/L, Turbidez < 5; Ca 6.76 mg/L, Na 44.1 mg/L, Mg 1.35 mg/L, Fe 0.08 mg/L e Ni < 0.001 mg/L.

Os girinos foram alimentados diariamente *ad libitum* com ração completa para peixes e animais aquáticos (Alcon - MEP 200 complex), com 45% de proteína bruta e vegetal em flocos. A alimentação foi iniciada a partir do estágio 25 de Gosner (1960), no qual a boca tem sua formação completa (McDiarmid e Altig 1999). Os girinos não utilizados nos experimentos foram devolvidos ao local de coleta. Esta pesquisa teve licença do Ibama para coleta, nº54939-1, e autorização do comitê de ética no uso de animais (CEUA) da Universidade Federal da Fronteira Sul.

Ensaio crônico

Os ensaios crônicos foram realizados no estágio 25 de desenvolvimento larval (Gosner 1960), período em que os girinos apresentam peças bucais completas, movimentos labiais, e alimentação externa (McDiarmid e Altig 1999). Para os ensaios crônicos foram utilizadas três concentrações ambientalmente relevantes de Glifosato: 500µg/L (concentração permitida pelo Ministério da Saúde em água potável, Brasil 2011), 700µg/L (encontrada em águas superficiais na Argentina, Peruzzo 2008) e 1000µg/L (registrada no Brasil em água superficial, Rodrigues e Almeida 2005).

Foram submetidos aos ensaios somente girinos que estavam em boas condições de comportamento e mobilidade. Os ensaios crônicos semi estáticos tiveram duração de 14 dias e os girinos foram alimentados diariamente com a mesma ração utilizada na criação. A água com solução de Glifosato e controle foi renovada a cada sete dias (considerando a meia vida do Glifosato de 7 a 8 dias; Jones et al. 2010; Edge et al. 2012) e os ensaios foram inspecionados diariamente para controle de temperatura e pH, alimentação, retirada e contabilização dos mortos.

Os ensaios foram organizados em sextuplicata, utilizando-se 10 girinos por recipiente de unidade experimental, de vidro extéril e cilíndrico com 450ml de solução de Glifosato. Foram colocados 60 girinos por concentração testada e mais 60 girinos para o controle, para cada espécie (Figura 1). Os girinos de *P. cuvieri* expostos aos ensaios tinham comprimento total (CT – medida do rostro até o final da cauda) de $9,59 \pm 2,11$ mm (7,61mm – 11,7mm) e massa de $0,014\text{g} \pm 0,007\text{g}$ (0,0045g - 0,0085g) e os girinos de *P. gracilis* tinham CT de $9,934\text{mm} \pm 1,5$ (8,3mm – 12,71mm) e massa de $0,023\text{g} \pm 0,009\text{g}$ (0,0045g – 0,0085g).



Figura 1 – Organização dos ensaios em sextuplicata para *Physalaemus cuvieri* e *Physalaemus gracilis* expostos a diferentes concentrações da formulação comercial de Glifosato.

Ensaio de Micronúcleo e Anormalidades Nucleares Eritrocíticas

Para o ensaio de Micronúcleo foram utilizados aleatoriamente 15 girinos de cada concentração, e mais 15 do controle, totalizando 60 girinos analisados por espécie. Para cada girino foram retiradas amostras de sangue por punção direta do coração, com seringas de insulina descartáveis e heparinizadas. As amostras de sangue foram colocadas em lâminas de microscopia esterilizadas. Para cada girino foram feitas duas lâminas de sangue, totalizando 120 por espécie.

As lâminas com sangue foram deixadas durante 24 horas para secar, e fixadas em álcool absoluto por 15 minutos. Posteriormente, foram coradas com corante Giemsa em tampão fosfato (pH 6,8) na proporção de 1:10, durante 12 minutos ao abrigo da luz (Figura 3). Decorrido este tempo, as lâminas foram lavadas suavemente com água destilada com auxílio de uma pisseta para a retirada do excesso de Giemsa. Após este procedimento, as lâminas foram mantidas à temperatura ambiente para secar. Depois da secagem as lâminas foram acondicionadas e guardadas, para serem analisadas posteriormente. A análise da frequência de Micronúcleos e demais anormalidades foi determinada a partir da contagem de 1000 eritrócitos para cada girino, com auxílio de Microscópio Óptico em objetiva de 100X, com imersão em óleo mineral.



Figura 2 – Preparação das lâminas com esfregaço de sangue de *Physalaemus cuvieri* e *Physalaemus gracilis* para o ensaio de Micronúcleo.

No ensaio de Micronúcleo foram analisados os Micronúcleos (corpos de cromatina pequenos, não refrativos, circulares ou ovóides que mostram o mesmo padrão de coloração que o núcleo principal) e mais nove tipos de Anormalidades Nucleares Eritrocíticas (ENAs - erythrocyte nuclear abnormalities). Foram consideradas ENAs: (1) Células Binucleada: Células com dois núcleos; (2) Células com Bolha ou Broto: Núcleos com pequena evaginação de cromatina; (3) Célula Anucleada: Células sem núcleo; (4) Núcleo Entalhado: Núcleos em forma de rim, tendo uma invaginação sem material genético; (5) Núcleo Lobado: Núcleo com uma ou mais evaginações maiores que uma bolha; (6) Microcitose: Célula com material genético condensado e material citoplasmático se reduzindo; (7) Cariólise: Núcleo transparente, somente com o contorno do núcleo; (8) Apoptose: Célula com material genético fragmentado (9) Núcleo Vacuolizado: Núcleo apresentando um ou mais vacúolos (Al-Sabti e Metcalfe 1995; Carrasco et al. 1990).

ANÁLISE DOS DADOS

Os resultados obtidos através das análises de Micronúcleo e demais anomalias, foram analisadas por ANOVA, seguida do ensaio post-hoc Tukey e/ou Dunnnett's, quando $p < 0,05$.

A maior Concentração de Efeito Não Observado (NOAEC - No Observed Adverse Effect Concentration) e a menor Concentração de Efeito Observado (LOAEL – Lowest Observed Adverse Effect Level) foram determinadas para todas as anormalidades nucleares observadas. Para NOAEC e LOAEL a normalidade dos dados foi avaliada pelo ensaio de

Shapiro Wilks e a homogeneidade das variâncias foi testada por Bartlett. Para ensaio de hipóteses utilizou-se ANOVA seguida do ensaio de Dunnett's para comparar as médias de cada tratamento com o controle. Também foi determinada a Máxima Concentração Aceitável de Toxicante (Maximum Acceptable Toxicant Concentration - MCAT), que é a média aritmética de NOAEC e LOAEL. Foi utilizado nível de confiança de 95% e o software Statística 8.

Para a avaliação de risco ambiental, foi utilizada a abordagem de Quociente de Risco (RQ - hazard quotient) que foi calculada como EEC / NOAEC (USEPA 1998), sendo a máxima concentração estimada do contaminante no ambiente (EEC - Estimated (or maximum) Environmental Contaminant Concentration) a concentração 2160µg/L encontrada em águas do Brasil (Rodrigues e Almeida 2005). Após calcular o coeficiente de risco, foi comparado ao nível de preocupação da USEPA (Level of concern - LOC). Neste caso o valor LOC para risco é 1. Se o HQ > 1, os efeitos prejudiciais são prováveis devido ao contaminante em questão (USEPA 2016).

RESULTADOS

No total, foram analisados 59850 eritrócitos para *P. cuvieri* e 62383 para *P. gracilis*. A existência de Micronúcleos nas células expostas ao Glifosato (Figura 3 B) foi significativa em relação ao controle, para ambas as espécies (*P. cuvieri* $F_{(3, 54)} = 4,7818$, $p < 0,01$ e *P. gracilis*, $F_{(3, 56)} = 3,4054$, $p < 0,01$) e significativa na maior concentração (1000µg/L Dunnett $p < 0,001$). Os controles das duas espécies não apresentaram nenhum Micronúcleo (Tabela 1).

Tabela 1 – Frequência de eritrócitos micronucleados em *Physalaemus cuvieri* e *Physalaemus gracilis* expostos a Glifosato.

<i>Physalaemus cuvieri</i>			
Concentração (µg/L)	Nº de cél. analisadas	Micronúcleos	Micronúcleos (%)
Controle	16036	0	0
500	15550	30	0,19
700	15249	37	0,24
1000	13015	96*	0,73
<i>Physalaemus gracilis</i>			
Concentração (µg/L)	Nº de cél. analisadas	Micronúcleos	Micronúcleos (%)
Controle	16067	0	0
500	15440	9	0,06
700	15365	5	0,32
1000	15511	117*	0,75

*

Significativo em relação ao controle, ANOVA e Dunnett's ($p < 0,01$ ou $p < 0,05$), tabela 2

Em relação as outras anormalidades (ENAs, figura 3 B-K), a mais frequente foi núcleo entalhado, 3,4% eritrócitos para *P. cuveiri*, e 3,36% para *P. gracilis* (Tabela 2, Figuras 4 e 5). As outras duas anormalidades mais frequentes em *P. cuveiri* foi Apoptose (1289 eritrócitos) e Microcitose (1078 eritrócitos). Para *P. gracilis*, a Microcitose (1029 eritrócitos) e a Apoptose (788 eritrócitos) foram as mais frequentes após o núcleo entalhado. A análise feita entre micronúcleo + ENAs encontradas em nossos ensaios foi significativa para as duas espécies (Tabela 2 e 3, Figuras 4 e 5).

