



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

GILCINÉIA DOS SANTOS

**EFEITOS SUBLETAIS DA FORMULAÇÃO COMERCIAL DO HERBICIDA 2,4-D
EM *Physalaemus cuvieri* (ANURA: LEPTODACTYLIDAE)**

ERECHIM

2020

GILCINÉIA DOS SANTOS

**EFEITOS SUBLETAIS DA FORMULAÇÃO COMERCIAL DO HERBICIDA 2,4-D
EM *Physalaemus cuvieri* (ANURA: LEPTODACTYLIDAE)**

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

Orientadora: Prof. Dr (a). Marilia Teresinha Hartmann.

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Afonso Hartmann.

ERECHIM

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
Rua General Osório, 413 D
CEP: 89802-210
Caixa Postal 181
Bairro Jardim Itália
Chapecó - SC
Brasil

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Santos, Gilcinéia dos
EFEITOS SUBLETAIS DA FORMULAÇÃO COMERCIAL DO
HERBICIDA 2,4-D EM *Physalaemus cuvieri* (ANURA:
LEPTODACTYLIDAE) / Gilcinéia dos Santos. -- 2020.
66 f.:il.

Orientadora: Doutora Marília Teresinha Hartmann
Co-orientador: Doutor Paulo Afonso Hartmann
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da
Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia Ambiental, Erechim, RS, 2020.

1. Agrotóxico. 2 Anfíbios. 3 Atividade Natatória. 4
Micronúcleo. 5 Mortalidade. I. Hartmann, Marília
Teresinha, orient. II. Hartmann, Paulo Afonso,
co-orient. III. Universidade Federal da Fronteira Sul.
IV. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**EFEITOS SUBLETAIS DA FORMULAÇÃO COMERCIAL DO HERBICIDA 2,4-D
EM *Physalaemus cuvieri* (ANURA: LEPTODACTYLIDAE)**

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

Esta dissertação de mestrado foi defendida e aprovada pela banca em:

27/03/2020

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Marília Teresinha Hartmann

Universidade Federal da Fronteira Sul – *Campus* Erechim - PPGCTA

Prof. Dr. Paulo Afonso Hartmann

Universidade Federal da Fronteira Sul – *Campus* Erechim – PPGCTA

Profa. Dra. Elaine Lucas Gonsales

Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

Profa. Dra. Cristiane Funghetto Fuzinatto

Universidade Federal da Fronteira Sul – *Campus* Erechim - UFFS

Profa. Dra. Caroline Müller

Universidade Federal da Fronteira Sul – *Campus* Erechim – PPGCTA

AGRADECIMENTO

A Deus e a Virgem Maria, por tantas coisas boas que proporcionaram em minha vida, por me guiar, me iluminar e ter colocado tantas pessoas maravilhosas em meu caminho, me dando tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

A minha orientadora Professora Marília T. Hartmann, pela oportunidade, apoio, confiança depositada para realizar os trabalhos propostos, pela compreensão em momentos de dificuldades, pelo exemplo, por me mostrar um novo caminho da pesquisa e principalmente pela inspiração de ser uma excelente pesquisadora. Ao meu coorientador, Professor Paulo A. Hartmann pelo incentivo durante o mestrado.

A minha Mãe Diva, pelo apoio e amor incondicional em todos os momentos, por ter acreditado nos meus sonhos sempre demonstrando confiança de que eu era capaz, por ter me ajudado nas mais diversas situações, sou muito grata por ter você como mãe e jamais conseguiria chegar até aqui sem você. Você é meu exemplo de vida, meu alicerce de sustentação. Obrigada por tanto, te amo.

Ao meu Pai Nivaldo e a minhas irmãs Rudinara e Mariele, por todo o carinho, paciência e amor, a confiança que vocês depositaram sempre foi um conforto, sem vocês eu jamais conseguiria. Aos melhores sobrinhos que eu poderia ter Kanan, Ian e Mariana, por entenderem que mesmo estando longe meu amor por vocês é incondicional.

As minhas avós Maria Eloy (*in memoriam*) e Ana por serem meu porto seguro, agradeço todos os dias por ter feito parte da vida de vocês e por ter aprendido tanto, vocês fazem falta. A tia Dilma e o tio João por sempre me esperar quando eu ia pra Frederico Westphalen com minhas comidas preferidas e por sempre me incentivar para que tudo desse certo.

