



UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL – UFFS
CAMPUS ERECHIM
CURSO DE ENGENHARIA AMBIENTAL E SANITÁRIA

VRANDRIELI JUCIELI SKOVROSKI

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA MISTURA DOS AGROTÓXICOS 2,4-D
(ÁCIDO DICLOROFENOXIACÉTICO) E GLIFOSATO EM ANFÍBIOS**

ERECHIM– RS

2019

VRANDRIELI JUCIELI SKOVRONSKI

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA MISTURA DOS AGROTÓXICOS 2,4-D
(ÁCIDO DICLOROFENOXIACÉTICO) E GLIFOSATO EM ANFÍBIOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS - Campus Erechim, como requisito para a obtenção do título de bacharel em Engenharia Ambiental e Sanitária.

Orientadora: Prof.^a Dra. Marília Teresinha Hartmann

Erechim – RS

2019

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Skovronski, Vrandrieli Jucieli

Avaliação da Toxicidade da Mistura dos Agrotóxicos 2,4-D (Ácido Diclorofenoxiacético) e Glifosato em Anfíbios / Vrandrieli Jucieli Skovronski. -- 2019. 46 f.:il.

Orientadora: Doutora Marília Teresinha Hartmann. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de Engenharia Ambiental e Sanitária, Erechim, RS, 2019.

1. 2,4-D. 2. Glifosato. 3. Herbicidas. 4. Physalaemus cuvieri. 5. Toxicidade. I. Hartmann, Marília Teresinha, orient. II. Universidade Federal da Fronteira Sul. III. Título.

VRANDRIELI JUCIELI SKOVRONSKI

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA MISTURA DOS AGROTÓXICOS 2,4-D
(ÁCIDO DICLOROFENOXIACÉTICO) E GLIFOSATO EM ANFÍBIOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS - Campus Erechim, como requisito para a obtenção do título de bacharel em Engenharia Ambiental e Sanitária.

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em:
05/07/2019

BANCA EXAMINADORA:

Prof.^a Dra. Marília Teresinha Hartmann
UFFS – Erechim

Eng. Amb. Ms. Camila Fátima Rutkoski
UFFS – Erechim

Eng. Amb. Ms. Natani Macagnan
UFFS – Erechim

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado forças nos momentos difíceis e sempre estar ao meu lado durante o percurso do meu caminho nesta fase de minha vida.

Aos meus pais pelo apoio neste longo percurso que segui em minha vida, Cláudio Skovronski e principalmente a minha mãe Vera Lúcia Babinski Skovronski que sempre me consolou e me ajudou nos momentos difíceis, pois sem seu apoio não teria chegado até aqui.

À minha orientadora Prof^ª. Dra. Marília Teresinha Hartmann por todo apoio, carinho, compreensão, auxílio e ensinamentos repassados durante a fase do projeto que realizei e a parte do TCC. Muito obrigada por ser este ser de luz, que tenho orgulho de dizer que você é minha orientadora.

Ao pessoal que compõem o grupo de pesquisa Camila Fátima Rutkoski, Natani Macagnam, Alexandre Folador e Gilcinéia Santos por todo auxílio e comprometimento durante a realização dos projetos.

Aos meus colegas por todo auxílio durante este período de faculdade e pelas amizades conquistadas Aline, Alexandre, Daniele, Leonardo, Maria, Rafael, Vanessa e em especial a Adriana e Saraiane que sempre estiveram ao meu lado me auxiliando nos trabalhos da faculdade e sendo verdadeiras amigas para tudo.

Aos funcionários da UFFS por todo auxílio repassados durante a realização dos ensaios toxicológicos, em especial aos técnicos Suzana, Flávia, Angela, Davison e Isabelli.

À minhas irmãs Gracieli, Clacisllaine e Monique por todo o carinho, em especial a Gracieli por sempre ter me dado motivação e forças mesmo quando eu já não tinha mais, muito obrigada por você existir em minha vida.

Agradeço em especial o meu namorado Rogério Preczewski por todo carinho, compreensão e auxílio que me forneceu durante esta fase de minha vida, muito obrigada por sempre estar ao meu lado, me apoiar em todas as minhas decisões e sempre me motivar a ser uma pessoa melhor.

À minha sogra Lúcia e sogro Artêmio por todo carinho e auxílio durante o período da minha faculdade e vida pessoal.

À UFFS por todo o suporte e ensinamentos obtidos durante esta jornada.

E a todos que não foram mencionados aqui, mas que de alguma maneira contribuíram e torceram por essa minha conquista.

RESUMO

Neste estudo avaliamos os efeitos da mistura de duas formulações comerciais de herbicidas muito utilizados em combinação na agricultura, o 2,4-D e glifosato em uma espécie de anfíbio bioindicadora: *Physalaemus cuvieri*. Os ensaios crônicos foram realizados considerando concentrações ambientalmente relevantes e concentrações máximas destes herbicidas permitidas em águas de acordo com a legislação. A mistura destes dois agrotóxicos provocou alterações na morfologia oral; na forma e/ou tamanho do intestino; formato da coluna; presença de edemas e alterações na atividade natatória nos girinos nas concentrações testadas. Houve em média 56,8% de mortalidade nas concentrações testadas, e uma concentração letal média (CL₅₀) de 168 horas de 12,52 µg/L (2,4-D) + 142,60µg/L (glifosato) para a *Physalaemus cuvieri*. Estes dados demonstram que a mistura de herbicidas pode ser letal a espécie testada, e demonstrando ser um bom bioindicador. Sugerimos que sejam realizados mais ensaios toxicológicos com outras espécies a fim de verificar a toxicidade da mistura desses agrotóxicos que podem ser encontrados em águas superficiais, verificando os possíveis impactos que estes herbicidas possam vir a causar ao ecossistema.

Palavras-chave: 2,4-D. Glifosato. Herbicidas. *Physalaemus cuvieri*. Toxicidade.

ABSTRACT

In this study assessed the effects of mixing two commercial formulations of herbicides widely used in combination in agriculture, the 2,4-D and glyphosate in an amphibian bioindicator species: *Physalaemus cuvieri*. The chronic trials were held considering environmentally relevant concentrations and maximum concentrations of these herbicides allowed in waters according to the legislation. The mixture of these two agrototoxics caused changes in oral morphology; in the form and / or size of the intestine; spine format; presence of edemas and changes in swimming activity in tadpoles at the concentrations tested. There was an average of 56.8% mortality in the tested concentrations, and a mean lethal concentration (LC₅₀) of 168 hours from 12.52 µg.L⁻¹ (2,4-D) + 142,60 µg.L⁻¹ (glyphosate) to *Physalaemus cuvieri*. These figures show that the herbicide mixture may be lethal to the species tested, and proving to be a good bioindicator. We suggest that further toxicological tests be carried out with other species in order to verify the toxicity of the mixture of these agrototoxics that can be found in surface water, verifying the impacts that these herbicides may have on the ecosystem.

Keywords: 2,4-D. Glyphosate. Herbicides. *Physalaemus cuvieri*. Toxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Fórmula estrutural do agrotóxico 2,4-D.....	15
Figura 2: Fórmula estrutural do agrotóxico glifosato.	16
Figura 3: Anfíbio da espécie <i>P. cuvieri</i> adulto.	17
Figura 4: A) Desova e B) Girino de <i>Physalaemus cuvieri</i> coletados na lagoa da Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Erechim.....	17
Figura 5: Criação de girinos de <i>P. cuvieri</i> , Laboratório de Ecologia e Conservação, Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Erechim.	18
Figura 6: Fluxograma do ensaio de toxicidade crônica dos girinos <i>P. cuvieri</i> de expostos a mistura de 2,4-D e glifosato.	19
Figura 7: Ensaio de toxicidade crônica com girinos de <i>P. cuvieri</i> . Laboratório de Ecologia e Conservação, Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Erechim.	20
Figura 8: Mortalidade cumulativa de girinos de <i>P. cuvieri</i> expostos a mistura de 2,4-D e Glifosato, submetidos ao ensaio crônico.....	23
Figura 9: Total de girinos de <i>P. cuvieri</i> que apresentaram alterações na atividade natatória na exposição a mistura de 2,4-D e glifosato.	25
Figura 10: Alteração morfológica na boca de girinos de <i>P. cuvieri</i> no estágio 25. (A) girino do controle negativo com a formação da boca com todos os queratodontes. Girinos expostos a concentração de 74,5µg/L _{2,4-D} + 1000µg/L _{gli} (B) girino com ausência de queratodontes e (C) girinos sem o desenvolvimento dos lábios da boca e ausência dos queratodontes.	26
Figura 11: Porcentagem de girinos de <i>P. cuvieri</i> expostos a mistura de 2,4-D e glifosato, que apresentaram malformações na boca.	26
Figura 12: Alteração morfológica do intestino em girinos de <i>P. cuvieri</i> , (A) intestino normal em formato de espiral; (B) intestino alterado com malformação exposto a mistura de 2,4-D e glifosato.....	27
Figura 13: Porcentagem de girinos de <i>P. cuvieri</i> expostos a mistura de 2,4 D e glifosato, que apresentaram malformações no intestino.	27
Figura 14: (A) Girino de <i>P. cuvieri</i> com a coluna normal e (B) Girino com alteração na coluna pela exposição a mistura dos agrotóxicos 2,4 D e Glifosato.....	27
Figura 15: (A) Girino normal de <i>P. cuvieri</i> e (B) Girino com a presença de edema provocado pela exposição a mistura dos agrotóxicos 2,4-D e glifosato.	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Propriedades químicas dos agrotóxicos 2,4-D e glifosato.....	15
Tabela 2: Concentrações das misturas de 2,4-D e glifosato utilizadas nos ensaios com girinos de <i>P. cuvieri</i>	16
Tabela 3: Mortalidade de girinos de <i>Physalaemus cuvieri</i> submetidos ao teste crônico em relação ao tempo de exposição a mistura de agrotóxicos 2,4-D e glifosato.....	23
Tabela 4: Atividade natatória dos girinos expostos ao ensaio crônico da mistura de 2,4-D e glifosato. Endpoints: (0) atividade natatória igual do controle, (1) letargia, ou atividade natatória menor que o controle, (2) Hiperatividade, ou atividade natatória maior do controle, (3) sem resposta (4) atividade natatória com contrações espasmódicas, tremores ou convulsões.	24
Tabela 5: Malformações nos girinos de <i>Physalaemus cuvieri</i> expostos ao teste crônico a mistura de agrotóxicos 2,4-D e glifosato.* Dunnett, $p < 0,05$	25
Tabela 6: Valores da Concentração de efeito não observado (CENO), Concentração de efeito observado (CEO), máxima concentração ambiental do toxicante que causa efeito, (MCAT) e quociente de risco crônico 1 e 2 (CHQ) determinados para as alterações morfológicas significativas e atividade natatória para os girinos de <i>P. cuvieri</i> expostos a mistura de 2,4-D e glifosato. CHQ 1 – coeficiente de risco com máxima concentração ambiental encontrada na literatura, CHQ 2 – coeficiente de risco com concentração permitida na água potável.	29

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	14
2.1	OBJETIVO GERAL.....	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3	MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1	AGROTÓXICOS	15
3.2	ORGANISMO TESTE E COLETA E MANUTENÇÃO DAS DESOVAS	17
3.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	19
3.3.2	Ensaio de toxicidade crônica	19
3.3.3	Atividade Natatória	20
3.3.4	Malformação	20
3.3.5	Análises Estatísticas e Avaliação de Risco Ecológico	21
4	RESULTADOS	23
4.1	MORTALIDADE	23
4.2	ATIVIDADE NATATÓRIA	24
4.3	MALFORMAÇÃO	25
4.4	AVALIAÇÃO DE RISCO ECOLÓGICO	28
5	DISCUSSÃO	30
6	CONCLUSÕES	34
7	RECOMENDAÇÕES	35
	REFERÊNCIAS	36
	ANEXO A	44

1 INTRODUÇÃO

O aumento na demanda de alimentos pela população humana vem contribuindo para o crescente investimento em tecnologia aplicado a agricultura (SAATH; FACHINELLO, 2018), surgindo alternativas para a produção de alimentos como agroecossistemas e monocultivos (RODRIGUES, 2006). Entretanto estas formas de produção de alimento acabam favorecendo o aparecimento de pragas, ervas daninhas, doenças e microrganismos advindos do desequilíbrio que atinge essas populações, impulsionando a utilização de agrotóxicos e fertilizantes. (RODRIGUES, 2006). Esta ação aumenta a presença de compostos xenobióticos no meio ambiente, principalmente nos ecossistemas aquáticos, acarretando graves consequências aos seres vivos que estão inseridos neste habitat (SIMONATO et al., 2008; STEHR et al., 2004; PACHECO; SANTOS, 2002).