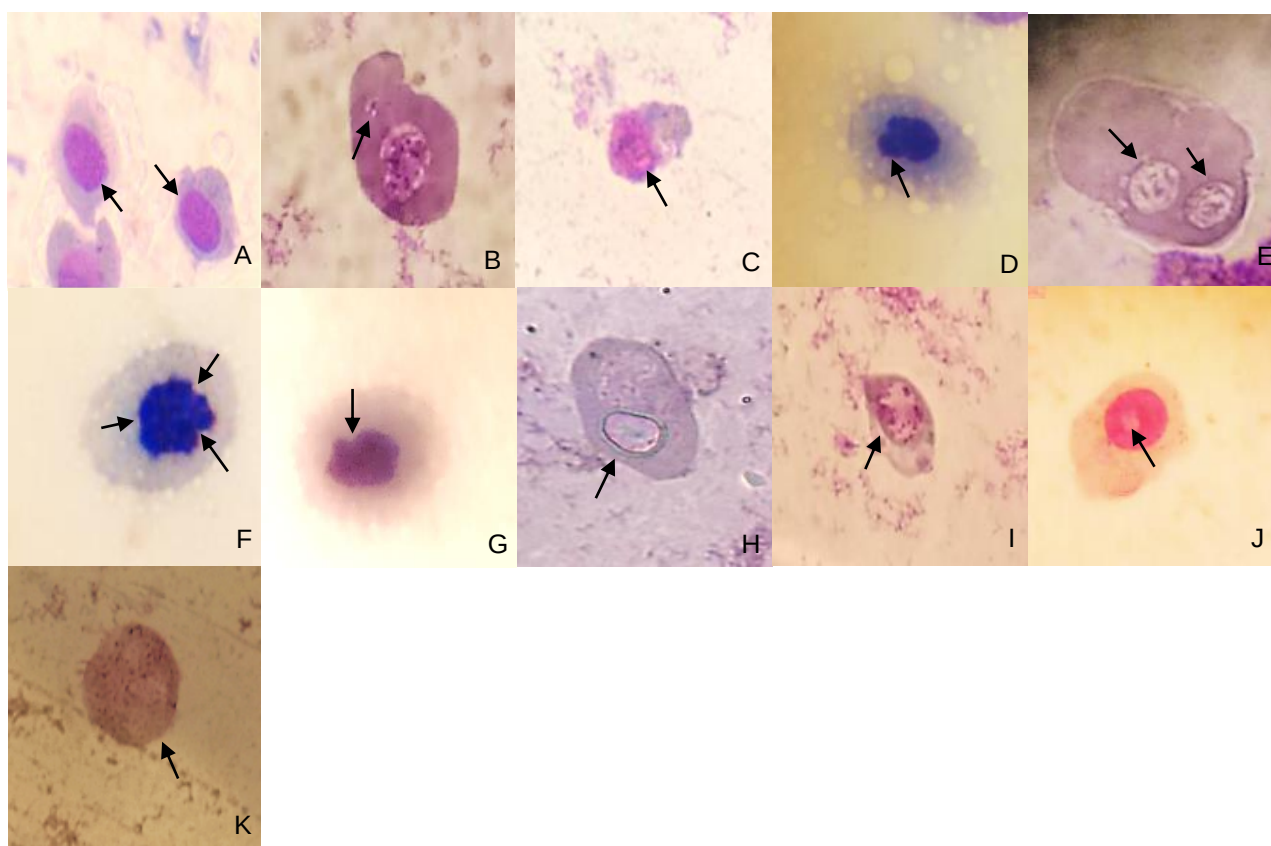


Figura 3 – Micronúcleo e Anormalidades nucleares detectadas nos eritrócitos dos girinos de *Physalaemus cuveiri* e *Physalaemus gracilis* expostos a concentrações de Glifosato. (A) Núcleo normal, (B) Micronúcleo; (C) Microcitose; (D) Broto nuclear; (E) Binucleada; (F) Núcleo lobado; (G) Núcleo entalhado; (H) Cariólise; (I) Apoptose; (J) Núcleo com vacúolo; (K) Anucleada.

Tabela 2 – Anormalidades Nucleares Eritrocíticas (ENAs) em girinos de *Physalaemus cuvieri* e *Physalaemus gracilis*, expostos a diferentes concentrações de uma formulação comercial do herbicida Glifosato. Para cada anormalidade está apresentado o número absoluto e entre parênteses a porcentagem.

<i>P. cuvieri</i>			Outras Anormalidades Nucleares Eritrocíticas (ENAs)								
Concentração (µg/L)	Nº de indivíduos analisados	Nº de células analisadas	Anucleada	Apoptose	Célula Binucleada	Broto nuclear	Núcleo com Cariólise	Núcleo Entalhado	Núcleo Lobado	Microcitose	Núcleo Vacuolizado
Controle	15	16036	3 (0,18)	12 (0,07)	9 (0,05)	4 (0,02)	5 (0,031)	17 (0,10)	6 (0,03)	8 (0,04)	5 (0,031)
500	15	15550	1 (0,006)	205* (1,31)	0 (0)	60 (0,38)	200* (1,28)	390* (2,50)	98* (0,63)	200* (1,28)	100 (0,64)
700	15	15249	100 (0,65)	449* (2,49)	29 (0,19)	110* (0,72)	322* (2,11)	820* (5,37)	129* (0,84)	396* (2,59)	200* (1,31)
1000	13	13015	379* (2,91)	623* (4,78)	207* (0,15)	247* (1,89)	380* (2,91)	836* (6,42)	354* (2,71)	474* (3,64)	311* (2,38)
<i>P. gracilis</i>			Outras Anormalidades Nucleares Eritrocíticas (ENAs)								
Concentração (µg/L)	Nº de indivíduos analisados	Nº de células analisadas	Anucleada	Apoptose	Célula Binucleada	Broto nuclear	Núcleo com Cariólise	Núcleo Entalhado	Núcleo Lobado	Microcitose	Núcleo Vacuolizado
Controle	15	16067	8 (0,049)	14 (0,08)	18 (0,11)	1 (0,006)	3 (0,01)	5 (0,03)	0 (0)	6 (0,037)	5 (0,03)
500	15	15440	17 (0,11)	92 (0,59)	63 (0,40)	10 (0,06)	34 (0,22)	712* (4,6)	54* (0,34)	336* (2,17)	110* (0,71)
700	15	15365	82* (0,53)	138 (0,89)	34 (0,22)	79* (0,51)	76 (0,49)	629* (4,09)	66* (0,42)	298* (1,93)	100* (0,65)
1000	15	15511	166* (1,07)	544* (3,50)	259* (1,66)	170* (1,09)	298* (1,92)	751* (4,84)	107* (0,68)	389* (2,50)	224* (1,44)

* significativo em relação ao controle, ANOVA e Dunnett's (p<0,01 ou p<0,05), tabela 2

Tabela 3 – Resultados da ANOVA e Dunnett`s para Micronúcleo e outras Anormalidades Eritrocítica Nuclear (ENAs) em girinos de *Physalaemus cuvieri* e *Physalaemus gracilis*.

<i>Physalaemus cuvieri</i>	Valor de F	Valor de P (ANOVA)	Valor de P (Dunett)
Micronúcleo	F (3, 54) = 4,7818	p< 0,01	p<0,01
Anucleada	F (3, 54) =25,327	p<0,01	p<0,01
Apoptose	F (3, 54) =71,631	p<0,01	p<0,01
Célula Binucleada	F (3, 54) =16,347	p<0,01	p<0,01
Broto nuclear	F (3, 54) =12,845	p<0,01	p<0,05
Núcleo com Cariólise	F (3, 54) = 42,106	p<0,01	p<0,01
Núcleo Entalhado	F (3, 54) =33,756	p<0,01	p<0,01
Núcleo Lobado	F (3, 54) =163,19	p<0,01	p<0,01
Microcitóse	F (3, 54) =37,733	p<0,01	p<0,01
Núcleo Vacuolizado	F (3, 54) =13,481	p<0,01	p<0,01
<i>Physalaemus gracilis</i>	Valor de F	Valor de P (ANOVA)	Valor de P (Dunett)
Micronúcleo	F (3, 56) =3,4054	p< 0,01	p<0,01
Anucleada	F (3, 56) =31,500	p<0,01	p<0,01
Apoptose	F (3, 56) =29,947	p<0,01	p<0,01
Célula Binucleada	F (3, 56) =15,874	p<0,01	p<0,01
Broto nuclear	F (3, 56) =75,448	p<0,01	p<0,01
Núcleo com Cariólise	F (3, 56) =14,747	p<0,01	p<0,01
Núcleo Entalhado	F (3, 56) =15,443	p<0,01	p<0,01
Núcleo Lobado	F (3, 56) =8,0471	p<0,01	p<0,05
Microcitóse	F (3, 56) =10,853	p<0,01	p<0,01
Núcleo Vacuolizado	F (3, 56) =8,9846	p<0,01	p<0,05