Aos meus dogs Maria Isabel (Bebel) e Roberval (Rober), pela companhia, pelo amor que sabem dar como ninguém, por me fazerem levantar da cama e continuar todos os dias com a inocência mais linda, por serem simplesmente os seres mais especiais na minha vida, eu me tornei uma pessoa melhor depois de vocês.

As minhas amigas Daniela Sponchiado e Manoela Getelina que mesmo estando longe sempre conseguiram me deixar mais tranquila quando o desespero batia, me faz bem saber que posso contar com vocês para o que precisar.

Aos melhores amigos que o mestrado me deu, Camila Dalla Rosa e Maicon Ody, por cada momento de estresse, pelos momentos de diversão, por cada conversa acolhedora, por cada ajuda quando precisei, por me acolherem, por serem uma parte da minha família aqui em Erechim, por nunca cansarem de me apoiar e de ouvirem eu dizer que não aguentava mais. Muito obrigada.

Aos meus colegas de Laboratório da UFFS, Camila F. Rutkoski, Alexandre Folador e Vrandrieli J. Skovronski pelo auxílio e companhia durante as atividades de campo e de análises laboratoriais, especialmente a Camila por todo o apoio, ensinamentos, pelas incontáveis vezes que pedi ajuda e em todas fui atendida com paciência e competência, você foi fundamental para a realização desse trabalho e serei eternamente grata.

A todos os meus colegas de mestrado, pelas risadas e trocas de ideias, em especial a Dani, a Andreia e a Jessica por todos os momentos de angústia e descontração nessa jornada.

A toda equipe da Escola Dr Sidney Guerra pelo apoio e compreensão nestes dois anos, especialmente a Adriana G. Perdomini, muito obrigada por compreender certas situações e mesmo sem ter um apreço muito grande pelos “meus sapinhos” me apoiar incondicionalmente para a realização dessa dissertação.

A todas as pessoas que tive o prazer de conhecer em Erechim e influenciaram positivamente na minha trajetória de vida até o momento, por muitas vezes sem nem mesmo saber foram meus momentos leves nesse mestrado.

A todos os professores do PPGCTA pelos ensinamentos nestes dois anos.

Ao Programa de Pós-Graduação Ciência e Tecnologia Ambiental (UFFS) pela oportunidade de realizar esta Pós-Graduação.

Deixo meu agradecimento especial a todos as professoras membro da minha banca de dissertação pela disponibilidade e participação para enriquecer o trabalho.

OBRIGADA!

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** - *Physalaemus cuvieri* adulto (A). Local da coleta (B). Desova em corpos d' água lânticos (C). Coleta manual das desovas (D).....33
- FIGURA 2** - Criação de girinos de *Physalaemus cuvieri*, Laboratório de Ecologia e Conservação, UFFS.....34
- FIGURA 3** - Teste de toxicidade crônica de *Physalaemus cuvieri* com duração de 168 horas a diferentes concentrações da formulação comercial de 2,4-D..35
- FIGURA 4** - Preparação das lâminas de *Physalaemus cuvieri* para o teste de micronúcleo com o Kit de coloração Panótico Rápido..37
- FIGURA 5** - Mortalidade cumulativa (%) de girinos de *Physalaemus cuvieri* expostos a diferentes concentrações da formulação comercial de 2,4-D durante ensaio crônico..41
- FIGURA 6** - Girinos *Physalaemus cuvieri* (%) com malformação (A) na boca (ausência de queratodontes), (B) no intestino, (C) na cauda e (D) como presença de edemas, após 168 h de exposição à diferentes concentrações da formulação comercial de 2,4-D. Letras diferentes referem-se a diferenças significativas entre os grupos pelo teste de Tukey.....42
- FIGURA 7** - Boca (A-B) e intestino (C-D) de girinos de *Physalaemus cuvieri* expostos a diferentes concentrações da formulação comercial de 2,4-D. (A) boca e (C) intestino de girino do grupo controle, (B) boca e (D) intestino de girino exposto a concentração de 100 µg a.e.L⁻¹.....43
- FIGURA 8** - Células (%) e girinos (%) de *Physalaemus cuvieri* expostos à diferentes concentrações da formulação comercial de 2,4-D por 168 horas, onde (A) Micronúcleo e (B-I) alterações nucleares de eritrócitos. (B) Núcleo Lobado, (C) Núcleo Entalhado, (D) Núcleo com Bolha, (E) Microcitose, (F) Núcleo com Apoptose, (G) Núcleo Binucleada, (H) Núcleo com Caríolise e (I) Núcleo Vacuolizado. Letras diferentes referem-se a diferenças significativas entre os grupos.45
- FIGURA 9** - Micronúcleo e alterações nucleares de eritrócitos analisadas nos girinos de *Physalaemus cuvieri* expostos à diferentes concentrações da formulação comercial de 2,4-D por 168 horas, onde (A) Micronúcleo, (B) Núcleo Lobado, (C) Núcleo Entalhado, (D) Núcleo

com Bolha, (E) Microcitose, (F) Núcleo com Apoptose, (G) Núcleo Binucleada, (H) Núcleo com Cariólise e (I) Núcleo Vacuolizado.46