O Brasil utiliza uma elevada quantidade de agrotóxico para o cultivo agrícola e também é considerado um dos principais produtores de alimentos do mundo (LOPES; ALBUQUERQUE, 2018). Agrotóxicos são substâncias químicas utilizadas na agricultura para o controle de insetos (inseticidas), agentes causadores de doenças (fungicidas) e ervas daninhas (herbicidas) ou outros fins (HELFRICH, 2009; SANTOS, 2013). Os herbicidas são agrotóxicos que tem a função de controlar o crescimento de ervas daninhas indesejáveis, de forma a provocar aumentos na produtividade das culturas (DHAWAN; BAJPAYEE; PARMAR, 2009). Os herbicidas 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e o glifosato (N-(fosfonometil)glicina) destacam-se como os ingredientes ativos (IA) mais vendidos no Brasil, sendo o glifosato em primeiro lugar com 173.150,75 toneladas de IA e o 2,4-D em segundo lugar com 57.389,35 toneladas de IA (IBAMA, 2019).

Além disso, o 2,4-D e o glifosato são agrotóxicos da classe dos herbicidas que tem um papel fundamental no controle de ervas daninhas na agricultura no mundo (JUNIOR et al., 2002; GATHERCOLE; G, 2012; CECATO et al., 2017). Houve grande impacto na produção agrícola de alimentos, devido à redução de custos (GATHERCOLE; G, 2012). O 2,4-D está classificado como um composto do ácido fenoxiacético, do grupo de herbicidas clorofenoxiacéticos (LI, et al., 2017; RODRIGUES; SERRA, 1996). Apresenta maior toxicidade para plantas de folha larga, comumente utilizado no entorno de casas, jardins, parques, campos de futebol, agricultura e silvicultura (BOKÁN et al., 2013). De acordo com a ANVISA (2016) o 2,4-D é considerado seletivo, sistêmico de pós-emergência e possui classificação toxicológica Classe I (extremamente tóxico).

Desde a descoberta do 2,4-D em 1945, este é um dos mais usados no mundo (GATHERCOLE; G, 2012). A produção do 2,4-D iniciou-se durante o período da Segunda Guerra Mundial (1939-1945) sendo utilizado como desfolhante de florestas. Após o período de guerra, começou-se a ser utilizado para o controle de ervas daninhas na produção agrícola (CONCENÇO et al., 2014). Esse herbicida encontra-se nas formulações líquidas, pó ou granular, sendo que a sua toxicidade depende de suas fórmulas químicas como, sais, ésteres e ácido (EPA, 2019). O 2,4-D é empregado em culturas de grãos, frutas e hortaliças para o controle de ervas daninhas nestas (INICIATIVA 2,4-D, 2019).

O agrotóxico glifosato pertence ao grupo glicina, que tem ação não-seletiva, sistêmica e pós-emergente (SOUZA, 2006) e está entre os agrotóxicos mais vendidos no mundo e no Brasil, estando em primeiro lugar entre os herbicidas mais utilizados desde 2008 (MELO, 2018; IBAMA, 2019). É pulverizado para eliminação de ervas daninhas na agricultura, sendo absorvido pela planta através das folhas e caulículos novos, agindo nos sistemas enzimáticos, inibindo o metabolismo de aminoácidos e ocasionando em poucos dias a morte das ervas daninhas (JUNIOR et al., 2002). Segundo a bula do Roundup Original® DI, tem classificação toxicológica Classe II (altamente tóxico) e Classificação do Potencial de Periculosidade Ambiental Classe III (produto perigoso ao meio ambiente).

O glifosato foi sintetizado pela primeira vez em 1970 pela Monsanto, sendo utilizado para o controle de plantas daninhas de folhas largas ou estreitas (MELO, 2018). Pode ser constituído de sal de amônio ou de sódio, é um organofosfato que não afeta o sistema nervoso das plantas como parte dos organofosforados, entretanto mesmo o glifosato ter sido citado como pouco tóxico, há indícios que este cause efeitos deletérios no ambiente devido algumas plantas adquirirem certa resistência a este (JUNIOR et al., 2002). O glifosato é utilizado principalmente para o controle de ervas daninhas em plantações de grãos (WAGNER; JUNIOR, 2014).

O 2,4-D e o glifosato são agrotóxicos que já foram detectados em águas superficiais, o 2,4-D já foi detectado em concentrações de 3,81 µg/L; 34,8 µg/L e 74,5 µg/L (PINHEIRO; SILVA; KRAISCH, 2010) e o glifosato em concentrações de 144 µg/L; 700 µg/L; 1000 µg/L (MATTOS et al. 2002; RODRIGUES; ALMEIDA 2005; PERUZZO; PORTA; RONCO, 2008; DORNELLES 2013). Na legislação brasileira, a Resolução CONAMA 357/2005 determina a quantidade máxima permitida de 4µg/L de 2,4-D em águas superficiais de classe 1, 30µg/L de 2,4-D para águas superficiais de classe 3, e a Portaria do Ministério da Saúde 2914/2011 determinam os máximos de resíduos de 2,4-D que podem conter em águas potável de 30µg/L (BRASIL, 2005; BRASIL, 2011). Em relação ao glifosato, a Resolução CONAMA 357/2005 estabelece a quantidade máxima permitida de 65µg/L de glifosato em águas superficiais de

classe 1 e 280µg/L de glifosato para águas superficiais de classe 3. Já para água de consumo humano, a Portaria do Ministério da Saúde 2914/2011 estabelece o valor de 500µg/L (BRASIL, 2005; BRASIL, 2011).

O 2,4 D e o glifosato podem ser misturados para a dessecação em pré-plantio, mostrando-se mais eficazes quando usados combinados do que quando aplicados isoladamente com elevadas doses de cada agrotóxico (TAKANO, 2013). Na agricultura é muito utilizada a combinação de agrotóxicos para o controle de pragas e ervas daninhas (COSTA et al., 2011). Porém, misturas podem causar efeitos negativos em organismos não-alvo (GE et al, 2014), devido a ocorrência de interações sinérgicas, aditivas ou antagônicas (BRODEUR et al., 2014).

A utilização intensiva de agrotóxicos na agricultura acaba representando um perigo para os ecossistemas, pois pode acarretar em destruição de ambientais naturais e de fontes de alimentos de organismo não-alvo, ocasionando a perda de diversas espécies (JUNIOR et al., 2002). Além destes contrastes, o uso de agrotóxicos também acaba afetando diretamente a reprodução de animais aquáticos e sua sobrevivência, ocasionando a morte de plantas que são responsáveis por fornecer até 80% do oxigênio dissolvido para a vida aquática, provocando a diminuição dos níveis de oxigênio dissolvido e causando a asfixia desses animais (HERFRICH, 2009).

Os agrotóxicos podem ainda provocar diversos efeitos indesejáveis, como atingir organismos não-alvos, alterar a dinâmica bioquímica natural, provocar um desequilíbrio ecológico e comprometer a qualidade da água de muitos mananciais e bacias hidrográficas (SPADOTTO et al., 2004; BELCHIOR et al., 2014; MARCATO, 2014).

Os ecossistemas aquáticos podem ser contaminados pelos agrotóxicos, quando estes são arrastados pela ação dos ventos, pela água das chuvas e pela lixiviação do solo (BELCHIOR et al., 2014; BOIVIN et al., 2005). O constante lançamento de substâncias tóxicas no ecossistema aquático acaba afetando diversos organismos vivos, devido ao fato de estas substâncias serem capazes de interagir e causar várias alterações que podem gerar consequências nas populações, ecossistemas ou comunidades, conforme o grau de exposição a substância e o tempo de exposição (JESUS; CARVALHO, 2008; DHAWAN; BAJPAYEE; PARMAR, 2009).

Para a análise de possíveis danos em organismos vivos causados por substâncias tóxicas são utilizados bioindicadores ambientais (NOVO, 2012). O bioindicador é um organismo ou uma comunidade que reage a modificação das condições ambientais em que estão expostas, alterando as suas funções vitais e/ou sua composição química de forma a fornecer um diagnóstico sobre a situação ambiental (NOVO, 2012). Existem diversos organismos modelos considerados bioindicadores ambientais, tais como anfíbios (LAJMANOVICH et al., 2015;

MACAGNAN et al., 2017; RUTKOSKI et al., 2018), peixes (VERMA et al., 1980; LI et al., 2017; SOBJAK et al., 2017) abelhas (HAMADACHE et al., 2017; KUAN et al., 2018), moluscos (CANTY et al., 2007), dentre outros. As espécies que habitam o ambiente aquático podem ser utilizadas como bioindicadores ambientais, pois estão expostas constantemente a diversas substâncias tóxicas liberadas pelas ações antrópicas (CORT; GHISI, 2014).

Anfíbios são considerados ótimos indicadores de qualidade ambiental, pois estão suscetíveis a mudanças ambientais, habitam em ambientes terrestres e aquáticos, possuem permeabilidade na sua pele e são vulneráveis a contaminantes químicos encontrados nos seus habitats (SWINEFORD, 1980; HALL; HAYES et al., 2006; NOVO, 2012; BRÜHL et al., 2013; VASCONCELOS, 2014). A compreensão dos efeitos dos contaminantes nos organismos aquáticos é o primeiro passo para entender a toxicidade direta nestes (GÜNGÖRDÜ; UÇKUN; YOLOGLU, 2016). A utilização da avaliação de risco ecológico é essencial para análise da mistura dos agrotóxicos que possam vir a trazer riscos de sobrevivência para a espécie (USEPA, 1992).

A espécie *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leptodactylidae) conhecida como rã cachorro pode ser considerada um bom indicador ambiental (BECKER; RAMOS; MOURA, 2007; WRUBLESWSKI et al., 2018), ocorre em diversos tipos de habitats, com facilidade de adaptação a ambientes abertos ou florestais, e encontra-se estável na lista vermelha da IUCN (*International Union for Conservation of Nature*) (MIJARES et al., 2010). *Physalaemus cuvieri* é uma espécie que possui ampla distribuição geográfica e ocorrem em diversos lugares da Argentina, Brasil e Paraguai (FROST, 2019). Com isso, o presente estudo tem a finalidade de avaliar a toxicidade da mistura dos agrotóxicos 2,4-D e glifosato em anfíbios de *Physalaemus cuvieri*, pois nessa fase os indivíduos se desenvolvem na água e podem sofrer os efeitos da mistura de herbicidas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos ecotoxicológicos da mistura da formulação comercial dos herbicidas 2,4-D e glifosato no anfíbio bioindicador *P. cuvieri*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos da exposição crônica da mistura de 2,4-D + Glifosato em *P. cuvieri* na mortalidade/sobrevivência;
- Analisar se a mistura dos dois agrotóxicos, 2,4-D + Glifosato pode influenciar na atividade natatória e causar malformação de *P. cuvieri*;
- Discutir os efeitos da mistura comparando com os efeitos isolados de cada agrotóxico.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 AGROTÓXICOS

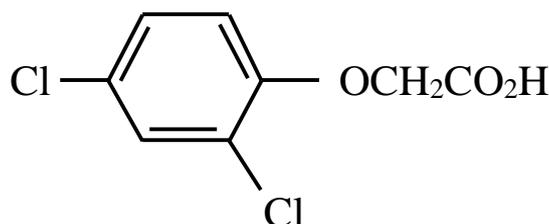
Os herbicidas selecionados para a utilização nos ensaios de toxicidade crônica foram a formulação comercial de 2,4-D NORTOX® (806g/L sal de dimetilamina de (2,4 dichlorophenoxy) ácido acético (2,4-D), 670g/L ácido equivalente de 2,4-D e 526,6g/L de outros ingredientes) e o glifosato a formulação comercial Roundup Original® DI (445g/L sal de Diamônio de N-(phosphonomethyl) glicine (GLIFOSATO), 370g/L de ácido equivalente N-(phosphonomethyl) glicine (GLIFOSATO) e 751g/L de outros ingredientes).

As propriedades químicas do agrotóxico 2,4-D e glifosato estão expostos na tabela 1 e a fórmula estrutural do 2,4-D está expressa na Figura 1 e do glifosato na Figura 2.

Tabela 1: Propriedades químicas dos agrotóxicos 2,4-D e glifosato.