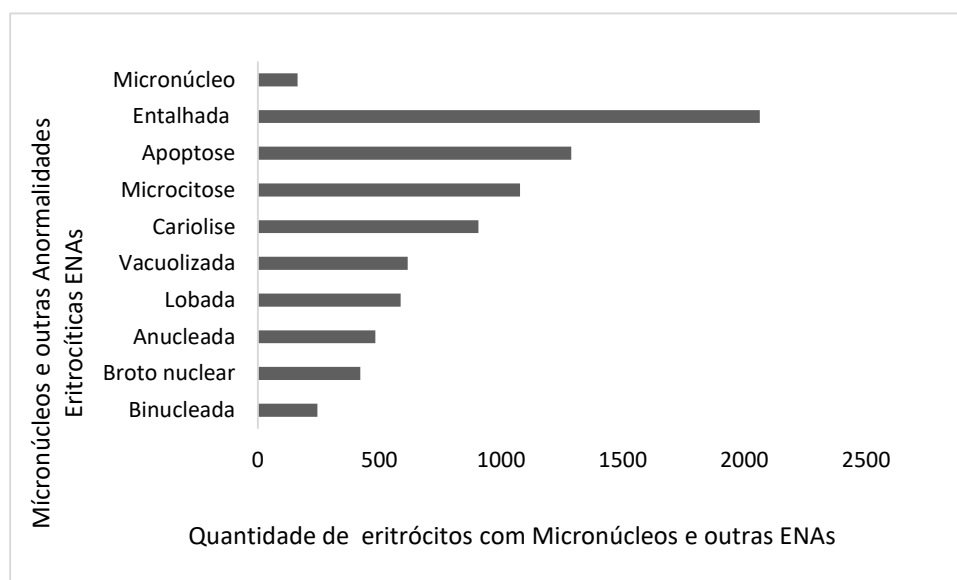


Figura 4 – Micronúcleo e Anormalidades Nucleares Eritrocitárias (ENAs) detectadas em girinos de *Physalaemus cuvieri*.

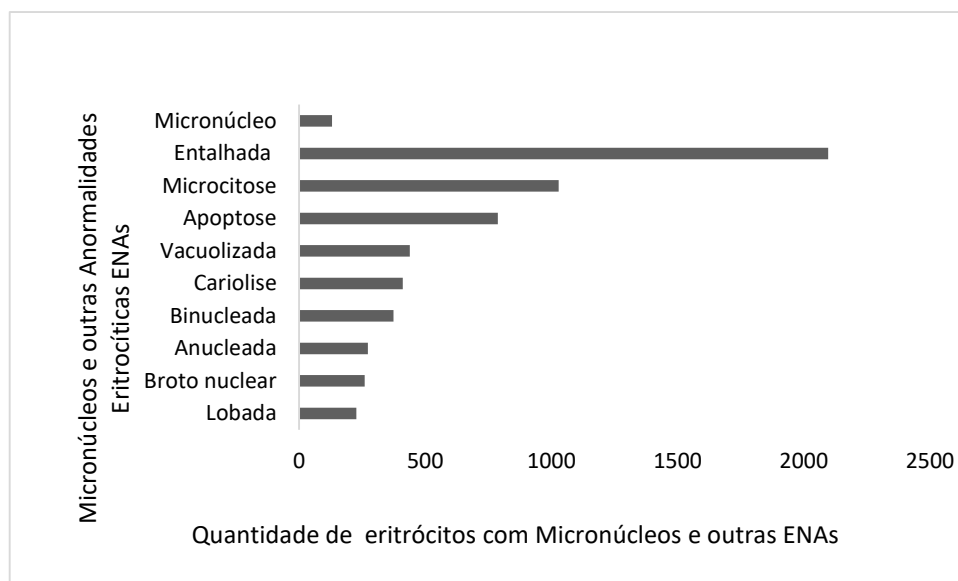


Figura 5 – Micronúcleo e Anormalidades Nucleares Eritrocitárias (ENAs) detectadas em girinos de *Physalaemus gracilis*.

Em relação ao controle, todas as concentrações foram significativas para ENAs nas duas espécies, bem como, quanto maior a concentração mais alterações nucleares eritrocíticas foram observadas (*P. cuvieri* $F_{(3, 54)} = 61,365$, $p < 0,01$ e *P. gracilis* $F_{(3, 56)} = 42,438$, $p < 0,01$ Dunnett's $p < 0,001$) (Tabela 1 e 2; Figuras 6 e 7).

Analisando-se todas as anormalidades em conjunto a quantidade de ENAs encontradas foi significativa na maior concentração testada, $1000 \mu\text{g/L}$ para as duas espécies (*P. cuvieri* = $F_{(2, 40)} = 41,740$, $p < 0,01$ e *P. gracilis* = $F_{(2, 42)} = 19,634$, $p < 0,01$, Tukey $p < 0,001$, Figuras 6 e 7).

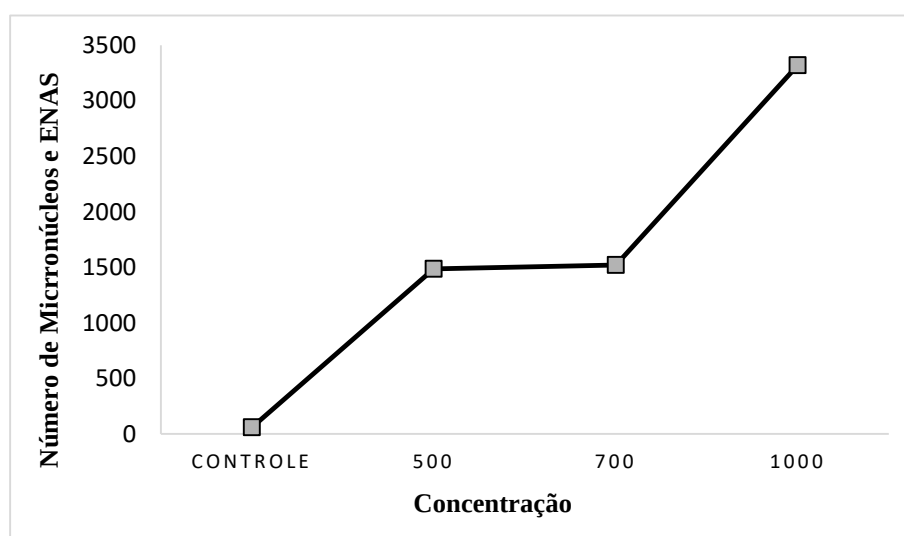


Figura 6 – Micronúcleos e Anormalidades eritrocitárias (ENAs) em girinos de *Physalaemus gracilis* expostos a diferentes concentrações de Glifosato, comparados ao controle.

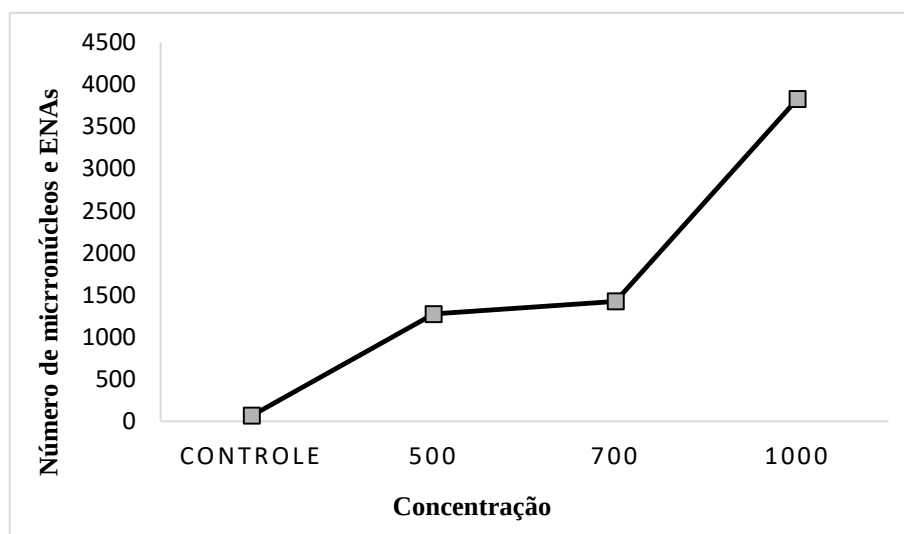


Figura 7 – Micronúcleos e Anormalidades eritrocitárias (ENAs) em girinos de *Physalaemus cuvieri* expostos a diferentes concentrações de Glifosato, comparados ao controle.

Somente a maior concentração 1000µg/L foi significativa para Micronúcleo e todas as ENAs. Algumas ENAs foram significativas a partir de 500µg/L, tanto para *P. cuvieri* (Tabela 2, 3; Figura 8) e *P. gracilis* (Tabela 2, 3; Figura 9). A frequência de ENAs observadas aumentou conforme a concentração testada nas duas espécies (Figuras 8 e 9).