FIGURA 10 - Frequência da ocorrência de alterações nucleares de eritrócitos de girinos de *Physalaemus cuvieri* expostos ao herbicida 2,4-D, nas concentrações de 4,0, 30,0, 52,5, 75,0 e 100,0 µg a.e. L⁻¹, comparados ao controle (‰).....47

FIGURA 11 - Frequência de micronúcleos e Alterações Nucleares de Eritrócitos de girinos de *Physalaemus cuvieri* expostos à diferentes concentrações da formulação comercial de 2,4-D, após 168 horas.48

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| TABELA 1 - Concentrações de 2,4-D utilizadas no ensaio de toxicidade crônica em girinos de <i>Physalaemus cuvieri</i> . | 35 |
| TABELA 2 - Número de girinos de <i>Physalaemus cuvieri</i> expostos a formulação comercial de 2,4-D durante 7 dias.. | 40 |
| TABELA 3 - Girinos de <i>Physalaemus cuvieri</i> com alterações na atividade natatória durante o tempo de exposição à diferentes concentrações da formulação comercial de 2,4-D após 168 horas. | 41 |
| TABELA 4 - Frequência de micronúcleos identificado sem eritrócitos de <i>Physalaemus cuvieri</i> expostos a diferentes concentrações da formulação comercial de 2,4-D após 168 horas. | 43 |
| TABELA 5 - Avaliação de risco ecológico para girinos de <i>Physalaemus cuvieri</i> expostos a diferentes concentrações da formulação comercial de 2,4-D ($\mu\text{g a.e. L}^{-1}$), considerando a Concentração de Efeito Não Observado (CENO), Concentração de Efeito Observado (CEO), Máxima Concentração Aceitável do Toxicante (MCTA), Quociente de Risco Crônico – Conservador (CHQ1) e Quociente de Risco Crônico – Alerta (CHQ2). | 49 |

LISTA DE ABREVIATURAS

ANES - Alterações Nucleares Eritrocíticas

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ARE - Avaliação de Risco Ecológico

CEA - Concentração Estimada no Ambiente

CENO - Concentração de Efeito Não Observado

CEO - Concentração de Efeito Observado

CHQ - Quociente de Risco Crônico

HQ (Hazard Quotient) - Quociente de Risco

LC (Least Concern) - Menos Preocupante

LOC (*Level of Concern*) - Níveis de Preocupação

MCAT - Máxima Concentração Aceitável do Toxicante

MN – Micronúcleo

a.e. – ácido equivalente

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO GERAL | 12 |
| REFERÊNCIAS | 17 |
| 2 INTRODUÇÃO | 29 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS | 32 |
| 3.1 AGROTÓXICO | 32 |
| 3.2 ORGANISMO-TESTE E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL | 32 |
| 3.2.1 Ensaio de Toxicidade Crônica | 34 |
| 3.2.2 Teste do Micronúcleo e Anormalidade Nucleares de Eritrócitos | 36 |
| 3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 38 |
| 3.4 AVALIAÇÃO DE RISCO ECOLÓGICO | 38 |
| 4 RESULTADOS | 40 |
| 4.1 ENSAIO CRÔNICO | 40 |
| 4.2 MICRONÚCLEO E ALTERAÇÕES NUCLEARES DE ERITRÓCITOS | 43 |
| 4.3 ANÁLISE DE RISCO ECOLÓGICO | 48 |
| 5 DISCUSSÃO | 50 |
| 6 CONCLUSÃO | 53 |
| REFERÊNCIAS | 55 |
| MATERIAL SUPLEMENTAR | 64 |

1 INTRODUÇÃO GERAL

A extensa área de plantio no Brasil proporcionou que o país se tornasse um dos maiores produtores agrícolas do mundo e o segundo maior exportador desses produtos (IBGE, 2015; PIGNATI *et al.*, 2017). Com esse crescimento e o uso em larga escala na agricultura comercial, o país está no ranking de maior consumidor de agrotóxicos do planeta (GUIDA *et al.*, 2018; ARAUJO *et al.*, 2019). Segundo Oliveira e Silva (2020), de janeiro a outubro de 2019, 382 agrotóxicos foram liberados no Brasil, tratando-se do maior ritmo de liberação da última década para o país. Destes, 42 tem restrições ou são banidos em diversos países europeus, indicando pouco poder restritivo na atual legislação brasileira quanto ao uso de agrotóxicos e quanto aos limites permitidos em água potável (ROCHA, 2020).