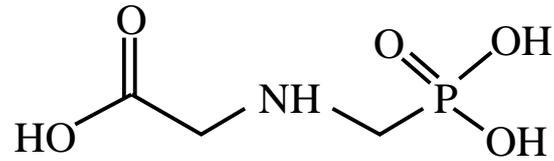
2,4-D (C₈H₆Cl₂O₃)		
PROPRIEDADES	VALOR	REFERÊNCIA
Solubilidade em água (25°C)	900mg/L	JUNIOR et al., 2002
pKa	2,6	CHAVES et al., 2018
Log Kow	2,58 a 2,83	CHAVES et al., 2018
Tempo de meia vida em água	14 a 28 dias	CHAVES et al., 2018
GLIFOSATO (C₃H₈NO₅P)		
PROPRIEDADES	VALOR	REFERÊNCIAS
Solubilidade em água (25°C)	1,05x10 ⁶ mg/L	MACBEAN, 2010
pKa	Com 4 constantes de dissociação <2,0; 2,6; 5,6; 10,6	COUTINHO; MAZO, 2005
Log Kow	5,4	MACBEAN, 2010
Tempo de meia vida em água	7 a 21 dias	GIESY et al., 2000; PATERSON, 2007; EDGE et al., 2012

Figura 1: Fórmula estrutural do agrotóxico 2,4-D.



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Figura 2: Fórmula estrutural do agrotóxico glifosato.



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Foram analisadas 5 misturas dos herbicidas 2,4-D e glifosato, baseando-se na máxima concentração do agrotóxico permitida na água pela resolução CONAMA 357/2005 e pela Portaria do Ministério da Saúde 2914/2011, e em concentrações ambientalmente relevantes, conforme a Tabela 2.

Tabela 2: Concentrações das misturas de 2,4-D e glifosato utilizadas nos ensaios com girinos de *P. cuvieri*

Mistura	Concentração de 2,4-D+ glifosato (µg/L)	Referências
1º	4 + 65	Máximo permitido para águas superficiais de classe 1, Brasil - CONAMA 357/2005
2º	17+122,5	Concentração intermediária entre rios de classe 1 e 3 da CONAMA 357/2005
3º	30 + 280	Máximo permitido para águas superficiais de classe 3, Brasil - CONAMA 357/2005
4º	30 + 500	Máximo permitido em água potável, Portaria do Ministério da Saúde 2914/2011
5º	74,5 + 1000	Concentrações máximas encontradas em águas superficiais dentro da área de distribuição geográfica da espécie RODRIGUES; ALMEIDA, 2005; PINHEIRO; SILVA; KRAISCH, 2010

Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

A solução-estoque foi elaborada no dia de aplicação dos ensaios crônicos, realizando-se a diluição da formulação comercial em água destilada até obter uma solução-estoque com concentração de 500 mg/L. A solução-estoque foi utilizada em todos os ensaios de toxicidade crônica e inserida somente uma vez no início dos ensaios.

3.2 ORGANISMO TESTE E COLETA E MANUTENÇÃO DAS DESOVAS

Para os ensaios de toxicidade crônica, utilizou-se como organismos teste girinos de *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leptodactylidae) (Figura 3 e Figura 4).

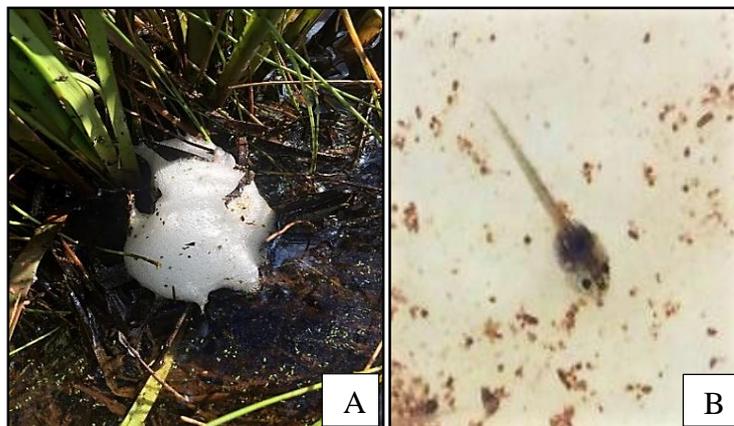
Figura 3: Anfíbio da espécie *P. cuvieri* adulto.



Fonte: ©Gilcinéia dos Santos, 2019.

Foram coletadas desovas em lagoas em condições conservadas e sem interferência de agrotóxicos na Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Erechim/RS (Latitude: 27°43' 46,11" Sul; Longitude: 52°16' 54,40" Oeste) com menos de 24 horas de oviposição (Figura 4A). As coletas foram realizadas entre os meses de novembro de 2018 a fevereiro de 2019.

Figura 4: A) Desova e B) Girino de *Physalaemus cuvieri* coletados na lagoa da Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Erechim.



Fonte: A) Foto: ©Gilcinéia dos Santos; B) Elaborado pela autora, 2019.

Este estudo teve licença do ICMBio n° 65820-1 e a autorização do Comitê de Ética para Uso de Animais da Universidade Federal da Fronteira Sul (23205.003087/2018-11).

A coleta das desovas foi realizada manualmente, em sacos plásticos e foram imediatamente levadas para o Laboratório de Ecologia e Conservação da Universidade Federal da Fronteira Sul – Campus Erechim. No laboratório, as desovas foram colocadas em aquários de 15 litros contendo água desclorada, atendendo os padrões de potabilidade e mantida em condições controladas de laboratório, com fotoperíodo de 12 horas claro/12 horas escuro (Figura 5). A água utilizada na criação e ensaios tinha os seguintes parâmetros: 24°C (± 1), oxigênio dissolvido 5,0 mg/L (± 1), turbidez <5, pH de 7 ($\pm 0,5$), condutividade 160 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (± 10), alcalinidade 9,74 mgCaCO₃/L, Na de 44,1mg/L, Mg de 1,35 mg/L, Fe de 0,08 mg/L, Ni<0,001 mg/L. A sala foi aclimatada com a temperatura entre 25°C (± 2) e com umidade relativa do ar entre 60 e 80%.

Figura 5: Criação de girinos de *P. cuvieri*, Laboratório de Ecologia e Conservação, Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Erechim.



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Os girinos da criação e ensaios foram alimentados com ração comercial para peixe (Alcon MEP 200 complex), constituída de minerais orgânicos quelatados, enzimas digestivas e probiótico. Também foram colocadas folhas de alface orgânica livre de agrotóxicos nos aquários. Os girinos não utilizados nos ensaios foram devolvidos a natureza, no mesmo local onde haviam sido coletados.

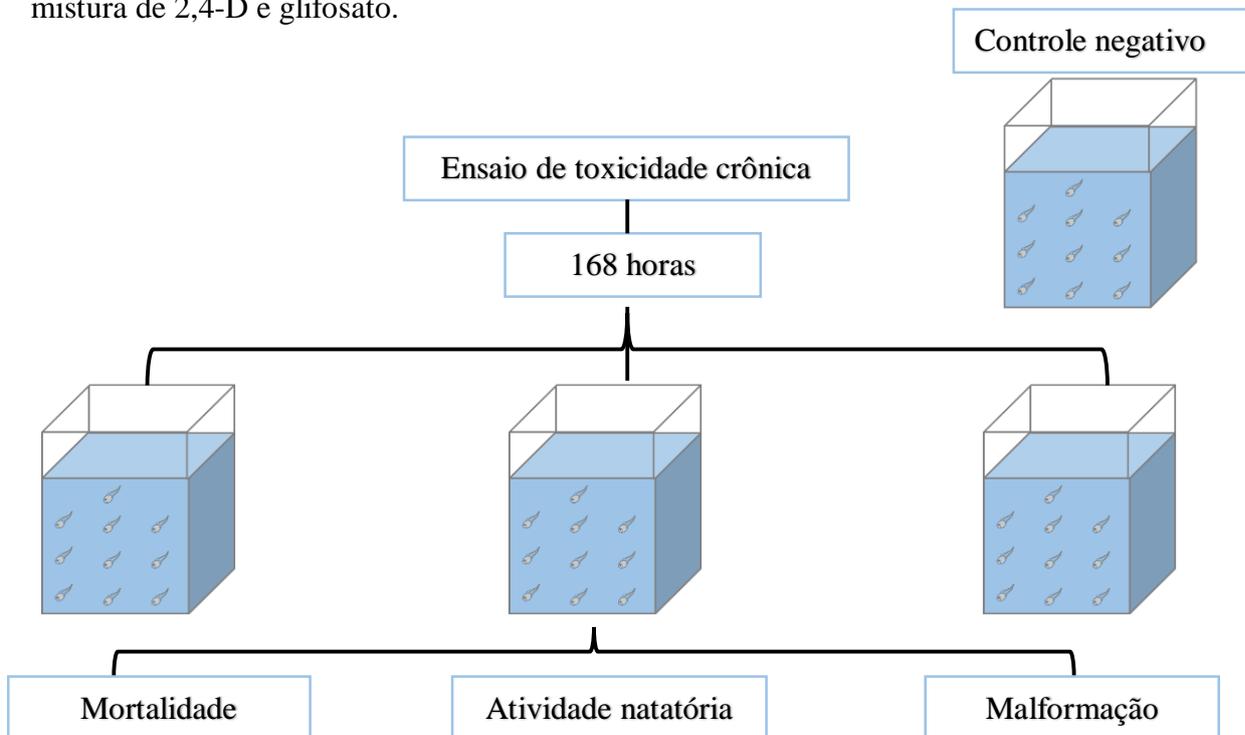
3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

3.3.2 Ensaio de toxicidade crônica

Os ensaios de toxicidade crônica tiveram duração de 168 horas (7 dias), iniciando-se quando os indivíduos encontravam-se no estágio de desenvolvimento 25 (GOSNER, 1960) (Anexo A). O estágio 25 é uma fase larval, exclusivamente aquática, início da fase considerada girino, quando possui boca completa e é capaz de se alimentar e ter atividade natatória de fácil observação (ALTIG; MCDIARMID, 1999).

Utilizou-se 30 girinos por concentração, divididos em 3 recipientes de vidro estéreis (triplicata), de volume de 500 mL. Em cada recipiente foram inseridos 500 mL de água desclorada, a concentração do agrotóxico a ser testada e 10 girinos. Após colocados os girinos, os recipientes foram fechados com plástico filme para evitar a evaporação e manteve-se os recipientes sob aeração constante (Figura 6 e Figura 7). Realizou-se um controle negativo do ensaio de toxicidade contendo somente água desclorada (mesmos parâmetros descritos no item 3.3.1), 10 girinos por recipiente em triplicata.

Figura 6: Fluxograma do ensaio de toxicidade crônica dos girinos *P. cuvieri* de expostos a mistura de 2,4-D e glifosato.



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Figura 7: Ensaio de toxicidade crônica com girinos de *P. cuvieri*. Laboratório de Ecologia e Conservação, Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Erechim.



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

A cada 24 horas de realização do ensaio crônico foi realizada a observação da atividade natatória e a mortalidade dos indivíduos. Os mortos foram removidos diariamente dos recipientes e quantificados. Neste período também os indivíduos foram alimentados e analisados os parâmetros de temperatura e o oxigênio dissolvido da água.

3.3.3 Atividade Natatória

Durante o período de realização do ensaio crônico analisou-se a atividade natatória dos girinos a cada 24 horas, de acordo com o protocolo qualitativo de observação de comportamento de peixes (ASTM E1711 – 12 “*Standard Guide for Measurement of Behavior During Fish Toxicity Tests*”).

Da lista de verificação comportamental do protocolo, foram adaptados para a espécie os seguintes itens de atividade natatória: (0) atividade natatória igual do controle, (1) letargia, ou atividade natatória menor que o controle, (2) hiperatividade, ou atividade natatória maior do controle, (3) sem resposta (4) atividade natatória com contrações espasmódicas, tremores ou convulsões.

3.3.4 Malformação

A ocorrência ou não de malformação nos girinos foi observada individualmente em estereomicroscópio com sistema de imagem no último dia de exposição ao ensaio de toxicidade

crônica. Todos os girinos foram fotografados e comparados ao controle. Os parâmetros fenotípicos observados foram: (1) alteração na boca, perda parcial ou total dos queratodontes e dos lábios dos girinos (2) alteração na forma e/ou tamanho do intestino, (3) alteração no formato da coluna e (4) presença de edemas.

3.3.5 Análises Estatísticas e Avaliação de Risco Ecológico

Para a obtenção do valor da CL_{50} (concentração letal média) utilizou-se o método TSK Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON; RUSSO; THRUSTON, 1977) pelo *software* GBasic.

Para realizar a classificação da toxicidade aguda usou-se a classificação da *Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals* (GHS, 2019). Após o período de 96 horas de exposição a uma substância química, a toxicidade pode ser classificada em três categorias: alta toxicidade ($CL_{50} < 1$ mg/L), toxicidade moderada (CL_{50} entre 1 e 10 mg/L) e baixa toxicidade ($CL_{50} > 10$ mg/L).

A diferença estatística entre a mortalidade, malformação e atividade natatória no controle e nos girinos expostos aos agrotóxicos foi avaliada por análise de variância (ANOVA One-Way) seguida do teste de Tukey ou Dunnett, quando $p < 0,05$, sendo utilizado os *software* Statistic 8.0 e Grap Pad.