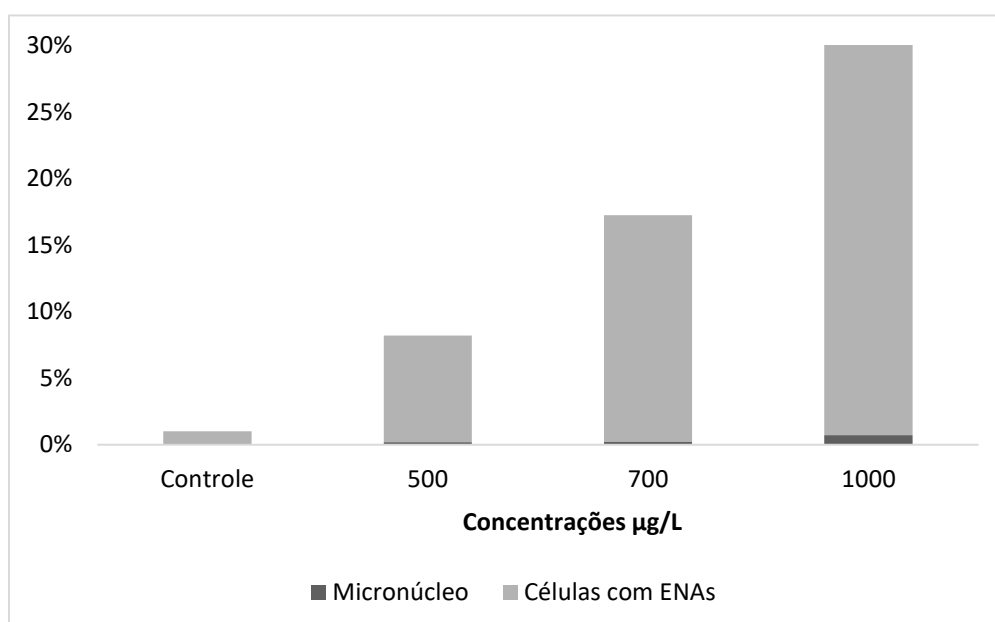


Figura 8 – Frequência de células com Micronúcleo e com outras anormalidades nucleares em *Physalaemus cuvieri* expostos a diferentes concentrações de Glifosato.

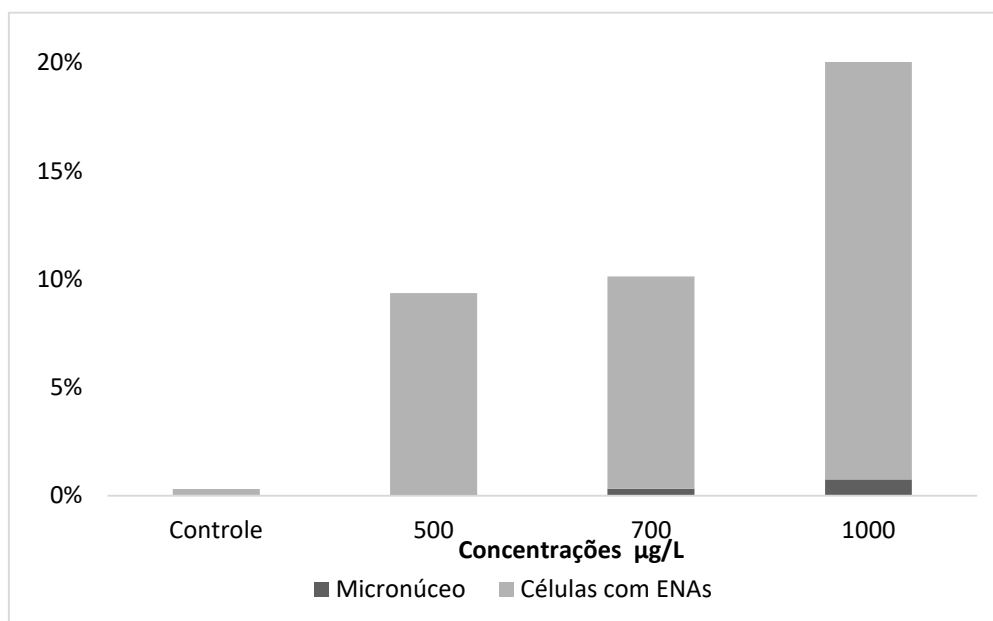


Figura 9 – Frequência de células com Micronúcleo e com outras anormalidades nucleares em *Physalaemus gracilis* expostos a diferentes concentrações de Glifosato.

Análise De Risco Ecológico

A partir dos valores de NOAEC e LOAEL para Micronúcleo e cada tipo de anormalidade nuclear, foi calculado a Máxima Concentração Aceitável para o Toxicante (MATC). Essa concentração variou de 600 µg/L a 850 µg/L para as duas espécies (Tabela 4).

A análise de risco crônico, para Micronúcleo e cada ENA variou de 3,08 a 4,3 para as duas espécies. Estes valores estão acima de $LOC > 1$ para todas as ENAs observadas neste estudo (Tabela 4).

Tabela 4 –Valores de NOAEC, LOAEL, MATC e Risco crônico ecológico (HQ) para Micronúcleo e outras Anormalidades Nucleares Eritrocíticas (ENAs) observadas para cada espécie.

<i>Physalaemus cuvieri</i>	NOAEC (µg/L)	LOAEL(µg/L)	MATC(µg/L)	(HQ)
Micronúcleo + outras anormalidades nucleares	500	700	600	4,3
Micronúcleo	500	700	600	4,3
Célula Anucleada	700	1000	850	3,08
Apoptose	500	700	600	4,3
Núcleo Binucleado	700	1000	850	3,08
Núcleo com Broto	700	1000	850	3,08
Cariólise	500	700	600	4,3
Núcleo entalhado	500	700	600	4,3
Núcleo Lobado	700	1000	850	3,08
Microcitóse	500	700	600	4,3
Núcleo Vacuolizado	500	700	600	4,3
<i>Physalaemus gracilis</i>	NOAEC (µg/L)	LOAEL(µg/L)	MATC(µg/L)	(HQ)
Micronúcleo + outras anormalidades nucleares	500	700	600	4,3
Micronúcleo	700	1000	850	3,08
Célula Anucleada	500	700	600	4,3
Apoptose	500	700	600	4,3
Núcleo Binucleado	500	700	600	4,3
Núcleo com Broto	500	700	600	4,3
Cariólise	500	700	600	4,3
Núcleo entalhado	500	700	600	4,3
Núcleo Lobado	500	700	600	4,3
Microcitóse	500	700	600	4,3
Núcleo Vacuolizado	500	700	600	4,3

DISCUSSÃO

O Glifosato induziu a formação de Micronúcleo e de várias alterações nucleares eritrocíticas (ENAs) nas duas espécies de *Physalaemus* testadas. Desta forma, pode ser considerado um agente tóxico capaz de causar efeitos genotóxicos em anfíbios. Isso concorda com estudos que indicam que o Glifosato em suas formulações comerciais são capazes de induzir efeitos genotóxicos em peixes, minhocas, camundongos e humanos (e.g. Cavalcante et al. 2008; Bolognesi et al. 2009; Prasad et al. 2009; Guilherme et al. 2012; Koller et al. 2012; Muangphra et al. 2012).

Apesar de existirem poucos estudos avaliando a genotoxicidade de pesticidas em anfíbios (Cabagna et al. 2006; Yin et al. 2008; Giri et al. 2012; Lajmanovich et al. 2014), alguns estudos classificam o Glifosato em sua formulação comercial Roundup como clastogênico capaz de ocasionar danos genotóxicos em girinos (Clements et al. 1997; Latorre e López-González et al. 2015; Schaumburg et al. 2016). O Glifosato pode ser capaz de induzir estresse oxidativo, através da acumulação de acetilcolina nas fendas sinápticas, o que gera radicais livres e alterações no sistema antioxidante (Blasiak et al. 1999; Shadnia et al. 2005; Lushchak 2011). As consequências deletérias primárias do estresse oxidativo provavelmente surgem de danos ao DNA, as alterações juntas formam um mecanismo potencial de genotoxicidade (Wang et al. 1998; Watt et al. 2007).

Estudos com anfíbios anuros tem demonstrado indução de Micronúcleos em eritrócitos como consequência da exposição a agrotóxicos (Bouhafs et al. 2009; Lajmanovich et al. 2014; Nikoloff et al. 2014). As duas espécies analisadas neste estudo tiveram sensibilidade diferente em relação a concentração testada. Todas as concentrações foram capazes de induzir alguma anormalidade eritrocítica, principalmente nas concentrações mais altas, o que reforça as propriedades genotóxicas do Glifosato em sua formulação comercial para anfíbios anuros, em concentrações encontradas no ambiente e permitidas pela legislação.

Além do Micronúcleo, as outras anormalidades nucleares encontradas, também significam dano à célula. A formação de Núcleo Entalhado nas células foi a anormalidade nuclear eritrocítica mais frequente para as duas espécies, porém, o mecanismo exato de formação desta anormalidade, ainda é desconhecido (López-González 2017). Mesmo assim, este tipo de alteração sempre ocorre induzida por compostos genotóxicos, podendo ocorrer sozinha, na ausência de Micronúcleos ou em correlação com Micronúcleos e outras anormalidades (Ayllon e Garcia -Vasquez 2000; Kirschbaum et al. 2009).

Uma possibilidade de explicação para esta anormalidade, bem como para outras que tornam os núcleos celulares imperfeitos, pode ser explicadas por alguns autores, como um investimento para eliminar danos genéticos, em situações de estresse ou exposição a químicos (Shimizu 1998, 2000; Fijan 2002). Neste sentido sempre que é detectado um dano genético na célula, inicia-se um processo de recuperação e eliminação da cromatina excedente. A região alterada é então movida fora do núcleo e eliminada pela exocitose. Antes de o processo ser concluído, a membrana nuclear apresenta imperfeições (Carrasco et al. 1990; Prieto et al. 2008; Fenech et al. 2011). Portanto autores tem considerado estas anormalidades como indicadores de danos genotóxicos (Cavas e Ergene-

Gözükara 2003; Ray et al. 2005; Arcaute et al. 2014; Pollo et al. 2015; Burella et al. 2016; Schaumburg et al. 2016).