O uso inadequado de agrotóxicos vem causando impacto no meio ambiente e declínios populacionais de espécies não-alvo, como pássaros, organismos aquáticos e outros animais (MAHMOOD *et al.*, 2016). As aplicações não seletivas de agrotóxicos em atividades agropastoris estão entre as principais causas da contaminação e degradação de habitats, afetando espécies ocorrentes nas áreas de plantio e no entorno, contribuindo para o declínio de espécies nativas (SILVANO, SEGALLA, 2005, SPARLING *et al.*, 2010; ALLENTOFT; O'BRIEN, 2010, SCHIESARI, GRILLISTCH, 2011, SCHIESARI *et al.*, 2013, HOSKINS, BOONE, 2017).

Por diferentes meios como lixiviação ou pulverização, além dos organismos-alvo, esses agrotóxicos também afetam o ambiente no entorno, incluindo o ar, o solo e as águas subterrâneas e superficiais contaminando todo o ecossistema (NSIBANDE; FORBES, 2016). Nos últimos anos, a soja, o milho e a cana-de-açúcar representavam as culturas com maior consumo de agrotóxicos (PIGNATI *et al.*, 2017). Associadas ao algodão, as quatro culturas chegaram a utilizar 82% de todo o agrotóxico utilizado no Brasil, utilizadas como matéria-prima de produtos industrializados como a produção de energia (álcool), roupas (algodão) ou ainda alimentação de animais (soja e milho) SINDIVEG (2018).

O herbicida a base de ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) é o segundo herbicida ingrediente ativo mais vendido no Brasil e já foi detectado em águas superficiais e subterrâneas. No estado do Rio Grande do Sul a Secretaria da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural, no início de dezembro de 2019, proibiu o uso das formulações que

continham o princípio ativo 2,4-D até dia 31 de dezembro do mesmo ano, devido à denúncia de agricultores de contaminação de pomares por esse herbicida (Instrução Normativa SEAPDR N° 15 de 04/12/2019). No entanto, essa proibição durou apenas um mês.

Os mananciais hídricos no entorno de áreas agrícolas são altamente expostos/propícios à contaminação pelos agrotóxicos, devido ao escoamento dos produtos utilizados de forma inadequada ou excessiva nas lavouras (CERIACO, 2010). Os herbicidas, inseticidas e fungicidas utilizados na agricultura podem ser lixiviados durante os períodos de chuva e atingir organismos aquáticos e afetar a saúde destes, mesmo em concentrações consideradas baixas (MNIF *et al.*, 2011). Em baixas concentrações, os pesticidas podem não ocasionar a morte dos indivíduos, mas são descritos por acarretar uma série de consequências por longas exposições como alterações na imunidade, na habilidade osmorregulatória, na função reprodutiva no metabolismo energético e na morfologia dos indivíduos (MNIF *et al.*, 2011; RUTKOSKI *et al.*, 2018; HEREK, *et al.*, 2020). Do ponto de vista ecológico, os agrotóxicos são importantes agentes estressores a diversos organismos, principalmente aquáticos, como os anfíbios (NWANI *et al.*, 2010). Estes produtos podem interferir na estrutura das comunidades, acarretando letalidade e/ou mudanças metabólicas e bioquímicas nos tecidos de animais (NWANI *et al.*, 2010; RUTKOSKI *et al.*, 2020).

Com mais de 1.000 espécies de anfíbios já descritas, o Brasil possui a maior diversidade mundial e a cada ano novas espécies são descobertas (SEGALLA *et al.*, 2016; WALKER *et al.*, 2018; CARVALHO *et al.*, 2019). A Mata Atlântica apresenta a maior riqueza de anfíbios anuros entre os biomas brasileiros, com mais de 500 espécies conhecidas, sendo que destas, aproximadamente 60% são endêmicas deste bioma (HADDAD *et al.*, 2013; VILLALOBOS *et al.*, 2013; ROSSA-FERES *et al.*, 2018).