O valor de CEO (concentração de efeito observado) e o CENO (concentração de efeito não observado) foram determinados através da ANOVA pelo teste de Dunnett.

Para avaliação de risco ecológico foi utilizado a abordagem do quociente de risco agudo (*hazard quotient* = HQ) (Equação 1) e do quociente de risco crônico (*chronic hazard quotient* = CHQ) (Equação 2). Ambas equações relacionam a concentração ambiental estimada do toxicante (CEA) pela CL_{50} para o quociente de risco agudo e pelo CENO para o quociente de risco crônico.

$$HQ = \frac{CEA}{CL_{50}} \quad (1)$$

$$CHQ = \frac{CEA}{CENO} \quad (2)$$

Quando o valor de CENO não foi encontrado estatisticamente, utilizou-se os valores de CEO para o cálculo do CHQ (WU et al., 2015). O valor obtido de CHQ foi comparado com o nível preocupação (LOC – *level of concern*) da USEPA (*Environmental Protection Agency*)

(USEPA, 1998). Para o risco crônico o valor do LOC é igual 1, caso o CHQ for maior que o valor de LOC de 1, este tem potencial de risco crônico para animais aquáticos. E para o risco agudo o valor de LOC é 0,5, se for maior que este possui risco para a espécie (EPA, 2019).

Utilizando esta mesma abordagem, calculou-se dois coeficientes de risco crônico, utilizando duas concentrações estimadas do toxicante (CEA) sendo o CHQ1, com máxima concentração ambiental encontrada na literatura = 74,5 µg/L de 2,4 D (PINHEIRO; SILVA; KRAISCH, 2010) + 1000 µg/L de glifosato (RODRIGUES; ALMEIDA, 2005), e o CHQ2 com concentração permitida na água potável para consumo humano = 30µg/L de 2,4 D + 500µg/L de glifosato (Portaria do Ministério da Saúde 2914/2011). O CHQ1 se refere a estimativa de risco com o máximo ambiental e o CHQ2 a estimativa de risco utilizando o máximo permitido em lei.

A Máxima Concentração Aceitável de Toxicante (MCAT) foi determinada pela média geométrica dos valores de CEO e CENO.

4 RESULTADOS

4.1 MORTALIDADE

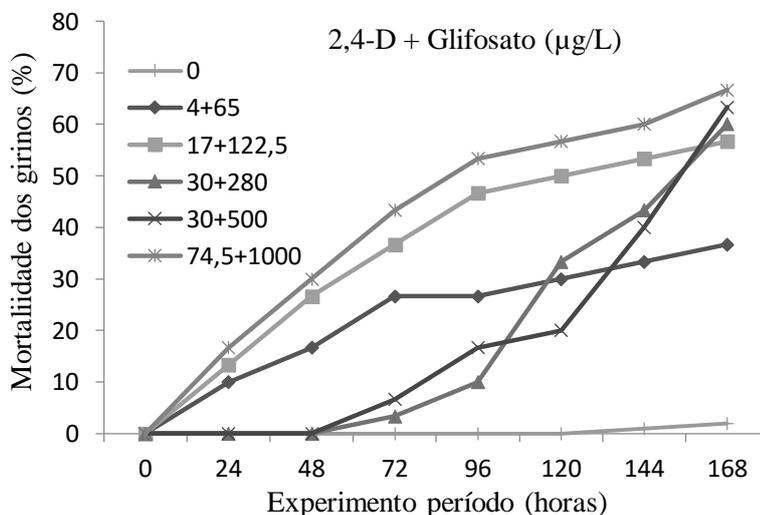
A mortalidade foi alta no ensaio crônico, sendo maior que 50% a partir de 17,0 µg/L_{2,4D} + 122,5 µg/L_{gli}. A CL₅₀ de 168 horas da mistura foi de 12,5 µg/L_{2,4-D} (±95% = 5,3 - 29,8) + 142,6 µg/L_{gli} (±95% = 67,9 - 299,4) (Tabela 3 e Figura 8) para girinos de *P. cuvieri*. Não houve influência significativa das concentrações misturadas ($F_{(5, 36)} = 2,18$, $p = 0,07$) na mortalidade dos girinos após exposição a 168 horas.

Tabela 3: Mortalidade de girinos de *Physalaemus cuvieri* submetidos ao teste crônico em relação ao tempo de exposição a mistura de agrotóxicos 2,4-D e glifosato.

Concentração (µg/L) 2,4-D + Glifosato	Mortalidade							Total	Mort. (%)
	24h	48h	72h	96h	120h	144h	168h		
0 + 0	0	0	0	0	0	0	1	1	3
4,0 + 65,0	3	2	3	0	1	1	1	11	37
17,0 + 122,5	3	4	3	3	1	1	1	16	54
30,0 + 280,0	0	0	1	2	7	3	5	18	60
30,0 + 500,0	0	0	2	3	1	6	7	19	63
74,5 + 1000,0	5	4	4	3	1	1	2	20	67

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Figura 8: Mortalidade cumulativa de girinos de *P. cuvieri* expostos a mistura de 2,4-D e Glifosato, submetidos ao ensaio crônico.



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Como os valores da CL_{50} obtidos foram menores que 1 mg/L esta apresenta alta toxicidade para a espécie segundo o GHS.

4.2 ATIVIDADE NATATÓRIA

A mistura dos agrotóxicos 2,4 D e glifosato afetou a atividade natatória dos girinos expostos, sendo significativa em todas as concentrações ($F_{(5,12)} = 9,133$; $p < 0,05$; Tukey = $p < 0,05$, Figura 8). No controle todos indivíduos se mantiveram no padrão 0 (sem alteração na atividade natatória). Entretanto, na presença do agrotóxico nas primeiras 24 horas foi observado alteração na atividade natatória em algumas concentrações, como a 17 $\mu\text{g/L}_{2,4\text{-D}}$ + 122,5 $\mu\text{g/L}_{\text{gli}}$ e 74,5 $\mu\text{g/L}_{2,4\text{-D}}$ + 1000 $\mu\text{g/L}_{\text{gli}}$. No final do ensaio crônico, em todas as concentrações testadas haviam girinos com alterações na atividade natatória (Tabela 4).

Nas misturas de 2,4-D e glifosato observou-se a maior frequência de indivíduos sem resposta (3) e (4) atividade natatória com contrações espasmódicas, tremores ou convulsões.

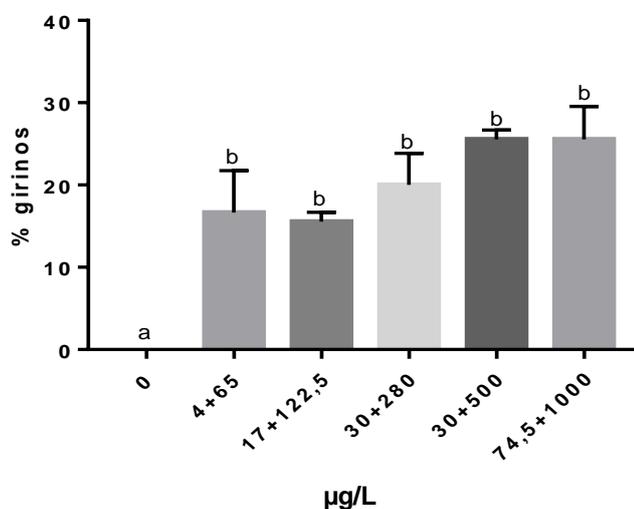
Tabela 4: Atividade natatória dos girinos expostos ao ensaio crônico da mistura de 2,4-D e glifosato. Endpoints: (0) atividade natatória igual do controle, (1) letargia, ou atividade natatória menor que o controle, (2) Hiperatividade, ou atividade natatória maior do controle, (3) sem resposta (4) atividade natatória com contrações espasmódicas, tremores ou convulsões.

Agrotóxico	Concentração ($\mu\text{g/L}$)	Atividade Natatória						
		24h	48h	72h	96h	120h	144h	168h
	0 + 0	0	0	0	0	0	0	0
2,4-D + Glifosato	4 + 65	0	3	0	0	0	4	1
	17 + 122,5	3	3	3	3	3	3	0
	30 + 280	0	0	4	3	4	3	4
	30 + 500	0	0	0	4	4	2	2
	74,5 + 1000	3	3	3	2	2	3	2

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Com relação ao tempo (horas) de exposição dos girinos as concentrações, notou-se que o endpoint que mais se destacou foi o padrão (3) sem resposta. No último dia de exposição (168 horas) houve uma maior frequência do endpoint (2) movimento maior que o controle, pois os girinos que apresentaram os padrões 3 e 4 morreram antes do final do ensaio (Figura 9).

Figura 9: Total de girinos de *P. cuvieri* que apresentaram alterações na atividade natatória na exposição a mistura de 2,4-D e glifosato.



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

4.3 MALFORMAÇÃO

Foram analisados 95 girinos para a avaliação da alteração morfológicas (que sobreviveram ao ensaio crônico). Destes, 18 (19%) dos girinos analisados apresentaram alterações morfológicas (Tabela 5).

Foram observadas os seguintes tipos de malformações em girinos de *Physalaemus cuvieri*: alteração na boca, (2%), alteração na forma e/ou tamanho do intestino (14%), alteração no formato da coluna (1%) e presença de edemas (5%).

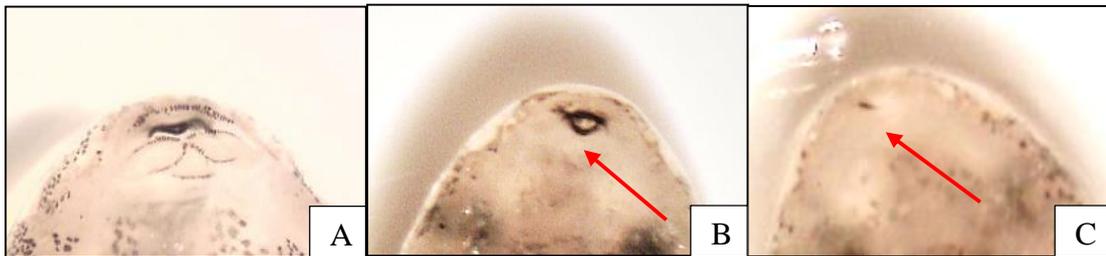
Tabela 5: Malformações nos girinos de *Physalaemus cuvieri* expostos ao teste crônico a mistura de agrotóxicos 2,4-D e glifosato.* Dunnett, $p < 0,05$.

2,4 D + glifosato (µg/L)	Indivíduos Analisados	Indivíduos com Malformação	Alteração na boca	Alteração no intestino	Alteração na coluna	Presença de edemas
Controle	29	0 (0,0%)	0	0	0	0
4+65	19	6 (31,5%)	0	5	1	0
17+122,5	14	3 (21,4%)	0	2	0	1
30+280	12	0 (0,0%)	0	0	0	0
30+500	11	2 (18,2%)	0	0	0	2
74,5+1000	10	7 (70,0%)	2*	6*	0	2

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

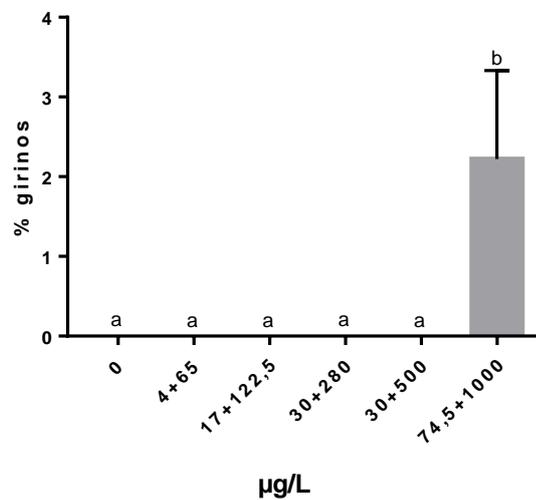
A presença de malformação na boca ($F_{(5, 12)} = 4,00$; $p = 0,02$, Dunnett, $p < 0,05$) e intestino ($F_{(5, 12)} = 4,17$; $p = 0,02$, Dunnett, $p < 0,05$) em girinos de *P. cuvieri* foi significativa em relação ao controle somente na maior concentração testada $74,5 \mu\text{g/L}_{2,4\text{-D}} + 1000 \mu\text{g/L}_{\text{gli}}$ (Figura 10, 11, 12 e 13). As malformações na coluna ($F_{(5, 12)} = 1,00$; $p = 0,46$) e a presença de edemas ($F_{(5, 12)} = 1,97$; $p = 0,16$) não foram significativas em relação ao controle (Figura 14 e Figura 15).