Entre as ENAs mais frequentes encontradas em nosso estudo ainda estão Núcleos Microcíticos. Há evidências de que Núcleos Microcíticos também se formam como uma estratégia para manter a integridade da célula, eliminando o material genético excedente. Dessa forma, o núcleo se condensa diminuindo a proporção do material genético nuclear (Souza e Fontanetti 2006; Lajmanovoich 2014). Esta situação de condensação de núcleo parece ser um sinal claro de uma resposta a lesões no material genético nuclear (Ray et al. 2005). É provável que Núcleos Microcíticos estejam associados também à apoptose das células, que se programam para morrer eliminando danos (Saqib et al. 2012).

Águas poluídas com substâncias químicas, principalmente provenientes de resíduos de pesticidas, tornam-se hipóxias (Barni et al. 2007). Na tentativa de aumentar a capacidade de transporte de oxigênio neste tipo de água, pode ocorrer uma divisão celular direta (amitose) em anfíbios, isto pode gerar células com núcleos lobados, bilobados ou até mesmo células anucleadas (Glomski et al. 1997; Barni et al. 1995, 2002, 2007).

Todas as concentrações testadas foram capazes de causar ENAs, principalmente na concentração mais alta 1000µg/L. Neste sentido, há uma grande preocupação, já que as concentrações testadas ainda são baixas comparadas ao que já foi encontrado em águas da América do Sul, entre 1430 e 2160µg/L (Rodrigues e Almeida 2005; Govindarajulu 2008; Aparicio 2013; Primost 2017). A Máxima Concentração de Toxicante (MATC) de Glifosato para as Alterações Nucleares Eritrocíticas (ENAs) variaram de 600 a 850µg/L, ou seja, abaixo de 1000µg/L e com valores dentro de níveis ambientais já registrados em águas superficiais do Brasil e outros países (Austrália, 10000µg/L Mann e Bidwell 1999; Estados Unidos, 7600µg/L Giesy et al. 2000; Brasil, 2160µg/L Rodrigues e Almeida 2005; Argentina, 700µg/L Peruzzo 2008). Outra questão importante é que a maioria das ENAs poderia ser causada em concentrações de Glifosato a partir de 600µg/L. Essa concentração está próxima do que é permitido pela legislação Brasileira em água potável (500µg/L, Ministério da Saúde 2011) e muito menor do que já foi encontrado em águas semelhantes ao habitat das duas espécies em estudo (Rodrigues e Almeida 2005).

O ensaio de Micronúcleo pode ser utilizado para avaliação de risco (Hayashi 2016). Analisando o Coeficiente de Risco Crônico (HQ) para todas as anormalidades nucleares em relação aos valores de referência da USEPA o Glifosato apresenta risco ambiental para genotoxicidade. Ou seja, as concentrações ambientais de Glifosato testadas têm risco genotóxico para *P. cuvieri* e *P. gracilis* e possivelmente para outras espécies de anfíbios.

CONCLUSÃO

De acordo com nossos resultados o uso de Micronúcleos e demais ENAs se mostraram sensíveis a determinação de danos genotóxicos. Nossos dados mostraram que todas as concentrações de Glifosato testadas foram capazes de induzir imperfeições nos núcleos celulares, representando assim danos citotóxicos e genotóxicos nas duas espécies de *Physalaemus* testadas.

Mesmo em concentrações baixas, inclusive menores do que é encontrado em ambiente natural da América do Sul ou permitido pela legislação Brasileira, houve uma grande diferença em relação ao controle e as concentrações testadas. Isso impacta significativamente na sobrevivência de espécies que habitam ecossistemas aquáticos contaminados.

Tendo em vista o amplo uso das formulações comerciais de Glifosato nas lavouras e as concentrações encontradas em ambiente natural, pode-se considerar que esse herbicida oferece risco em potencial, principalmente em relação a integridade genética das populações nativas de determinadas espécies de anfíbios, particularmente à espécie *P. cuvieri* e *P. gracilis*.

REFERÊNCIAS

- Achaval F, Olmos A (2003) Anfíbios y Reptiles del Uruguay. In: Achaval, F; Olmos, A. Anfíbios y reptiles del Uruguay, Facultad de Ciencias. Montevideo, Uruguay, pp 136 (in Spanish)
- Adams MJ, Miller DAW, Muths E, Corn PS, Grant EHC, Bailey LL, Fellers GM, Fisher RN, Sadinski WJ, Waddle H, Walls SC (2013) Trends in amphibian occupancy in the United States. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0064347>. Accessed in 3 november 2017
- Adams SM, Giesy JP, Tremblay LA, Easin CT (2001) The use of biomarker in risk assessment: recommendations from the Christchurch conference on biomarkers in ecotoxicology. *Biomarkers* 6:1-6
- Adams SM, Greeley MS, Ryon MG (2000) Evaluating effects of contaminants on fish health at multiple levels of biological organization: extrapolating from lower to higher levels. *Human and Ecological Risk Assessment* 6:15-27. doi:10.1080/10807030091124428
- USEPA - United States Environmental Protection Agency (2016) Technical Overview of Ecological Risk Assessment: Risk Characterization About Risk Characterization. <https://www.epa.gov/pesticide-science-and-assessing-pesticide-risks/technical-overview-ecological-risk-assessment-risk>. Accessed in 10 September 2017
- Al-Sabti K, Hardig J (1990) Micronucleus test in fish for monitoring the genotoxic effects of industrial waste products in the Baltic Sea, Sweden. *Comparative Biochemistry and Physiology* 97:179-182. doi:10.1016/0742-8413(90)90189-G
- Al-Sabti K, Metcalfe CD (1995) Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutat Res* 343:121-135
- Amarante JOP, Santos TCR, Brito NM, Ribeiro ML (2002) Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. *Química Nova* 25:589-593. doi:10.1590/S0100-40422002000400014 (in Portuguese)
- Anderson JD, Graham RE (1967) Vertical migration and stratification of larval *Ambystoma. copeia*. 371-374

Anderson JD, Williamson GK (1974) Nocturnal stratification in larvae of the mole salamander, *Ambystoma talpoideum*. *Herpetologica* 30:28-29

Aparicio VC, De Gerónimo E, Marino D, Primost J, Carriquiriborde P, Costa JL (2013) Environmental fate of glyphosate and aminomethyl phosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins. *Chemosphere* 93:1866-73. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.06.041

Arcaute CR, Pérez IJM, Nikoloff N, Natale GS, Natale S, Soloneski S, Larramendy ML (2014) Genotoxicity evaluation of the insecticide imidacloprid on circulating blood cells of Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae) by comet and micronucleus bioassays. *Ecological Indicators* 45:632–639. doi: 10.1016/j.ecolind.2014.05.034

Attademo AM, Cabagna A, Zenklusen M, Lajmanovich RC, Peltzer PM, Junges CM, Bassó A (2011) Atividades de B-esterase e morfologia das células sangüíneas na rã *Leptodactylus chaquensis* (Amphibia: Leptodactylidae) em agroecossistemas de arroz de Santa Fé Província (Argentina). *Ecotoxicologia* 20:274-282

Ayllon F, Garcia-Vazquez E (2000) Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. *Mutat Res* 467:177–186.

Bagchi D, et al (1995) In vitro and in vivo generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. *Toxicol* 104:129–140.

Baorong G, Ling LIN, Qiu Jin Z, Bijin Z (2010) Genotoxicity of the Pesticide Dichlorvos and Herbicide Butachlor on *Rana zhenhaiensis* Tadpoles. *Asian Herpetological Res* 1:118-122. doi:10.3724/SP.J.1245.2010.00118

Barni S, Boncompagni E, Grosso A, Bertone V, Freitas I, Fasola M, Fenoglio C (2007) Evaluation of *Rana esculenta* blood cell response to chemical stressors in the environment during the larval and adult phases. *Aquat Toxicol* 15:45–54

Barni S, Fraschini A, Prosperi E, Vaccarone V, Bernini F (1995) Possible occurrence of amitotic cell division during haemopoiesis in the Urodele. *Comp Haematol Int* 45:183–188

Barni S, Vaccarone R, Bertone V, Fraschini A, Bernini F, Fenoglio C (2002) Mechanisms of changes to the liver pigmentary component during the annual cycle (activity and hibernation) of *Rana esculenta* L. *J Anat* 200:185–194. doi: 10.1046/j.0021-8782.2001.00011.x

Barreto L, Andrade GV (1995) Aspects of the reproductive biology of *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leptodactylidae) in northeastern Brazil. *Amphibia - Reptilia* 16: 67-76. doi: 10.1163/156853895X00208

Bernal MH, Solomon KR, Carrasquilla G (2009) Toxicity of formulated glyphosate (glyphos) and cosmo-flux to larval and juvenile colombian frogs. Field and laboratory microcosm acute toxicity. *J. Toxicol. Environ. Health. A.* 72:966-73. doi:10.1080/15287390902929717

Besten PJ, Munawar M (2005) Ecotoxicological testing of marine and freshwater ecosystems: emerging techniques, trends and strategies. Taylor e Francis Group. London, New York

Blasiak J, Jalszynski P, Trzeciak A, Szyfte K (1999) In vitro studies on the genotoxicity of the organophosphorus insecticide malathion and its two analogues. *Mutat. Res.* 30:275-283

Bolognesi C, Carrasquilla G, Volpi S, Solomon KR, Marshall EJ (2009) Biomonitoring of genotoxic risk in agricultural workers from five Colombian regions: association to occupational exposure to glyphosate. *J of Toxicology and Environ Health* 72:986-997. doi: 10.1080/15287390902929741

Bolognesi C, Frenzilliv G, Lasagna C, Perrone E, Roggieri P (2004) Genotoxicity biomarkers in *Mytilus galloprovincialis*: wild versus caged mussels. *Mutat. Res.* 552:187-196. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2004.06.012

Bolognesi C, Landini E, Roggieri P, Fabbri R, Viarengo A (1999) Genotoxicity biomarkers in the assessment of heavy metal effects in mussels: experimental studies. *Environ. Mol. Mutagen.* 33:287–292. doi: 10.1002/(sici)1098-2280(1999)33:4<287: aid-em5>3.0.co;2-g

Bolognesi C, Perrone E, Roggieri P, Pampanin DM, Sciutto A (2006) Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. *Aquat Toxicol.* 1 pp 93-8. doi: 10.1016/j.aquatox.2006.02.015

Bouhafs N, Berrebbah H, Devaux A, Rouabhi R, Djebbar M (2009) Micronucleus Induction in Erythrocytes of Tadpole *Rana saharica* (Green Frog of North Africa) Exposed to Artea 330EC. American-Eurasian J of Toxicologic Sciences 1:07-12

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria MS nº 2414, de 12 de dezembro de 2011. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. Brasília. http://site.sabesp.com.br/uploads/file/asabesp_doctos/kit_arsesp_portaria2914.pdf.