Dentre os vertebrados, os anfíbios são o grupo taxonômico mais ameaçado, com maior número de registros sobre o declínio e extinções populacionais nas florestas tropicais (RIPPLE *et al.*, 2019; CONVERSE; GRANT, 2019; IUCN, 2020.). O declínio desses animais deve-se a diversos fatores, como a o extenso uso de agrotóxicos e fertilizantes químicos, além da fragmentação e destruição de habitats, introdução de espécies exóticas, mudanças climáticas, maior exposição à radiação ultravioleta e doenças fúngicas (HAYES *et al.*, 2010; BLAUSTEIN *et al.*, 2011; ADAMS *et al.*, 2013; GONÇALVES *et al.*, 2015; DE OLIVEIRA *et al.*, 2016; LIPINSKI *et al.*, 2016; BERGER *et al.*, 2016). Segundo a IUCN (2020), no século passado, 32 espécies de anfíbios foram extintas e, atualmente, em torno de 41% das espécies estão ameaçadas.

Em função da fragilidade dos anfíbios aos agrotóxicos, a contaminação de recursos hídricos interfere na dinâmica das populações desses organismos (POLO-CAVIA *et al.*, 2016). De acordo com, Lanctôt *et al.*, (2014) a exposição a produtos químicos durante as fases iniciais da vida pode atrasar e/ou inibir a metamorfose de larvas de anfíbios o que pode impactar negativamente a reprodução desses animais. Outros problemas acarretados pelo contato dos anfíbios com agrotóxicos são as alterações no crescimento, no desenvolvimento, na reprodução e no comportamento nos estágios iniciais de vida dos girinos (MACAGNAN *et al.*, 2017; RUTKOSKI *et al.*, 2018; WRUBLESWSKI *et al.*, 2018). Além disso, a exposição aos agrotóxicos pode ter consequências indiretas na sobrevivência dos anuros ao atingir outros níveis ecológicos, como por exemplo, interferindo na base alimentar (fitoplâncton e zooplâncton), reduzindo a oferta de alimentos e a sobrevivência dos girinos (RELYEA; DIECKS, 2008; RELYEA; EDWARDS, 2010; AMÉRICO *et al.*, 2015).

Os anfíbios são considerados ótimos bioindicadores ambientais e são utilizados como modelos de estudos em ensaios ecotoxicológicos por integrarem ecossistemas aquáticos e terrestres, além de ser um dos grupos de vertebrados mais sensíveis às mudanças ambientais e a contaminantes (BLAUSTEIN; KIESECKER 2002; FRANÇA *et al.*, 2017, GONÇALVES *et al.*, 2015, 2017; 2019).

Ensaio de toxicidade são métodos importantes na detecção e avaliação dos efeitos prejudiciais de agrotóxicos em espécies não-alvo (SILVA *et al.*, 2013). A utilização de organismos-teste permite a identificação de compostos que afetam os sistemas biológicos e a avaliação do potencial de risco ambiental de determinados contaminantes (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006; COSTA *et al.*, 2008). Os ensaios consistem na exposição de organismos não-alvo, por um determinado período de tempo, a diferentes concentrações de substâncias/compostos químicos (GHERARDI-GOLDSTEIN *et al.*, 1990; MAGALHÃES; FILHO, 2008). Os testes ecotoxicológicos compreendem ensaios agudos e crônicos. Os ensaios agudos avaliam a capacidade de uma substância provocar a morte ou a imobilidade de um organismo-teste durante um curto período de exposição (HÄDER; RICHTER, 2009). Os ensaios de ecotoxicidade crônica são realizados para medir os efeitos de substâncias químicas por um período que pode abranger parte ou todo o ciclo de vida do organismo-teste (MAGALHÃES; FILHO, 2008). Os testes crônicos permitem avaliar os possíveis efeitos tóxicos de substâncias químicas sob condições de exposições prolongadas a concentrações sub-letais, ou seja, concentrações que permitem a sobrevivência dos organismos, mas que afetam suas funções biológicas, tais como reprodução, desenvolvimento de ovos, crescimento

e maturação, fisiologia e histologia, além de alterações comportamentais (RAND; PETROCELLI, 1985; RODRIGUES, 2007; MAGALHÃES; FILHO, 2008), dados estes utilizados para o cálculo da Avaliação de Risco Ecológico (ARE) (USEPA, 1992).