Figura 10: Alteração morfológica na boca de girinos de *P. cuvieri* no estágio 25. (A) girino do controle negativo com a formação da boca com todos os queratodontes. Girinos expostos a concentração de $74,5 \mu\text{g/L}_{2,4\text{-D}} + 1000 \mu\text{g/L}_{\text{gli}}$ (B) girino com ausência de queratodontes e (C) girinos sem o desenvolvimento dos lábios da boca e ausência dos queratodontes.



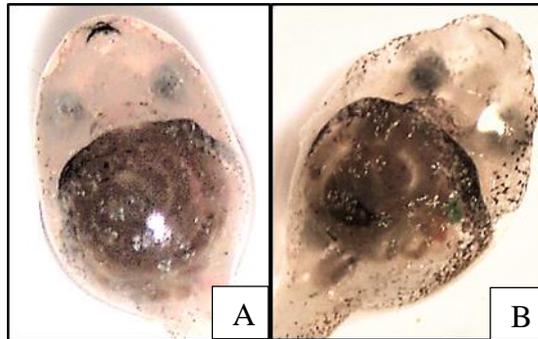
Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Figura 11: Porcentagem de girinos de *P. cuvieri* expostos a mistura de 2,4-D e glifosato, que apresentaram malformações na boca.



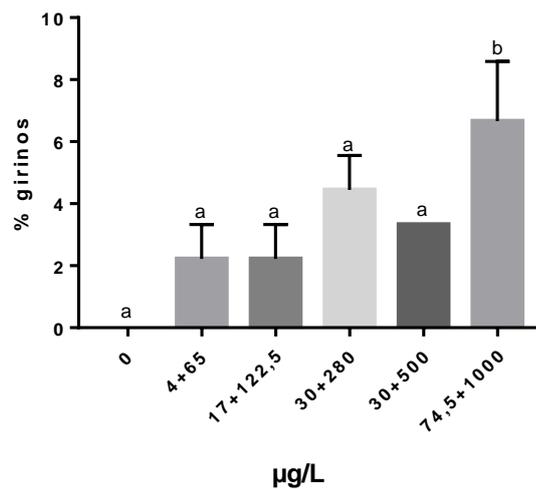
Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Figura 12: Alteração morfológica do intestino em girinos de *P. cuvieri*, (A) intestino normal em formato de espiral; (B) intestino alterado com malformação exposto a mistura de 2,4-D e glifosato.



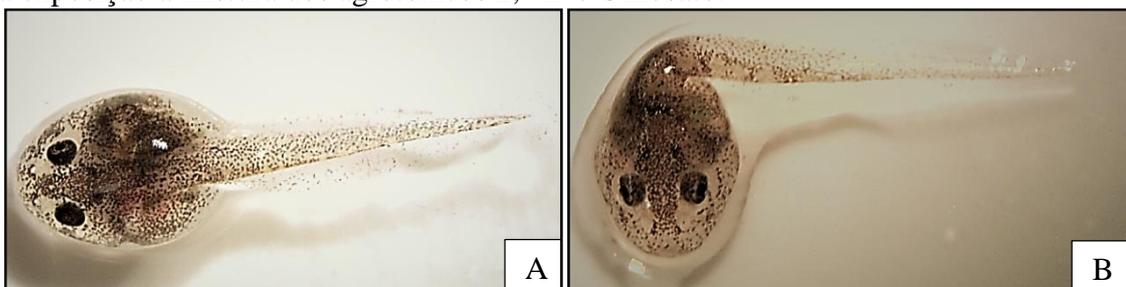
Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Figura 13: Porcentagem de girinos de *P. cuvieri* expostos a mistura de 2,4 D e glifosato, que apresentaram malformações no intestino.



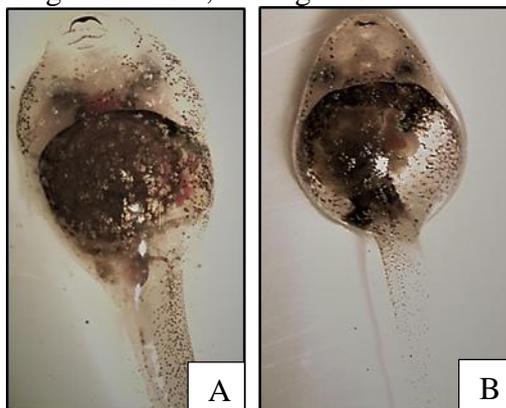
Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Figura 14: (A) Girino de *P. cuvieri* com a coluna normal e (B) Girino com alteração na coluna pela exposição a mistura dos agrotóxicos 2,4 D e Glifosato.



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Figura 15: (A) Girino normal de *P. cuvieri* e (B) Girino com a presença de edema provocado pela exposição a mistura dos agrotóxicos 2,4-D e glifosato.



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

4.4 AVALIAÇÃO DE RISCO ECOLÓGICO

Houve risco ecológico agudo para *P. cuvieri*, pois o valor de HQ foi superior ao nível de preocupação (LOC=0,5), apresentando um risco agudo para a espécie. O valor de CENO foi de $30 \mu\text{g/L}_{2,4\text{-D}} + 500 \mu\text{g/L}_{\text{gli}}$ e o CEO de $74,5 \mu\text{g/L}_{2,4\text{-D}} + 1000 \mu\text{g/L}_{\text{gli}}$ para os endpoints alteração na boca e/ou tamanho do intestino. A MCAT variou de $4 \mu\text{g/L}_{2,4\text{-D}} + 65 \mu\text{g/L}_{\text{gli}}$ a $47,3 \mu\text{g/L}_{2,4\text{-D}} + 707,165 \mu\text{g/L}_{\text{gli}}$ para a atividade natatória e malformação (Tabela 6).

Os valores obtidos de CHQ1 foram superiores a LOC=1 demonstrando alto risco para espécie e a necessidade de ser avaliada. Para CHQ2, demonstrou risco ecológico somente para a atividade natatória.

Tabela 6: Valores da Concentração de efeito não observado (CENO), Concentração de efeito observado (CEO), máxima concentração ambiental do toxicante que causa efeito, (MCAT) e quociente de risco crônico 1 e 2 (CHQ) determinados para as alterações morfológicas significativas e atividade natatória para os girinos de *P. cuvieri* expostos a mistura de 2,4-D e glifosato. CHQ 1 – coeficiente de risco com máxima concentração ambiental encontrada na literatura, CHQ 2 – coeficiente de risco com concentração permitida na água potável.

<i>Endpoint</i>	CENO ($\mu\text{g/L}$)	CEO ($\mu\text{g/L}$)	MCAT ($\mu\text{g/L}$)	CHQ1	CHQ2
Alteração na boca	30,0+	74,5+	47,3 +	2,5+2,0	1,0+1,0
	500,0	1000,0	707,1		
Alteração no intestino	30,0+	74,5 +	47,3 +	2,5+2,0	1,0+1,0
	500,0	1000,0	707,1		
Atividade natatória	-	4,0 +	4,0+	18,6¹	7,5+7,7
		65,0	65,0	+15,4	

¹Valor calculado utilizando CEO.

Valores em negrito apresentam alto risco crônico.

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

5 DISCUSSÃO

Este estudo utilizou como organismo teste o anfíbio bioindicador *P. cuvieri*, que apresentou sensibilidade a mistura dos agrotóxicos 2,4-D com glifosato, com dados que demonstram efeitos agudos em 168 horas de exposição (7 dias), mas em concentrações consideradas subletais.

Este é o primeiro estudo com a mistura destes dois herbicidas e anfíbios, por isso não temos bases para comparações. No entanto, trabalhos testando estes dois agrotóxicos isoladamente obtiveram uma $CL_{50;96h}$ de 12660 $\mu\text{g/L}$ para o 2,4-D (FOLADOR et al., dados não publicados), e de 1360 $\mu\text{g/L}$ para o glifosato para *P. cuvieri* (HEREK, 2017). Isso mostra que isoladamente a concentração letal destes herbicidas é baixa, no entanto a mistura levou a mortalidade aguda em um tempo de exposição maior. A $CL_{50;168h}$ da mistura para *P. cuvieri* (12,5 $\mu\text{g/L}_{2,4-D} + 142,6 \mu\text{g/L}_{gli}$) foi menor que o máximo permitido para águas superficiais de classe 3 da CONAMA 357/2005 (30 $\mu\text{g/L}$ de 2,4-D; 280 $\mu\text{g/L}$ de glifosato), e classificada em alta toxicidade pelo GHS (2019), demonstrando que os padrões recomendados por lei, se misturados, podem afetar a sobrevivência desta espécie.

A mortalidade ocorrida em 168 horas de exposição dos girinos a mistura de agrotóxicos mostra efeitos sinérgicos em *P. cuvieri*, quando comparados com os agrotóxicos testados isoladamente, ou seja, efeito maior que a soma dos efeitos de cada toxicante em separado. O 2,4-D e o glifosato testados isoladamente resultaram em baixa mortalidade para a mesma espécie em 168 horas com doses crônicas semelhantes a este estudo (SANTOS et al., dados não publicados; HEREK, 2017). Assim, a mistura de 2,4-D e glifosato mostra-se mais tóxica do que os agrotóxicos testados isoladamente com relação a mortalidade.

A atividade natatória é um padrão de comportamento importante para girinos, pois a natação reduzida significa menor capacidade para escapar de predadores e por isso, mais susceptibilidade a predação (AZEVEDO-RAMOS et al., 1992). Com isso, alterações na natação dos girinos devido a efeitos subletais de agrotóxicos podem afetar a interação entre as espécies de anfíbios e a cadeia trófica (HOWE et al., 1998; PELTZER et al., 2013).

Todas as concentrações das misturas de 2,4 D e glifosato testadas causaram alteração na atividade natatória dos girinos de *P. cuvieri*. Além disso, houve a predominância da alteração na atividade natatória de (3) sem resposta e (4) atividade natatória com contrações espasmódicas, tremores ou convulsões nos girinos. Isoladamente, concentrações sub-letais de 2,4 D e glifosato podem causar letargia em anfíbios (VARGAS, 2017; SANTOS et al., dados

não publicados). A mistura manteve o comportamento de letargia e incluiu o de espasmos, mostrando efeitos maiores da mistura a esse comportamento do animal.

As alterações na atividade natatória observadas neste estudo pode ter relação com o fato de exposições a agrotóxicos afetarem o comportamentos de anfíbios, por meio de alterações diretas no sistema nervoso central (WEIS et al., 2001; MOUTINHO; SCHIESARI, 2013). Os espasmos podem estar relacionados a alterações da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), presente no sistema nervoso central, como relatado para o peixe *Jenynsia multidentata* que após a exposição ao glifosato teve inibição da atividade da AChE (SANCHEZ, 2015), bem como o anfíbio *Xenopus laevis* (LAJMANOVICH et al., 2013). Para o 2,4-D efeito similar ocorreu em *Leporinus obtusidens* na atividade da AChE presente no músculo e no cérebro (FONSECA et al., 2008). A AChE está envolvida com a hidrólise da acetilcolina (ACh) nas terminações nervosas evitando tremores nervosos contínuos, sendo esta vital para o funcionamento do sistemas neuromusculares (LAJMANOVICH et al., 2013).

Em relação as malformações encontradas, houve alteração na boca com a ausência dos lábios e a perda parcial ou total dos queratodontes e malformação no intestino na concentração mais alta testada, que coincide com os máximos encontrados em águas superficiais na América do Sul (RODRIGUES; ALMEIDA, 2005; PINHEIRO; SILVA; KRAISCH, 2010). Infelizmente um reduzido número de girinos chegaram vivos ao final do ensaio, e por isso, o número baixo de indivíduos com alterações podem não demonstrar se a mistura de 2,4 D e glifosato realmente causa malformações em número significativo.

A perda dos queratodontes e malformação da boca devido a exposição à diferentes agrotóxicos já foi observadas em diferentes anfíbios, como em *Hypsiboas pulchellus* expostos ao herbicida Pivot H® (um herbicida à base de Imazetapir) (PÉREZ-IGLESIAS et al., 2015) e *P. gracilis* expostos a atrazina (RUTKOSKI et al., 2018). Essa malformação pode tornar os girinos menos ativos e com aptidão reduzida em relação a nutrição ocasionando a mortalidade durante o período larval dos anfíbios (PÉREZ-IGLESIAS et al., 2015).

A alteração na forma e/ou tamanho do intestino foram observadas em todas as concentrações testadas da mistura, sendo significativa na maior concentração testada. Lenkowski, Sanchez-Bravo e Mclaughlin (2010) demonstrou que 2,4-D causou um aumento de malformações intestinais em girinos de *X. laevis*, e que a ocorrência destas malformações pode ser oriunda de um rompimento de uma via de sinalização específica da morfogênese do órgão e da visceral.