Accessed in 02 september 2017

Brühl CA, Pieper S, Weber B (2011) Amphibians at risk? Susceptibility of terrestrial amphibian life stages to pesticides. Environ Toxicol Chem 30:2465-2472. doi: 10.1002/etc.650

Burella P, Simoniello MF, Poletta GL (2016) Evaluations of stage-dependent genotoxic effect of Roundup® (glyphosate) on *Caiman latirostris* embryos. Environ Contamination and Toxicology 72. doi:10.1007/s00244-016-0311-7

Cabagna MC, Lajmanovich RC, Peltzer PM, Attademo ASM, Ale E (2006) Induction of micronuclei in tadpoles of *Odontophrynus americanus* (Amphibia: Leptodactylidae) by the pyrethroid insecticide cypermethrin. Toxicological Environmental Chemistry; 88 (4): 729–737

Caliani I, Campani T, Giannetti M, Marsili L, Casini S, Fossi MC (2014) First application of comet assay in blood cells of Mediterranean loggerhead sea turtle *Caretta*. Mar. Environ Res 96:68–72. doi: 10.1016/j.marenvres.2013.09.008

Calviello G, Piccioni E, Boninsegna A, Tedesco B, Maggiano N, Serini S, Wolf FI, Palozza P (2006) DNA damage and apoptosis induction by the pesticide Mancozeb in rat cells: involvement of the oxidative mechanism. Toxicology and Applied Pharmacology 211:87–96.

Camargo A, Sarroca M, Maneyro R (2008) Reproductive effort and the egg number vs. size tradeoff in *Physalaemus frogs* (Anura: Leiuperidae). Acta Oecologica 34: 163-171. doi: 10.1016/j.actao.2008.05.003

Campana MA, Panzeri AM, Moreno VJ, Dulour FN (2003) Micronuclei induction of *Rana catesbeiana* tadpoles by the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. *Genetics and Molecular Biology* 26:99–103

Carrasco KR, Tilbury KL, Myers MS (1990) Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. *J. Fisheries and Aquatic Sciences* 47:2123–2136

Cavas T, Ergene-Gözükar S (2003) Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluents. *Mutation Res* 538:81–91

Cavalcante DGSM, Martinez CBR, Sofia SH (2008) Genotoxic effects of Roundup on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutation Res* 655:41–6. doi: 10.1016/j.mrgentox.2008.06.010

Clements C, Ralph S, Petras M (1997) Genotoxicity of select herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using the alkaline single-cell gel DNA electrophoresis (comet) assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 29:277–288. doi: 10.1002/(sici)1098-2280(1997)29:3<277: aid-em8>3.0.co;2-9

Da Silva TS, Fontanetti CS (2006) Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of *Nile tilapia* exposed to waters affected by refinery effluent. *Mutation Res* 16:87-93. doi: 10.1016/j.mrgentox.2006.02.010

De Flora S, Vigano L, D'Agostini F, Camoirano A, Bagnasco M, Bennicelli C, Melodia F, Arillo A (1993) Multiple genotoxicity biomarkers in fish exposed in situ to polluted river water. *Mutation Res* 319:167–177

Duke SO, Powles SB (2008) Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Management* 64:319-25. doi: 10.1002/ps.1518

Edge CB, Thompson DG, Hao C, Houlahan JE (2012) A silviculture application of the glyphosate-based herbicide VisionMAX to wetlands has limited direct effects on amphibian larvae. *Environ Toxicol Chem* 31:2375-83. doi: 10.1002/etc.1956

Egea-Serrano A, Relyea RA, Tejedo M, Torralva M (2012) Understanding of the impact of chemicals on amphibians: a meta-analytic review. *Ecol Evol* 2:1382-97. doi: 10.1002/ece3.249

Fenech M, Kirsch-Volders M, Natarajan AT; Surralles J, Crott JW, Parry J, Norppa H, Eastmond DA, Tucker JD, Thomas P (2011) Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells, *Mutagenesis*, 26, 125–132, <https://doi.org/10.1093/mutage/geq052>

Feng S, Kong Z, Wang X, Zhao L, Peng P (2004) Acute toxicity and genotoxicity of two novel pesticides on amphibian, *Rana N. Hallowell* *Chemosphere* 56:457–63. doi: 10.1016/j.chemosphere.2004.02.010

Fijan N (2002) Morphogenesis of blood cell lineages in channel catfish. *J of Fish Biology* 60:999–1014. doi:10.1006/jfbi.2002.1909

Frenzilli G, Nigro M, Lyons BP (2009) The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutation Res* 681: 80-92. doi: 10.1016/j.mrrev.2008.03.001

Frost DR (2017) Amphibian species of the world: an online reference. American Museum of Natural History, New York. <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia>. Accessed in 10 september 2017

Furnus GNA, Caffetti JD, García EM, Benítez MF, Pastori MC, Fenocchio AS, (2014) Baseline micronuclei and nuclear abnormalities frequencies in ative fishes from the Paraná River (Argentina). *Brazilian J of Biology* 74:217–221. doi:10.1590/1519-6984.13712

Giesy J, Dobson S, Solomon K (2000) Ecotoxicological Risk Assessment for Roundup® Herbicide. *Rev Environ Contam Toxicol* 167:35-120

Giri A, Yadav SS, Giri S, Sharma GD (2012) Effect of predator stress and malathion on tadpoles of *Indian skittering* frog. *Aquatic Toxicology* 15:106–107, 157–163. doi: 10.1016/j.aquatox.2011.11.008

Gökalp-Muranli FD; Güner U (2011) Indução de Micronúcleos e anormalidades nucleares em eritrócitos de mosquitos *Gambusia affinis* após exposição ao inseticida piretrópicolambda-cialotrina, Mutat. Res. 726 104-108

Glomski CA, Tamburlin J, Hard R, Chainani M (1997) The phylogenetic odyssey of the erythrocyte. IV. The amphibians, Histol. Histopathol. 12:147–170

Gouvernement (2017). Glyphosate: rather than a sudden, outright ban, there will be a gradual phasing-out of pesticides posing a risk to health or biodiversity. <http://www.gouvernement.fr/en/glyphosate-rather-than-a-sudden-outright-ban-there-will-be-a-gradual-phasing-out-of-pesticides> Accessed in 10 October de 2017

Gonçalves WM, Oliveira HHP, Carvalho WF, Silva DM, Nomura F, Bastos RP, Da Cruz AD (2012) Análises Mutagênicas de anuros em áreas de mineração de níquel estudos, Goiânia 339:115-121

Govindarajulu PP (2008) Literature review of impacts of glyphosate herbicide on amphibians: What risks can the silvicultural use of this herbicide pose for amphibians in B.C.? Ministry of Environment, Victoria, BC. Wildlife Report 28

Guilherme S, Gaivao I, Santos MA, Pacheco M (2012) DNA damage in fish (*Anguilla anguilla*) exposed to a glyphosate-based herbicide – elucidation of organ-specificity and the role of oxidative stress. Mutation Research 743:1–9. doi: 10.1016/j.mrgentox.2011.10.017

Gutiérrez JM, Villar S, Lavan AA (2014) Micronucleus test in fishes as indicators of environmental quality in subestuaries of the Río de la Plata (Uruguay). Marine Pollution Bulletin 91:518–523. doi: 10.1016/j.marpolbul.2014.10.027

Hayashi M (2016) The micronucleus test—most widely used *in vivo* genotoxicity test Genes Environ. 2016; 38: 18. Published online 2016 Oct 1. doi: 10.1186/s41021-016-0044-x

Hayes TB, Khoury V, Narayan A, Nazir M, Park A, Brown T (2010) Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs *Xenopus laevis*. Current issue 107:4612-4617 doi: 10.1073/pnas.0909519107

Hayes TB, Stuart AA, Mendoza M, Collins A, Noriega N, Vonk A, Johnston G, Liu R, Kpodzo D (2006) Characterization of atrazine induced gonadal malformations and effects

of an androgen antagonist (cyproterone acetate) and exogenous estrogen (estradiol 17 β): support for the demasculinization/feminization hypothesis. *Environ Health Perspect* 114:134-141. doi:10.1289/ehp.8067