Avaliação de Risco Ecológico (ARE) é um processo que compreende a probabilidade de ocorrer ou de já estarem ocorrendo efeitos ecológicos adversos no ambiente devido a exposição a um ou mais agentes estressores (USEPA, 1992). A ARE tem por objetivo avaliar agentes estressores que podem causar impacto ambiental em diferentes níveis de organização biológica, e, assim, verificar efeitos ecológicos em ecossistemas aquáticos causados pelo uso de agrotóxicos. É uma importante ferramenta no processo de registro de agrotóxicos em diversos países (USEPA, 1998; CAMPOS *et al.*, 2016) por ser considerada um instrumento robusto e que traz resultados satisfatórios sobre a qualidade ambiental de um ecossistema, importante para a gestão ambiental (CHEN *et al.* 2013).

Vários estudos ecotoxicológicos relacionados aos danos na saúde humana e ambiental causados pelo uso de agrotóxicos, também utilizam o teste de micronúcleo (MN), o qual avalia efeitos mutagênicos (MORON *et al.*, 2006; KUNST *et al.*, 2014; CARBAJAL-LÓPEZ *et al.*, 2016; BUENO *et al.*, 2017). Considerada uma técnica confiável, rápida e com baixo custo, o teste do micronúcleo avalia a taxa de micronúcleo e aberrações morfológicas. As estruturas caracterizadas como micronúcleos ocorrem durante a anáfase, onde, quando alteradas, as cromátides e fragmentos cromossômicos acêntricos não são transportados pelas fibras do fuso para os polos opostos no processo de divisão celular, não sendo incluídas no núcleo das células filhas (OBIAKOR *et al.*, 2012). Desta forma, o teste é utilizado para investigar agentes genotóxicos em organismos expostos a águas contaminadas com substâncias químicas poluentes (ARSLAN *et al.*, 2015).

O mesmo teste utilizado para avaliação do micronúcleo permite identificar alterações nucleares eritrocíticas (ANEs), que são anormalidades nucleares usadas como ferramentas para a avaliação da genotoxicidade em células. As ANEs são marcadores celulares que podem refletir os efeitos iniciais de agentes genotóxicos visualizados pelas alterações morfológicas das células nucleares (CAVAS, 2011). Alguns estudos descreveram a presença de ANEs (além do micronúcleo) em diversos organismos testes bioindicadores, como em anuros expostos a herbicidas (LAJMANOVICH *et al.*, 2018) e metais pesados (MONTEIRO *et al.*, 2018) demonstrando que essa técnica auxilia no monitoramento da poluição ambiental (BELIËN *et al.*, 1995; GONÇALVES *et al.*, 2014).

Além de induzir alterações genéticas, os contaminantes comprometem a fisiologia, a sobrevivência e provocam distúrbios nas fases do ciclo celular de organismos aquáticos (DARZYNKIEWICZ *et al.*, 2017; CORDUK *et al.*, 2018). Diversos estudos apontam que os anfíbios são organismos sensíveis sendo bons indicadores para detecção de agentes genotóxicos. Sendo assim testes de MN podem ser considerados uma ferramenta apropriada para detectar efeitos da exposição a xenobióticos em organismos, incluindo anfíbios (De LAPUENTE *et al.* 2015; PÉREZ-IGLESIAS *et al.*, 2015).