As outras malformações observadas foram alteração no formato da cauda dos girinos, o que pode prejudicar a capacidade locomotora e aumentar a chances de predação (WILBUR;

SEMLITSCH, 1990), e edemas (JAYAWARDENA et al., 2010). Esse último foi encontrado principalmente nas duas concentrações mais altas da mistura. O edema causa um deslocamento do centro de gravidade, resultando em torção do eixo do corpo, afetando o comportamento de natação dos indivíduos (JAYAWARDENA et al., 2010). Girinos com edemas acabam nadando de cabeça para baixo e não conseguindo se equilibrar em seu corpo na natação, e os edemas após a ruptura podem ser fatais (JAYAWARDENA et al., 2010). Essas duas malformações afetam o deslocamento, dificultam a alimentação e conseqüentemente, a sobrevivência das populações de anfíbios em agroecossistemas (BACH et al., 2016) afetados com herbicidas.

Outros estudos mostram alterações morfológicas causadas pela exposição a 2,4 D e glifosato isoladamente em anfíbios. Girinos de *P. albonotatus* expostos ao 2,4-D apresentaram diversas anormalidades morfológicas e alterações histológicas do fígado, sendo as mais frequentes a malformação da boca e do intestino nas maiores concentrações testadas (CURI et al., 2019). A ocorrência de malformação pela exposição ao 2,4-D também foram observadas em embriões de *Rhinella arenarum* (ARONZON et al., 2011). A exposição de *P. cuvieri* e *P. gracilis* a concentrações da legislação e ambientalmente relevantes de glifosato induziram diversas malformações nos girinos, como edemas, morfologia no intestino, olho, cor do epitélio, morfologia do corpo, desvio da coluna e boca (HEREK, 2017).

Em estudos com a mesma espécie, a fórmula comercial de 2,4-D (SANTOS et al., dados não publicados) e de glifosato testados isoladamente também causaram malformação (HEREK, 2017). Além disso, em outro estudo o glifosato causou indução de malformações crânio faciais em embriões de *X. laevis* (BONFANTI et al., 2018). Se isoladamente esses dois herbicidas causam malformação em anfíbios expostos, é possível que a mistura também pode causar. Porém são necessários mais estudos para confirmar essa hipótese.

A avaliação de risco ecológico tem o objetivo de avaliar a probabilidade em que possam ocorrer efeitos ecológicos adversos resultantes de exposições a um ou mais agentes estressores (USEPA, 1992). Dentro da avaliação de risco pode-se usar a máxima concentração aceitável do toxicante para o efeito observado (MATC), verificando qual a concentração máxima a espécie poderia entrar em contato na natureza. A MCAT para malformação do intestino e boca variou de $4,0 \mu\text{g}/\text{L}_{2,4\text{-D}} + 65,0_{\text{gli}}$ a $47,3 \mu\text{g}/\text{L}_{2,4\text{-D}} + 707,1 \mu\text{g}/\text{L}_{\text{gli}}$. Isso significa que essas concentrações seriam o máximo a que *P. cuvieri* poderia ser exposto, com poucos efeitos tóxicos.

Dentro da avaliação de risco propriamente dita, os valores obtidos ficaram acima do nível de preocupação (LOC = 1), quando foi utilizada máxima concentração de 2,4 D e glifosato em águas superficiais. Em uma avaliação mais conservadora, usando como parâmetro o definido pela portaria Portaria do Ministério da Saúde 2914/2011 para água potável, o nível de

preocupação foi igual a 1 para malformação e acima disso para atividade natatória. Isso demonstra que a mistura destes dois agrotóxicos tem risco para a espécie de *P. cuvieri* e que esse fato deve ser cuidadosamente avaliado.

Com relação a atividade natatória, a espécie apresentou alto risco ecológico e um MCAT de 4 µg/L (2,4-D) e 65 µg/L (glifosato), igual ao permitido pela CONAMA 357/2005 para águas superficiais de classe 1 (4 µg/L de 2,4-D com 65 µg/L de glifosato), demonstrando que a mistura tem alto impacto sobre a espécie estudada e pode afetar a sua sobrevivência. Os ensaios de toxicidade crônica deste trabalho foram realizados por base em concentrações permitidas na legislação e concentrações ambientalmente relevantes. Neste sentido, a concentração de 30 µg/L de 2,4-D com 280 µg/L de glifosato (permitido pela CONAMA 357/2005 para rios de classe 3) é uma concentração superior a determinada pela $CL_{50;168h}$ dos indivíduos de *P. cuvieri*, sendo que a mistura desta concentração pode ocasionar alta mortalidade dos girinos e possivelmente alterações morfológicas.

Os resultados obtidos no presente estudo correlacionam com o que foi encontrado em estudos anteriores onde verificaram ocorrer a sinergia quando agrotóxicos são misturas para ensaios de toxicidade. O glifosato (formulação Credit ®) e o 2,4-D (da formulação Weedar® Full) induziram efeitos sinérgicos nas espécies *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces, Poeciliidae) no ensaio de toxicidade aguda comparado com estes agrotóxicos testados isoladamente (ARCAUTE et al., 2018). Brodeur et al (2014) também obteve sinergia entre os agrotóxicos glifosato e cipermetrina no ensaio agudo com girinos de *R. arenarum*. Deste modo, percebe-se que tanto o agrotóxico isolado como em mistura podem causar efeitos prejudiciais a organismos aquáticos.

Neste estudo obteve-se um potencial efeito de sinergia na mistura dos agrotóxicos 2,4-D com glifosato em anfíbios de *P. cuvieri* com relação a mortalidade e atividade natatória. Entretanto, não pode se afirmar com clareza que houve a ocorrência da sinergia da mistura destes agrotóxicos, devido haver a necessidade de realização de mais estudos avaliando o comportamento nas células e enzimas dos anfíbios e como os agrotóxicos possam estar agindo nestes.

6 CONCLUSÕES

O presente trabalho verificou que a mistura de dois herbicidas muito utilizados na agricultura, pode causar alterações na sobrevivência de *P. cuvieri*. Embora os agrotóxicos 2,4-D e glifosato sejam desenvolvidos para o controle de ervas daninhas na agricultura, estes podem ser capazes de afetar negativamente a vida desta espécie, podendo causar malformações, alterações na atividade natatória e mortalidade.

A prolongada exposição dos girinos a mistura dos agrotóxicos causou mortalidade em concentrações menores que as concentrações encontradas para CL₅₀ dos agrotóxicos isolados. Desta forma, percebe-se que a mistura deste dois herbicidas pode ter efeitos sinérgicos para a espécie. Entretanto, para alterações morfológicas foram menores os efeitos quando comparados com os agrotóxicos isolados.

A exposição de *P. cuvieri* a mistura de 2,4-D e glifosato apresentou alto risco ecológico para esta espécie, mesmo nas mais baixas concentrações testadas e que podem afetar a sobrevivência destes. Demonstrando a sensibilidade que esta espécie possui com relação a mistura destes agrotóxicos.

Este estudo demonstrou a importância da realização de análise dos agrotóxicos misturados e não somente isolados. Sendo que, muitos destes agrotóxicos são utilizados na agricultura de forma discriminada e com isso chegando ao meio ambiente altas concentrações de compostos xenobióticos que acabam afetando diversos organismos não alvo e ocasionando a contaminação do ambiente aquático.

7 RECOMENDAÇÕES

Realizar ensaios toxicológicos para análise das células e bioquímicas para verificação do comportamento da mistura destes agrotóxicos no organismo de *P. cuvieri*;

Realizar estudos utilizando outras espécies para analisar a toxicidade da mistura destes herbicidas;

Realizar outros ensaios toxicológicos com misturas de outros agrotóxicos para verificar a toxicidade destes em animais não alvo;

REFERÊNCIAS

ALTIG, R.; MCDIARMID, R. W. **Tadpoles: The biology of anuran larvae**. Chicago: The University of Chicago Press, 1999, 458 p.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2016. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3077917/CONSULTA+P%C3%9ABLICA+N+264+GGTOX.pdf/b483e301-4de5-4a5e-8c81-db46eb4e0069>>. Acesso em: 27 de mar. 2019.

ARCAUTE, C. R.; SOLONESKI, S.; LARRAMENDY, M. L. Opposite effects of mixtures of commercial formulations of glyphosate with auxinic herbicides on the ten spotted live-bearer fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces, Poeciliidae). **Environmental Pollution**, v. 240, p. 858-866, 2018.

ARONZON, C. M.; SANDOVAL, M. T.; HERKOVITS, J.; PÉREZ-COLL, C. S. Stage-dependent toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic on the embryonic development of a South American toad, *Rhinella arenarum*. **Environmental Toxicology**, v. 26, p. 373-381, 2011.

AZEVEDO-RAMOS, C.; SLUYS, M. V.; HERO, J.; MAGNUSSON, W. E. Influence of tadpole movement on predation by Odonate Naiads. **Journal of Herpetology**, v. 26, n.3, p. 335-338, 1992.

BACH, N. C.; NATALE, G. S.; SOMOZA, G. M.; RONCO, A. E. Effect on the growth and development and induction of abnormalities by a glyphosate comercial formulation and its active ingrediente during two developmental stages of the South-American Creole frog, *Leptodactylus latrans*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, p. 23959-23971, 2016.

BECKER, F. G.; RAMOS, R. A.; MOURA, L. de A. **Biodiversidade. Regiões da Lagoa do Casamento e dos Butiazais de Tapes, planície costeira do Rio Grande do Sul**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2007. 388 p.

BELCHIOR, D. C. V.; SARAIVA, A. S.; LÓPEZ, A. M. C.; SCHEIDT, G. N. Impactos de agrotóxicos sobre o meio ambiente e a saúde humana. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, Brasília, v. 34, n. 1, p. 135-151, 2014.

BOIVIN, A.; AMELLAL, S.; SCHIAVON, M.; GENUCHTEN, M. T. V. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) sorption and degradation dynamics in three agricultural soils. **Environmental Pollution**, v. 138, p. 92-99, 2005.

BOKÁN, K.; SYBERG, K.; JENSEN, K.; RANK, J. Genotoxic potential of two herbicides and their active ingredients assessed with comet assay on a fish cell line, Epithelioma Papillosum Cyprini (EPC). **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A: Current Issues**, 2013.

BONFANTI, P.; SAIBENE, M.; BACCHETTA, R.; MANTECCA, P.; COLOMBO, A. A glyphosate micro-emulsion formulation displays teratogenicity in *Xenopus laevis*. **Aquatic Toxicology**, v.195, p. 103-113, 2018.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Portaria nº2.914 de 12 de dezembro de 2011: Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. In: Portaria, 2011. Disponível em:<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html>. Acesso em: 16 nov. 2018.

BRASIL. **Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional de Meio Ambiente, CONAMA**. Resolução CONAMA nº 357 de 17 de março de 2005: Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. In: Resoluções, 2005. Disponível em: <<http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>>. Acesso em: 16 nov. 2018.

BRODEUR, J. C.; POLISERPI, M. B.; D'ANDREA, M. F.; SÁNCHEZ, M. Synergy between glyphosate- and cypermethrin-based pesticides during acute exposures in tadpoles of the common South American Toad *Rhinella arenarum*. **Chemosphere**, v. 112, p. 70-76, 2014.

BRÜHL, C. A.; SCHMIDT, T.; PIEPER, S.; ALSCHER, A. Terrestrial pesticide exposure of amphibians: An underestimated cause of global decline? **Scientific Reports**, p. 4, 2013.

CANTY, M. N.; HAGGER, J. A.; MOORE, R. T. B.; COOPER, L.; GALLOWAY, T. S. Sublethal impacto of short term exposure to the organophosphate pesticide azamethiphos in the marine mollusc *Mytilus edulis*. **Marine Pollution Bulletin**, v. 54, p. 396-402, 2007.

CECATO, G. C.; SOUZA, A. V.; QUEMEL, F. da S.; VALLE, J. S. do; GOMES, S. de M. S.; LOPES, A. D. Atividade residual e carência irregular do ácido diclorofenoxiacético (2,4D) no desenvolvimento inicial da soja. **Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR**, Umuarama, v. 20, n. 3, p. 167-171, jul./set. 2017.

CHAVES, M. J. S.; VERBINNEN, R. T.; DINIZ, M. S.; VIANA, J. L. M.; MENDONÇA, C. J. S.; FRANCO, T. C. R. S. Eficiência e Robustez na Determinação do Herbicida 2,4-D em Águas Superficiais. **Revista Virtual de Química**, v. 10, p. 1- 11, 2018.