Helander M, Saloniemi I, Saikkonen K (2012) Glyphosate in northern ecosystems. *Trends in Plant Science* 17:569–574. doi: 10.1016/j.tplants.2012.05.008

Howe CM, Berrill M, Pauli BD, Helbing CC, Werry K, Veldhoen N (2004) Toxicity of glyphosate-based pesticides to four north American frog species. *Environmental Toxicology and Chemistry* 8:1928–1938

Huang D, Zhang Y, Wang Y, Xie Z, Ji W (2007) Assessment of the genotoxicity in toad *Bufo raddei* exposed to petrochemical contaminants in Lanzhou Region, China. *Mutation Res* 629:81-8. doi:10.1016/j.mrgentox.2007.01.007

IUCN - International Union for Conservation of Nature Red List of Threatened Species. 2014. <http://www.iucnredlist.org>. Accessed in 15 may 2017

IUCN - International Union for Conservation of Nature Red List of Threatened Species. 2009. <http://www.iucnredlist.org>. Accessed in 14 april 2017

Jones DK, Hammond JI, Relyea RA (2010) Roundup and amphibians: the importance of concentration, application time, and stratification *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29: 2016–2025

Kirschbaum AA; Seriani R; Pereira CDS; Assunção A; Abessa DMS; Rotundo MM; Ranzani-Paiva MJT (2009) Cytogenotoxicity biomarkers in fat snook *Centropomus parallelus* from Cananéia and São Vicente estuaries, São Paulo, Brazil. *Genet. Mol. Biol.* 32 (1), 151–154

King JJ, Wagner RS (2010) Toxic Effects of the Herbicide Roundup® Regular on Pacific Northwestern Amphibians. *Northwest. Nat.* 91:318–324. doi:10.1898/NWN09-25.1

Koller VJ, Furrhacker M, Nersesyan A, Mišík M, Eisenbauer M, Knasmueller S (2012) Cytotoxic and DNA-damaging properties of glyphosate and Roundup in human-derived buccal epithelial cells. *Archives of Toxicology* 86:805–813. doi: 10.1007/s00204-012-0804-

Lajmanovich RC, Cabagna-Zenklusen MC, Attademo AM, Junges CM, Peltzer PM, Bassó A, Lorenzatti E (2014) Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in tadpoles of the common toad *Rhinella arenarum* treated with the herbicides Liberty® and glufosinate-ammonium. *Mutation Research* 769:7-12. doi: 10.1016/j.mrgentox.2014.04.009

Lannoo MJ, Petersen C, Lovich RE, Nanjappa P, Phillips C, Mitchell JC, Macallister I (2011) Do frogs get their kicks on Route 66? Continental U.S. transect reveals spatial and temporal patterns of *Batrachochytrium dendrobatidis* infection. *Plos One* 7. doi:10.1371/journal.pone.0022211

Latorre MA; López-González CE; Siroski PA; Poletta GL (2015) Frequência basal de Micronúcleos e parâmetros hematológicos na Tartaruga de pescoço lateral, *Phrynops hilarii* (Duméril & Bibron, 1835), 2015. *Acta Herpetol.* 10 (1), 31 - 37. [http:// dx.doi.org/10.13128/Acta_Herpetol-14988](http://dx.doi.org/10.13128/Acta_Herpetol-14988)

Lavilla E, Kwet A, M, Segalla MV, Langone J, Baldo D (2010) *Physalaemus gracilis*, The IUCN Red List of Threatened Species 2010: <http://www.iucnredlist.org/details/57258/0>. Accessed in 6 november 2017

Lavorato M, Bernabó I, Crescente A, Denoël M, Tripepi S, Brunelli E (2013) Endosulfan effects on *Rana dalmatina* tadpoles: quantitative developmental and behavioural analysis. *Environ Contamination and Toxicology* 64:253-262. doi: 10.1007/s00244-012-9819-7

López-González EC, Larriera A, Siroski PA, Poletta GL (2017) Micronuclei and other nuclear abnormalities on *Caiman latirostris* (Broad-snouted caiman) hatchlings after embryonic exposure to different pesticide formulations. *Ecotoxicol Environ Saf* 136:84-91. doi: 10.1016/j.ecoenv.2016.10.035

Lushchak VI (2011) Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology* 101:13–30. doi: 10.1016/j.aquatox.2010.10.006

Macagnan N, Rutkoski CF, Kolcenti C, Vanzetto GV, Macagnan LP, Sturza PF, Hartmann PA, Hartmann MT (2017) Toxicity of cypermethrin and deltamethrin insecticides on embryos and larvae of *Physalaemus gracilis* (Anura:Leptodactylidae). *Environ Science and Pollut Res* 24:20699-20704. doi:10.1007/s11356-017-9727-5

Mann RLV, Bidwell JR, (1999) The toxicity of glyphosate and several glyphosate formulations to four species of southwestern Australian frogs 36:193-9

Mann RM, Bidwel JR The acute toxicity of agricultural surfactants to the tadpoles of four Australian and two exotic frogs. *Environ Pollut* 114. 195 – 205

Mann RM; Hyne RV; Choung CB; Wilson SP (2009) Amphibians and agricultural chemicals: Review of the risks in a complex environment. *Environmental Pollution*, v. 157, p. 2903-2927

Marangio MS (1975) Phototaxis in larvae and adults of the marbled salamander *Ambystoma opacum*, *J herpetol* 9:293-297

Martinez CBR, Souza MM (2002) Acute effects of nitrite on ion regulation in two neotropical fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology* 133:151–160

Martins L, Paz VA, Brentano DM (2010) Avaliação da Geração de Micronúcleo em Junvenis de *Centropomus paralellus* (Rabalo-Peva) Expostos a Diferentes Concentrações Salinas. *Revista Técnico Científica* 2:13–16. (in Portuguese)

Mcdiarmid RW, Altig R (1999) Diversity. Familial and generic characterizations. In Mcdiarmid RW and Altig R (editors), *Tadpoles. The biology of anuran larvae*: 295–337. Chicago: The University of Chicago Press

Mercurio P, Flores F, Mueller JF, Carter S, Negri AP (2014) Glyphosate persistence in seawater. *Mar. Pollut. Bull.* 85:385-390

Metcalf CD (1988) Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in the erythrocytes of mudminnow *Umbra limi*. And brown bullheads *Ictalurus nebulosus*, *Bull. Environ. Contam. Toxicol* 40:489–495. doi:10.1007/BF01688371

Meza-Joya FL, Ramírez-Pinilla MP, Fuentes-Lorenzo JL (2013) Toxic, cytotoxic, and genotoxic effects of a glyphosate formulation (Roundup®SL-Cosmoflux®411F) in the direct-developing frog *Eleutherodactylus johnstonei*. *Environ Mol Mutagen* 54:362–73. doi:10.1002/em.21775

Mijares A, Rodrigues MT, Baldo D (2010) *Physalaemus cuvieri*. IUCN Red List. <http://www.iucnredlist.org/details/57250/0>. Accessed in 23 march 2017

Minissi S, Ciccotti E, Rizzoni M (1996) Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebeius* (teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay for in situ detection of mutagens in freshwater. *Mutat Res* 367:245–251

Muangphra P, Kwankua W, Gooneratne R (2012) Genotoxic effects of glyphosate or paraquat on earthworm coelomocytes. *Environ Toxicology* 29: 612-620. doi:10.1002/tox.21787

Muniswamy D, Shambanagouda R, Vineetkumar K, Ramesh H (2012) 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* 103:127-137. doi:10.1016/j.pestbp.2012.04.009

Muranli GFD, Güner U (2011) Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes of mosquito fish *Gambusia affinis* following exposure to the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. *Mutation Res* 726:104-108. doi: 10.1016/j.mrgentox.2011.05.004

Myers JP, Antoniou MN, Blumberg B, Carroll L, Colborn T, Everett LG, Hansen M, Landrigan PJ, Lanphear BP, Mesnage R, Vandenberg LN, Vom Saal FS, Welshons WV, Benbrook CM (2016) Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement. *Environ Heal* 15:1–13. doi:10.1186/s12940-016-0117-0

Nesslany F, Marzin D (1999) A micromethod for the in vitro micronucleus assay. *Mutagenesis* 14:403–410. doi: 10.1093/mutage/14.4.403

Nikoloff N, Guillermo SN, Damián Mc, Soloneski S, Larramendy ML (2014) Flurochloridone-based herbicides induced genotoxicity effects on *Rhinella arenarum* tadpoles (Anura: Bufonidae). *Ecotoxicology and Environ Safety* 100: 275-281. doi:10.1016/j.ecoenv.2013.10.021

Norppa H, Falck CM (2003) What do human micronuclei contain? *Mutagenesis* 18:221–233

OECD (2016) GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS. Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test <http://www.oecd.org/termsandconditions/>. Accessed in 05 november 2017

Pavani ND (2016) Pesticidas: uma revisão dos aspectos que envolvem esses compostos. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Estadual Paulista

Pérez-Iglesias JM; Ruiz de Arcaute C; Nikoloff N; Dury L; Soloneski S; Natale GS; Larramendy ML; (2014) The genotoxic effects of the imidacloprid-based insecticide formulation Glacoxan Imida on Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). Ecotoxicol. Environ. Saf. 104, 120–6. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.03.002

Pérez-Iglesias JM, Soloneski S, Nikoloff N, Natale GS, Larramendy ML (2015) Toxic and genotoxic effects of the imazethapyr-based herbicide formulation PivotHs on Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae) Ecotoxicol and Environ Saf 119:15–24. doi:10.1016/j.ecoenv.2015.04.045