Neste contexto, o presente estudo teve por objetivo avaliar os efeitos do herbicida ácido 2,4-diclorofenóxiacético (2,4-D) em relação a mortalidade, atividade natatória, malformações e potencial genotóxico organismos não-alvo de *Physalaemus cuvieri*.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, M. J., MILLER, D. A. W., MUTHS, E., CORN, P. S., GRANT, E. H. C., BAILEY, L. L., FELLERS, G. M.; FISHER, R. N.; SADINSKI, W. J.; WADDLE, H.; WALLS, S. C. 2013. Trends in amphibian occupancy in the United States. **PLoS ONE**. 8(5), e64347. doi:10.1371/journal.pone.0064347
- ALLENTOFT, M., O'BRIEN, J. 2010. Global amphibian declines, loss of genetic diversity and fitness: A Review. **Diversity**, 2(1), 47–71. doi:10.3390/d2010047
- ALROY, J. 2015. Current extinction rates of reptiles and amphibians. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 112(42), 13003–13008. doi:10.1073/pnas.1508681112
- AMÉRICO, J H. P., MANOEL, L. O., TORRES, N. H., FERREIRA, L. F. R. 2015. O uso de agrotóxicos e os impactos nos ecossistemas aquáticos. **Revista Científica ANAP Brasil**, 8 (13), 101-115. doi: 10.17271/1984324081320151149
- ARAÚJO, M. L. S. DE, SANO, E. E., BOLFE, É. L., SANTOS, J. R. N., DOS SANTOS, J. S., SILVA, F. B. 2019. Spatiotemporal dynamics of soybean crop in the Matopiba region, Brazil (1990–2015). **Land Use Policy**, 80, 57–67. doi:10.1016/j.landusepol.2018.09.040
- ARSLAN, Ö.C., BOYACIOĞLU, M., PARLAK, H., KATALAY, S., KARAASLAN, M. A. 2015. Assessment of micronuclei induction in peripheral blood and gill cells of some fish species from Aliğa Bay Turkey. **Marine Pollution Bulletin**, 94(1-2), 48–54. doi:10.1016/j.marpolbul.2015.03.018
- BELIËN, J. A. M., COPPER, M. P., BRAAKHUIS, B. J. M., SNOW, G. B., BAAK, J. P. A. 1995. Standardization of counting micronuclei: definition of a protocol to measure genotoxic damage in human exfoliated cells. **Carcinogenesis**, 16(10), 2395–2400. doi:10.1093/carcin/16.10.2395
- BERGER, L., ROBERTS, A. A., VOYLES, J., LONGCORE, J. E., MURRAY, K. A., SKERRATT, L. F. 2016. History and recent progress on chytridiomycosis in amphibians. **Fungal Ecology**, 19, 89–99. doi:10.1016/j.funeco.2015.09.007
- BLAUSTEIN, A. R., HAN, B. A., RELYEA, R. A., JOHNSON, P. T. J., BUCK, J. C., GERVASI, S. S., KATS, L. B. 2011. The complexity of amphibian population declines: understanding the role of cofactors in driving amphibian losses. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1223(1), 108–119. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05909.x

BLAUSTEIN, A. R., KIESECKER, J. M. 2002. Complexity in conservation: lessons from the global decline of amphibian populations. **Ecology Letters**, 5(4), 597–608. doi:10.1046/j.1461-0248.2002.00352.x

BUENO, A.P.M., VASCONCELOS, M.G., FRANCISCO, C.M., PAVANIN, L.A. 2017. Teste de micronúcleos em peixes e parâmetros físico-químicos da água da represa Cocais, Minas Gerais. **Acta Brasiliensis**. 1(3), 32-36. <https://doi.org/10.22571/Actabra13201755>

CAMPOS, B. G., CRUZ, A. C. F., BURUAEM, L. M., RODRIGUES, A. P. C., MACHADO, W. T. V., ABESSA, D. M. S. 2016. Using a tiered approach based on ecotoxicological techniques to assess the ecological risks of contamination in a subtropical estuarine protected area. **Science of The Total Environment**, 544, 564–573. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.11.124

CARBAJAL-LÓPEZ, Y., GÓMEZ-ARROYO, S., VILLALOBOS-PIETRINI, R., CALDERÓN-SEGURA, M. E., MARTÍNEZ-ARROYO, A. 2016. Biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticide mixtures in Guerrero state, Mexico, with comet assay and micronucleus test. **Environmental Science and Pollution Research**, 23(3), 2513–2520. doi:10.1007/s11356-015-5474-7

CARVALHO, T. R.; GIARETTA, A. A.; ÂNGULO, A.; HADDAD, C. F. B.; PELOSO, P. L. V. 2019. A new Amazonian species of *Adenomera* (Anura: Leptodactylidae) from the Brazilian state of Pará: a tody-tyrant voice in a frog. **American Museum Novitates**, 3919, p. 1-21.

CAVAS, T. 2011. In vivo genotoxicity evaluation of atrazine and atrazine-based herbicide on fish *Carassius auratus* using the micronucleus test and the comet assay. **Food and Chemical Toxicology**, 49(6), 1431–1435. doi:10.1016/j.fct.2011.03.038

CERÍACO, L. M. 2012. Human attitudes towards herpetofauna: The influence of folklore and negative values on the conservation of amphibians and reptiles in Portugal. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, 8(1), 8. doi:10.1186/1746-4269-8-8

CHEN, S., CHEN, B., FATH, B. D. 2013. Ecological risk assessment on the system scale: A review of state-of-the-art models and future perspectives. **Ecological Modelling**, 250, 25–33. doi:10.1016/j.ecolmodel.2012.10.015

CONVERSE, S. J., GRANT, E. H. C. 2019. A three-pipe problem: dealing with complexity to halt amphibian declines. **Biological Conservation**, 236, 107–114. doi:10.1016/j.biocon.2019.05.024

CORDUK, N., HACIOGLU-DOGRU, N., GUL, C., TOSUNOGLU, M. 2018. Monitoring of micronuclei and nuclear abnormalities in *Pelophylax ridibundus* erythrocytes from the biga stream (Canakkale, Turkey). **Fresen Environ, Bull.** 27 (1), 147–153.