CONCENÇO, G.; ANDRES, A.; SILVA, A. F. da; GALON, L.; FERREIRA, E. A.; ASPIAZÚ, I. Ciência das Plantas Daninhas: Histórico, Biologia, Ecologia e Fisiologia. In: MONQUERO, P. A. **Aspectos da biologia e manejo das plantas daninhas**. São Carlos, Embrapa, p. 1-10, 2014.

CORT, C. C. W. D.; GHISI, N. C. Uso de alterações morfológicas nucleares em *Astyanax spp.* Para avaliação da contaminação aquática. **O mundo da saúde**, v. 38, p.31-39, 2014.

COSTA, N. V. da; MARTINS, D.; COSTA, A. C. P. R. da; CARDOSO, L. A. EFICÁCIA DO GLYPHOSATE E 2,4-D NO CONTROLE DE ESPÉCIES DE TRAPOERABAS (*Commelina spp.*). **Bioscience Journal**, v.27, p.718-728, 2011.

COUTINHO, C. F. B.; MAZO, L. H. Complexos metálicos com o herbicida glifosato. **Química Nova**, v. 28, p. 1038-1045, 2005.

CURI, L. M.; PELTZER, P. M. SANDOVAL, M. T. LAJMANOVICH, R. C. Acute Toxicity and Sublethal Effects Caused by a Commercial Herbicide Formulated with 2,4-D on *Physalaemus albonotatus* Tadpoles. **Water, Air, & Soil Pollution**, p. 1-15, 2019.

DHAWAN, A.; BAJPAYEE, M.; PARMAR, D. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. **Cell Biology and Toxicology**, v. 25, p. 5-32, 2009.

DORNELLES, M. F. **Efeito dos herbicidas atrazina, Glifosato e quinclorac sobre a composição bioquímica, a peroxidação lipídica e a sobrevivência de girinos de *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802)**. 2013. 155 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

EDGE, C. B.; THOMPSON, D. G.; HAO, C.; HOULAHAN, J. E. A silviculture application of the glyphosate-based herbicide VisionMAX to wetlands has limited direct effects on amphibian larvae. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 31, p. 2375-2383, 2012.

EPA. United States Environmental Protection Agency, 2019. Disponível em: <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/24-d>. Acesso em: 20 abr. 2019.

EPA. United States Environmental Protection Agency, 2019. Disponível em: <https://www.epa.gov/pesticide-science-and-assessing-pesticide-risks/technical-overview-ecological-risk-assessment-risk>. Acesso em: 10 mar. 2019.

FONSECA, M. B.; GLUSCZAK, L.; MORAES, B. S.; MENEZES, C. C.; PRETTO, A.; TIerno, M. A.; ZANELA, R.; GONÇALVES, F. F.; LORO, V. L. The 2,4-D herbicide effects on acetylcholinesterase activity and metabolic parameters of piava freshwater fish (*Leporinus obtusidens*). **Ecotoxicology And Environmental Safety**, v. 69, p.416-420, 2008.

FROST. Amphibian species of the world: an online reference. American Museum of Natural History, New York. Disponível em: <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia>>. Acesso em: 29 jun. 2019.

GATHERCOLE, W. H.; G, N. **2,4-D Herbicide – The Industry Task Force II On 2,4-D Research Data – Improved 2,4-D Web-Site – Myths Versus Facts – 2012 09 00**. 2012. Disponível em: < <http://pesticidetruths.com/2012/09/11/24-d-herbicide-the-industry-task-force-ii-on-24-d-research-data-improved-24-d-web-site-myths-versus-facts-2012-09-00/>>. Acesso: 8 jun. 2019.

GE, H.; LIN, Z.; YAO, Z.; GAO, Y.; CONG, Y.; YU, H. Balance between herbicidal activity and toxicity effect: A case study of the joint effects of triazine and phenylurea herbicides on *Selenastrum capricornutum* and *Photobacterium phosphoreum*. **Aquatic Toxicology**, v. 150, p. 165-174, 2014.

GHS. Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals. **Environmental Risk Assessment**. 2019. Disponível em: < https://www.chemsafetypro.com/Topics/CRA/ecotox_aquatic_toxicity.html >. Acesso: 8 jun. 2019.

GIESY, J. P.; DOBSON, S.; SOLOMON, K. R. Ecotoxicological Risk Assessment for Roundup® Herbicide. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 167, p. 35-120, 2000.

GOSNER, K. L. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. **Herpetologica**, v. 16, n.3, p. 183-189, set. 1960.

GÜNGÖRDÜ, A.; UÇKUN, M.; YOLOGLU, E. Integrated assessment of biochemical markers in premetamorphic tadpoles of three amphibian species exposed to glyphosate- and methidathion-based pesticides in single and combination forms. **Chemosphere**, v. 144, p. 2024-2035, 2016.

HALL, R. J.; SWINEFORD, D. Toxic effects of endrin and toxaphene on the southern leopard frog *Rana sphenoccephala*. **Environmental Pollution Series A Ecological and Biological**, v. 23, p. 53-65, 1980.

HAMADACHE, M.; BENKORTBI, O.; HANINI, S.; AMRANE, A. QSAR modeling in ecotoxicological risk assessment: application to the prediction of acute contact toxicity of pesticides on bees (*Apis mellifera* L.). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, 1 ed., p. 896-907, 2017.

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THRUSTON, R. V. Trimmed Spearman-Kärber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science and Technology**, v. 1, n. 7, p. 714-718, 1977.

HAYES, T. B.; CASE, P.; CHUI, S.; CHUNG, D.; HAEFFELE, C.; HASTON, K.; LEE, M.; MAI, V. P.; MARJUOA, Y.; PARKER, J.; TSUI, M. Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: are we underestimating the impact? **Environmental Health Perspectives**, v. 114, p. 11, 2006.

HELFRICH, L. A. Pesticides and aquatic animals: a guide to reducing impacts on aquatic systems. **Virginia Department of Game and Inland Fisheries**, Blacksburg, p. 24, 2009.

HEREK, J. **Glifosato e seus efeitos sobre duas espécies de anfíbios nativos da América do Sul *Physalaemus cuvieri* e *Physalaemus gracilis***. 2017. 110 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Federal da Fronteira Sul, Erechim, 2017.

HOWE, G. E.; GILLIS, R.; MOWBRAY, R. C. Effect of chemical synergy and larval stage on the toxicity of atrazina and alachlor to amphibian larvae. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 17, p. 519-529, 1998.

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Boletim de comercialização de agrotóxicos e afins, histórico de vendas 2016**. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#boletinsanuais>>. Acesso em: 29 abr. 2019.

INICIATIVA 2,4-D. **O que é o 2,4-D**. Disponível em: <<https://www.iniciativa24d.com.br/revisao/pt-br/o-que-e-o-24-d/>>. Acesso em: 30 jun. 2019.

JESUS, T. B. de; CARVALHO, C. E. V. Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg). **Oecologia Brasiliensis**, v.12, p.680-693, 2008.

JAYAWARDENA, U. A.; RAJAKARUNA, R. S.; NAVARATNE, A. N.; AMERASINGHE, P. H. Toxicity of agrochemicals to common hourglass tree frog (*Polypedates cruciger*) in acute and chronic exposure. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 12, n. 5, p. 641-648, 2010.

JUNIOR, O. P. A.; SANTOS, T. C. R.; BRITO, N. M.; RIBEIRO, M. L. Glifosato: Propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, v. 25, n.4, p.589-593, 2002.

KUAN, A. C.; DEGRANDI-HOFFMAN, G.; CURRY, R. J.; GARBER, K. V.; KANAREK, A. R.; SNYDER, M. N.; WOLFE, K. L.; PURUCKER, S. T. Sensitivity analyses for simulating pesticide impacts on honey bee colonies. **Ecological Modelling**, v. 376, p. 15-27, 2018.

LAJMANOVICH, R.C.; JUNGES, C.M.; ATTADEMO, A.M.; PELTZER, P.M.; CABAGNA-ZENKLUSEN, M.C.; BASSO, A. Individual and mixture toxicity of commercial formulations containing glyphosate, metsulfuron-methyl, bispyribac-sodium, and picloram on *Rhinella arenarum* tadpoles. **Water, Air & Soil Pollution**, v. 224, 2013.

LAJMANOVICH, R. C.; ATTADEMO, A. M.; SIMONIELLO, M. F.; POLETTA, G. L.; JUNGES, C. M.; PELTZER, P. M.; GRENÓN, P.; CABAGNA-ZENKLUSEN, M. C. Harmful Effects of the dermal intake of comercial formulations containing chlorpyrifos, 2,4-D, and glyphosate on the common toad *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae). **Water Air Soil Pollut**, p. 12, 2015.

LENKOWSKI, J. R.; SANCHEZ-BRAVO, G.; MCLAUGHLIN, K. A. Low concentrations of atrazine, glyphosate, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, and triadimefon exposures have diverse effects on *Xenopus laevis* organ morphogenesis. **Journal of Environmental Sciences**, v. 22, p. 1305-1308, 2010.

LI, K.; WU, J.; JIANG, L.; SHEN, L.; LI, J.; HE, Z.; WEI, P.; LV, Z.; HE, M. Developmental toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in zebrafish embryos. **Chemosphere**, v.171, p. 40-48, 2017.

LOPES, C. V. A.; ALBUQUERQUE, G. S. C. de. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde Debate**, v.42, p. 518-534, 2018.

MACAGNAN, N.; RUTKOSKI, C. F.; KOLCENTI, C.; VANZETTO, G. V.; MACAGNAN, L. P.; STURZA, P. F.; HARTMANN, P. A.; HARTMANN, M. T. Toxicity of cypermethrin and deltamethrin insecticides on embryos and larvae of *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, p. 20699-20704, 2017.

MACBEAN, C. **The Pesticide Manual**. 15 ed., Reino Unido: British Crop Protection Council, 2010.

- MARCATO, A. C. de C. **Investigação da toxicidade e da capacidade de recuperação do herbicida 2,4-D comercial (2,4-diclorofenoxiacético) empregando brânquias de tilápias, *Oreochromis niloticus*, como biomarcador.** 2014. 76 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2014.
- MATTOS, M.L.; PERALBA, T.; DIAS, M. C. R; PRATA, S. L. P. F.; CAMARGO, L. Monitoramento ambiental do glyphosate e do seu metabólito (ácido aminometilfosfônico) na água de lavoura de arroz irrigado. **Pesticidas: Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, p. 145-154, 2002.
- MELO, K. G. **Determinação de glifosato em amostras de urina humana pela derivatização com cloroformato de 9-fluorenilmetilo por cromatografia líquida com detecção de fluorescência.** 2018. 89 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Farmacologia, Departamento de Farmacologia, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas, Campinas, 2018.
- MIJARES, A.; RODRIGUES, M. T. ; BALDO, D. *Physalaemus cuvieri*. **The IUCN Red List of Threatened Species**, 2010. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-2.RLTS.T57250A11609155.en>>. Acesso em 06 nov. 2018.
- MOUTINHO, M. F.; SCHIESARI, L. C. **Ecotoxicologia comparativa dos herbicidas da cana-de-açúcar para larvas de anfíbios.** 2013. 116 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ecologia de Ambientes Aquáticos e Terrestres, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.
- NOVO, A. F. M. **Gestão ambiental associada ao uso de bioindicadores ambientais.** 2012. 48 f. Monografia (Especialização) - Curso de Gestão Ambiental, Universidade Candido Mendes Pós Graduação "Latu Sensu" Avm Faculdade Integrada, Rio de Janeiro, 2012.
- PACHECO, M; SANTOS, M. A. Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla Anguilla L*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 53, p. 331-347, 2002.
- 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>, Acesso em 12 mar. 2019.
- PELTZER, P. M.; JUNGES, C. M.; ATTADEMO, A. M.; BASSÓ, A.; GRENÓN, P.; LAJMANOVICH, R. C. Cholinesterase activities and behavioral changes in *Hypsiboas pulchellus* (Anura: Hylidae) tadpoles exposed to glufosinate ammonium herbicide. **Ecotoxicology**, v. 22, p. 1165-1173, 2013.
- PÉREZ-IGLESIAS, J. M.; SOLONESKI, S.; NIKOLOFF, N.; NATALE, G. S.; LARRAMENDY, M. L. Toxic and genotoxic effects of the imazethapyr-based herbicide formulation Pivot H® on montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 119, p. 15-24, 2015.

PERUZZO, P. J.; PORTA, A. A.; RONCO, A. E. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. **Environmental Pollution**, v. 156, p. 61-66, 2008.

PINHEIRO, A.; SILVA, M. R.; KRAISCH, R. Presença de pesticidas em águas superficiais e subterrâneas na bacia do Itajaí, SC. **REGA**, v. 7, n.2, p. 17-26, 2010.

RODRIGUES, M. V. N.; SERRA, G. E. Deteminação de resíduos de 2,4-D em amostras vegetais. **Pesticidas Relatório Técnico Científico**, Curitiba, v. 6, p. 99-104, 1996.