Peruzzo PJ, Porta AA, Ronco AE (2008) Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina Environmental Pollution 156: 61 – 6

PLANO DE GESTÃO DO HORTO FLORESTAL DE ERECHIM
http://www.pmerechim.rs.gov.br/uploads/files/Plano_Gest%C3%A3o_Horto_Florestal_2012.pdf. Accessed 02 april 2017

Prieto Z, Leon-Incio L, Quijano-Jara C, Fernandez R, Polo-Benites E, Vallejo- Rodriguez R, Villegas-Sanchez L, (2008) Efecto genotóxico del dicromato de potasio en eritrocitos de sangre periférica de *Oreochromis niloticus* (Tilapia). Rev. Peru. Med. Exp. Salud Publica 25 (1), 51–58

Pollo FE, Bionda CL, Salinas ZA, Salas NE, Martino AL (2015) Common toad *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867) and its importance in assessing environmental health: test of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes. Environ Monitoring and Assessment 187:581. doi:10.1007/s10661-015-4802-1

Prasad S, Srivastava S, Singh M, Shukla Y (2009) Clastogenic effects of glyphosate in bone marrow cells of swiss albino mice. J of Toxicology 2009:6. doi:10.1155/2009/308985

Primost JE, Marino DJG, Aparicio VC, Costa JL, Carriquiriborde P (2017) Glyphosate and AMPA, “pseudo-persistent” pollutants under realworld agricultural management practices

in the Mesopotamic Pampas agroecosystem, Argentina. *Environ Pollution* 229:771-779. doi: 10.1016/j.envpol.2017.06.006

Ray MR, Basu C, Mukherjee S, Roychowdhury S, Lahiri T (2005) Frequências de Micronúcleos e anomalias nucleares em células epiteliais bucais esfoliadas de ficantes. *International J of Human Genetics* 5:45-48

Ribeiro LR, Marques EK (2003) A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EK. *Mutagênese ambiental* 21-28

Rocha CAM, Almeida VHC, Costa AS, Sagica JCJR, Monteiro J, Souza YSR, Cunha LA, Pinheiro RHS (2012) Indução de Micronúcleos e outras anormalidades nucleares em girinos de sapo-touro *Lithobates catesbeianus* tratados com sulfato de cobre. *Int. J. Genet.* 2:6-11

Rodrigues BN, Almeida FLS (2005) *Guia de Herbicidas*. Grafmark, Londrina pp 592

Rubinger FC (2009) Seleção de métodos biológicos para a avaliação toxicológica de efluentes industriais. Dissertation, Universidade Federal de Minas Gerais

Sanchez-Galan S, Linde AR, Izquierdo JI, Garcia- Vazquez E (1998) Micronuclei and fluctuating asymmetry in brown trout *Salmo trutta*.: complementary methods to biomonitor freshwater ecosystems. *Mutation Res* 412:219–225. doi: 10.1016/s1383-5718(97)00186-1

Saqib Q, Attia SM, Siddiqui MA, Aboul-Soud MA, Al-Khedhairy AA, Giesy JP, Musarrat J (2012) Phorate-induced oxidative stress, DNA damage and transcriptional activation of p53 and caspase genes in male Wistar rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 15:54-65. doi: 10.1016/j.taap.2011.12.006

Sato S, Tomita I (2001) Short-term screening method for the prediction of carcinogenicity of chemical substances: current states and problems of an in vivo rodent micronucleus assay. *J Health Science* 47:1–8

Sbrana I, Musio A (1995) Enhanced expression of common fragile sites with occupational exposure to pesticides. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 82: 123-127. doi:10.1016/0165-4608(95)00020-P

Schaumburg GL, Poletta GL, Siroski PA, Mudry MD (2016) Genotoxicity induced by Roundup® (Glyphosate) in Tegu lizard *Salvator merianae* embryos. *Pestic. Biochem Physiol* 130:71–78. doi: 10.1016/j.pestbp.2015.11.009

Shadnia S, Azizi E, Hosseini R, Khoei S, Fouladdel S, Pajouman A, Jalali N, Abdollahi M (2005) Avaliação do estresse oxidativo e genotoxicidade em organofosforo formuladores de inseticidas. *Murmurar. Exp. Toxicol* 24:439-445

Shimizu N, Itoh N, Utiyama H, Wahl GM (1998) Aprisionamento seletivo de DNA amplificado extracromosomicamente por brotação nuclear e micronucleação durante a fase S. *J. Cell.Biol.* 140:1307-1320

Shimizu N, Shimuara T, Tanaka T (2000) Eliminação seletiva de dois minutos acêntricos de células cancerígenas através da extrusão de Micronúcleos, *Mutat. Res.* 448:81-90.

Solomon KR, Thompson DG (2003) Ecological risk assessment for aquatic organisms from over-water uses of glyphosate. *Journal of Toxicology and Environ Health* 6:211-246

Souza T, Da Silva CS, Fontanetti (2006) Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery

Sparling DW, Fellers GM (2009) Anurans and its relevance to declining amphibian populations. *Enviro Toxicol Chem* 28:1696–1703

Titenko-Holland N, Windham G, Kolachana P, Reinisch F, Parvatham S, Osorio AM, Smith MT (1997) Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay in vitro and in vivo: a study of malathion-exposed workers, *Mutation Research* 15:85-95

Toledo LF, Silva C, Sánchez SP, Almeida C, Haddad MA, Baptista CF (2010) A revisão do código florestal brasileiro: impactos negativos para a conservação dos anfíbios. *Biota Neotropica* 10:35-38. doi: 10.1590/S1676-06032010000400003

Vera-Candioti J, Soloneski S, Larramendy ML (2013) Evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of glyphosate-based herbicides in the ten spotted livebearer fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1942). *Ecotoxicol. Environ. Saf* 89: 166-173

Wachtel CC (2017) Utilização de biomarcadores genéticos para a avaliação do principal rio de abastecimento público da cidade de Dois Vizinhos, Paraná. Dissertação, Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Wang D, Kreutzer DA, Essigmann JM (1998) Mutagenicity and repair of oxidative DNA damage: insights from studies using defined lesions. *Mutation Research* 400:99–115

Watt NT, Routledge MN, Wild CP, Hooper NM (2007) Cellular prion protein protects against reactive-oxygen-species-induced DNA damage. *Free Radical Biology and Medicine* 43:959–967

Webster L, Mckenzie GH, Moriarty HT (2002) Organophosphate-based pesticides and genetic damage implicated in bladder cancer. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 133:112-117

Gonçalves MW; Oliveira HHP; Carvalho WF; Silva DM; Nomura F; Bastos RP; Cruz AD (2012) Análises Mutagênicas de Anuros em Áreas de Mineração de Níquel. *Estudos*, v. 339, n. 2, p. 115-121

Yadav SS, Giri S, Singha U, Boro F, Giri A (2013) Toxic and genotoxic effects of Roundup on tadpoles of the Indian skittering frog *Euflyctis cyanophlyctis* in the presence and absence of predator stress. *Aquat. Toxicol* 132:1-8. doi:10.1016/j.aquatox.2013.01.016

Yin XH, Li SN, Zhang L, Zhu GN, Zhuang HS (2008) Evaluation of DNA damage in Chinese toad *Bufo Bufo0 gargarizans* after in vivo exposure to sublethal concentrations of four herbicides using the comet assay. *Ecotoxicology* 17:280-286. doi: 10.1007/s10646-008-0195

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Com relação a toxicidade aguda, as espécies apresentaram sensibilidade diferente às concentrações de Glifosato testadas, *Physalaemus cuvieri* foi mais sensível que *Physalaemus gracilis*.
- Praticamente todas as concentrações de Glifosato testadas, causaram malformações graves de corpo, cauda e membros para as duas espécies deste estudo, tanto em fase de girino, como de metamorfose. As malformações encontradas podem aumentar a suscetibilidade à predação e reduzir o sucesso de forrageamento, implicando significativamente na sobrevivência de anfíbios, particularmente das espécies *P. cuvieri* e *P. gracilis*.
- As malformações encontradas aumentaram em quantidade e gravidade a medida que se aumentaram as concentrações. Esses resultados se tornam ainda mais graves levando-se em conta que as concentrações testadas são consideradas válidas pela legislação brasileira, bem como já foram encontradas em ambiente natural, para águas do Brasil e Argentina.
- O Glifosato afetou o comprimento e o peso dos girinos das duas espécies testadas, isso indica menores chances de chegar a vida adulta, bem como um provável insucesso reprodutivo.
- A concentração 280µg/L, permitida pela legislação brasileira para águas de classe III, retardou o período de metamorfose dos girinos das duas espécies, permanecendo mais dias em clímax metamórfico. Neste período girinos são presas fáceis e as chances de sobrevivência se reduzem.
- Todas as concentrações testadas foram capazes de causar Anormalidades Nucleares Eritrocíticas (ENAs), principalmente na concentração de 1000µg/L, que também induziu a formação de Micronúcleos. Seguindo a lógica de que as concentrações testadas, são baixas comparadas ao que já foi encontrado no ambiente para o Brasil e outros países, anfíbios podem estar sofrendo danos em seus habitats naturais.

- As concentrações testadas de Glifosato apresentaram alto risco ambiental agudo e crônico para as duas espécies. Portanto, as concentrações ambientais encontradas para este herbicida, causam efeitos negativos (tóxicos e genotóxicos) para as duas espécies em estudo.