RODRIGUES, B. N., ALMEIDA, F. L. S. Guia de Herbicidas. Grafmark, Londrina p. 592. 2005.

RODRIGUES, N. R. **Agrotóxicos: Análises de Resíduos e Monitoramento**. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

RUTKOSKI, C. F. *et al.* Lethal and sublethal effects of the atrazine in the early stages of development of *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.74, p. 587-593, 2018.

SAATH, K. C. O.; FACHINELLO, A. L. Crescimento da demanda mundial de alimentos e restrições do fator terra no Brasil. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 56, n. 2, p. 195-212, 2018.

SANCHEZ, J. A. A. **Efeitos comparativos de herbicidas à base de glifosato sobre parâmetros oxidativos e qualidade espermática no peixe estuarino *Jenynsia multidentata***. 2015. 60 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais, Universidade Federal do Rio Grande, Instituto de Ciências Biológicas, Rio Grande, 2015.

SANTOS, J. C. **O Uso do Agrotóxico: O Caso do Cultivo de Abacaxi no Município de Sapé PB**. 2013. 57 f. Monografia (Especialização) - Curso de Bacharelado e Licenciatura em Geografia, Geociências, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.

SIMONATO, J. D.; GUEDES, C. L. B.; MARTINEZ, C. B. R. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.69, p. 112 - 120, 2008.

SOBJAK, T. M.; ROMÃO, S.; NASCIMENTO, C. Z. do; SANTOS, A. F. P. dos; VOGEL, L.; GUIMARÃES, A. T. B. Assessment of the oxidative and neurotoxic effects of glyphosate pesticide on the larvae of *Rhamdia quelen* fish. **Chemosphere**, v. 182, p.267-275, 2017.

SOUZA, T.A.; MATTA, M.H.R.; MONTAGNER, E.; ABREU, A.B.G. Study of recovery and stability of derivatized glyphosate and AMPA in soil using national resins. **Química Nova**, v. 29, n.6, p. 1372-1376, 2006.

SPADOTTO, C. A.; GOMES, M. A. F; LUCHINI, L. C.; ANDRÉA, M. M. de. Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações. In: **Embrapa Meio Ambiente**, São Paulo, 2004.

STEHR, C. M.; MYERS, M. S.; JOHNSON, L. L.; SPENCER, S.; STEIN, J. E. Toxicopathic liver lesions in English sole and chemical contaminant exposure in Vancouver Harbour, Canada. **Marine Environmental Research**, v. 57, p. 55-74, 2004.

TAKANO, H. K.; JR, R. S. de O.; CONSTATIN, J.; BIFFE, D. F.; FRANCHINI, L. H. M.; BRAZ, G. B. P.; RIOS, F. A.; GHENO, E. A.; GEMELLI, A. Efeito da adição do 2,4-D ao glyphosate para o controle de espécies de plantas daninhas de difícil controle. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v.12, p.1-13, 2013.

USEPA. Environmental Protection Agency. **Framework for ecological risk assessment**. EPA/630/R-92/001. U.S.EPA. Risk Assessment Forum, p. 1-41, 1992.

USEPA. Environmental Protection Agency. **Guidelines for ecological risk assessment**. EPA/630/R-95/002F. U.S.EPA. Risk Assessment Forum. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency, 1998. 188 p.

VARGAS, L. **Avaliação da toxicidade de glifosato para duas espécies de anfíbios anuros brasileiras: *Physalaemus cuvieri* e *Physalaemus gracilis***. 2017. 47 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Ambiental, Universidade Federal da Fronteira Sul, Erechim, 2017.

VASCONCELOS, A. M. **Avaliação dos efeitos do agrotóxico Vertimec ® 18CE sobre girinos de *Lithobates catesbeianus* (Amphibia, Anura, Ranidae)**. 2014. 149 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências da Engenharia Ambiental, Escola de Engenharia de São Carlos (EESC), Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

VERMA, S. R.; RANI, S.; BANSAL, S. K.; DALELA, R. C. Effects of the pesticides thiothox, dichlorvos and carbofuran on the test fish *Mystus vittatus*. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 13, p. 229-234, 1980.

WAGNER, J. F.; JUNIOR, A. M. Parâmetros fisiológicos e nutricionais de cultivares de soja resistentes ao glifosato em comparação com cultivares isogênicas próximas. **Ciência Rural**, v. 44, p. 393-399, 2014.

WEIS, J. S.; SMITH, G.; ZHOU, T.; SANTIAGO-BASS, C.; WEIS, P. Effects of contaminants on behavior: biochemical mechanisms and ecological consequences. **BioScience**, v. 51, p. 209-217, 2011.

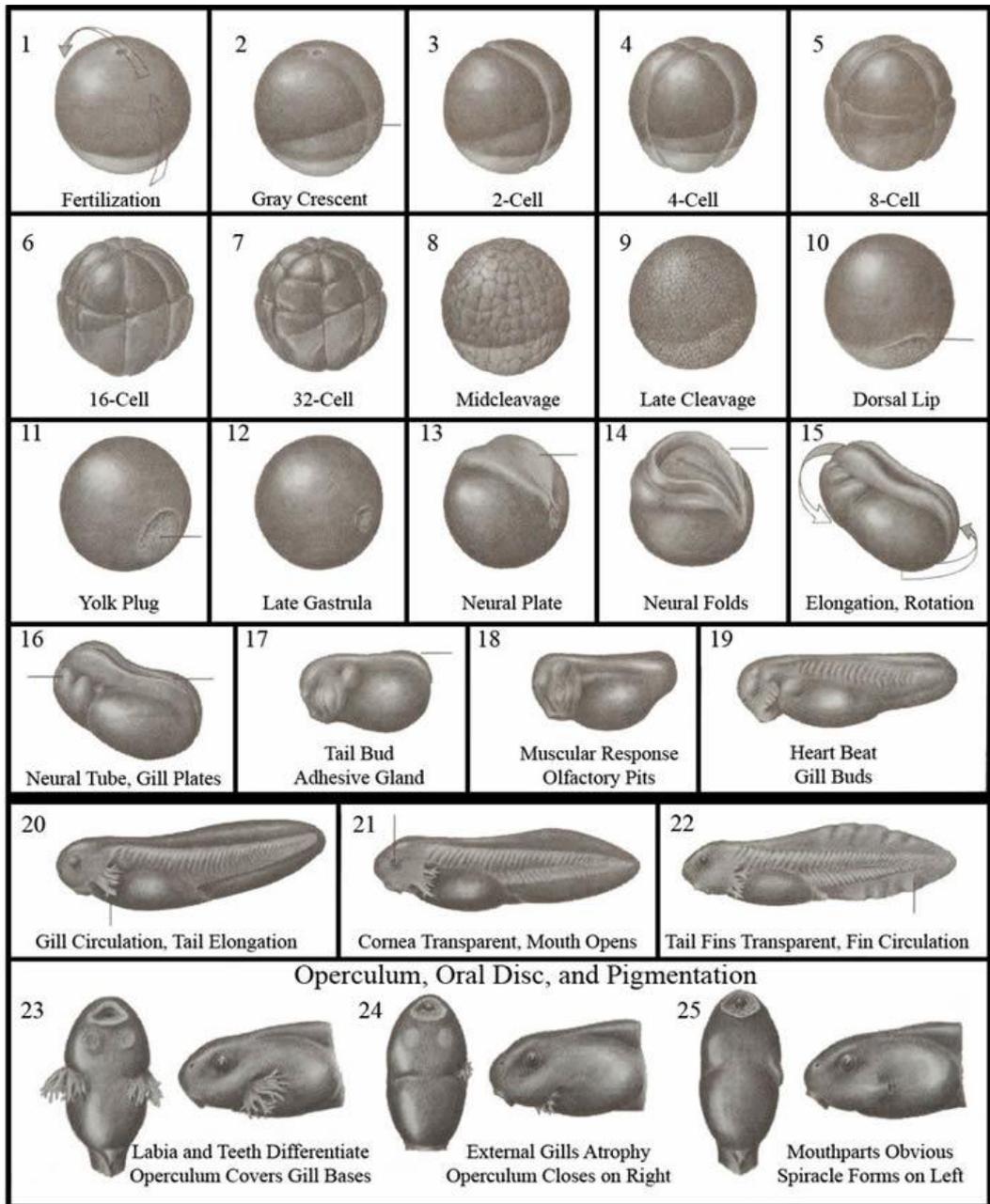
WILBUR, H. M.; SEMLITSCH, R. D. Ecological consequences of tail injury in *Rana* tadpoles. **Copeia**, p. 18-24, 1990.

WRUBLESWSKI, J.; JR, F. W. R.; GALON, L.; HARTMANN, P. A.; HARTMANN, M. T. Acute and chronic toxicity of pesticides on tadpoles of *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leptodactylidae). **Ecotoxicology**, v. 27, p. 360-368, 2018.

WU, J.; LU, J.; LU, H.; LIN, Y.; W. P. C. Occurrence and ecological risks from fipronil in aquatic environments located within residential landscapes. **Science of the Total Environment**, v. 518-519, p. 139-147, 2015.

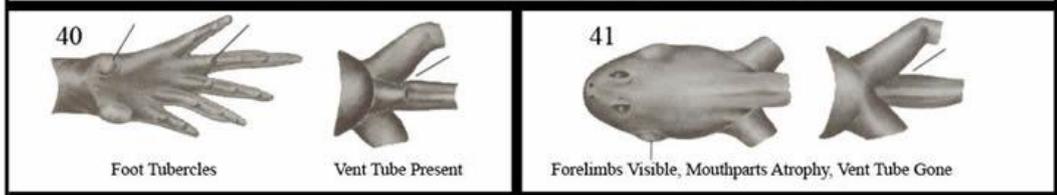
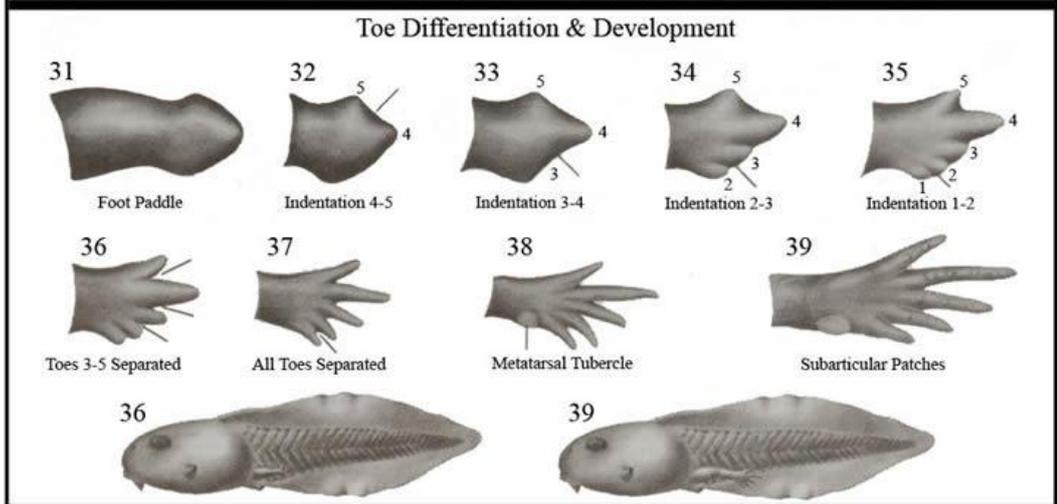
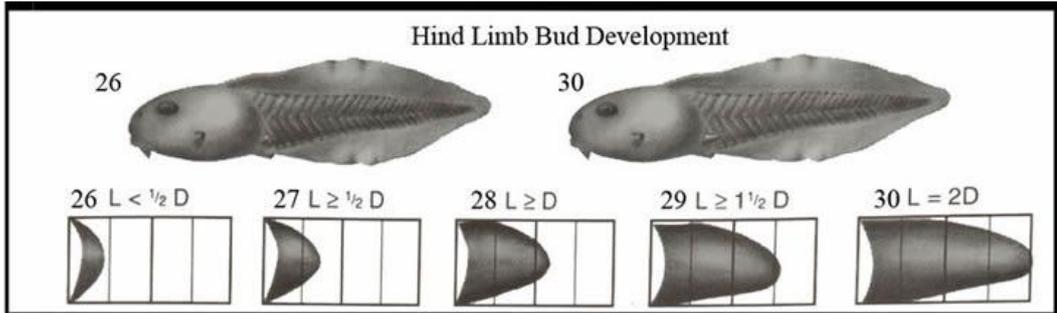
ANEXO A

EMBRYOS



HATCHLINGS

L
A
R
V
A
E



M
E
T
A
M
O
R
P
H
S