COSTA, C. R., OLIVI, P., BOTTA, C. M. R., ESPINDOLA, E. L. G. 2008. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, 31(7), 1820–1830. doi:10.1590/s0100-40422008000700038

DARZYNKIEWICZ, Z., HUANG, X., ZHAO, H. 2017. Analysis of cellular DNA content by flow cytometry. **Current Protocols in Immunology**, 5.7.1–5.7.20. doi:10.1002/cpim.36

DE LAPUENTE, J., LOURENÇO, J., MENDO, S.A., BORRÀS, M., MARTINS, M.G., COSTA, P.M., PACHECO, M. 2015. The comet assay and its applications in the field of ecotoxicology: a mature tool that continues to expand its perspectives. **Frontiers in Genetic**, 2015. 6, 180. doi:10.3389/fgene.2015.00180

DE OLIVEIRA, I. S., RODDER, D., TOLEDO, L. F. 2016. Potential worldwide impacts of sea level rise on coastal-lowland anurans. **North-Western Journal of Zoology**, 12 (1), 91-101.

FRANÇA, D. P. F., FREITAS, M. A. DE, RAMALHO, W. P., BERNARDE, P. S. 2017. Diversidade local e influência da sazonalidade sobre taxocenoses de anfíbios e répteis na Reserva Extrativista Chico Mendes, Acre, Brasil. **Iheringia. Série Zoologia**, 107. doi:10.1590/1678-4766e2017023

GHERARDI-GOLDSTEIN, E., BERTOLETTI, E., ZAGATTO, P.A., ARAÚJO, R.P.A., RAMOS, M.L.L.C. 1990. **Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos**. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, São Paulo.

GONÇALVES M.W., VIEIRA T.B., MACIEL N.M., CARVALHO W.F., LIMA L.S.F., GAMBALE P.G., NOMURA F., BASTOS R.P., SILVA D.M. 2014. Detecting genomic damages in the frog *Dendropsophus minutus*: preserved versus perturbed areas. **Environmental Science and Pollution Research**, 22(5), 3947–3954. doi:10.1007/s11356-014-3682-1

GONÇALVES, M. W., DE CAMPOS, C. B. M., GODOY, F. R., GAMBALE, P. G., NUNES, H. F., NOMURA, F., BASTOS R.P.; DA CRUZ A.D.; DE MELO E SILVA, D. 2019. Assessing genotoxicity and mutagenicity of three common amphibian species anhabiting agroecosystem Environment. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 77(3):409-420. doi:10.1007/s00244-019-00647-4

GONÇALVES, M. W., GAMBALE, P. G., GODOY, F. R., ALVES, A. A., REZENDE, P. H. DE A., CRUZ, A. D. DA., SILVA, D. DE M. 2017. The agricultural impact of pesticides on *Physalaemus cuvieri* tadpoles (Amphibia: Anura) ascertained by comet assay. **Zoologia**, 34, 1–8. doi:10.3897/zoologia.34.e19865

GONÇALVES, M. W., VIEIRA, T. B., MACIEL, N. M., CARVALHO, W. F., LIMA, L. S. F., GAMBALE, P. G., SILVA, D. M. 2015. Detecting genomic damages in the frog *Dendropsophus minutus*: preserved versus perturbed areas. **Environmental Science and Pollution Research**, 22(5), 3947–3954. doi:10.1007/s11356-014-3682-1

GUIDA, Y. DE S., MEIRE, R. O., TORRES, J. P. M., MALM, O. 2018. Air contamination by legacy and current-use pesticides in Brazilian mountains: An overview of national regulations by monitoring pollutant presence in pristine areas. **Environmental Pollution**, 242, 19–30. doi:10.1016/j.envpol.2018.06.061

HADDAD, C.F.B., TOLEDO, L.F., PRADO, C.A., LOEBMANN, D., GASPARINI, J. L., SAZIMA, I. 2013. **Guia dos anfíbios da Mata Atlântica: diversidade e biologia**. São Paulo, Brasil, Anolisbooks.

HÄDER, D.P., RICHTER, P. 2009. **Curso avançado de biologia marinha: experimentos ecofisiológicos**. São Francisco do Sul: Universidade da Região de Joinville (Univille),

HAYES, T. B., FALSO, P., GALLIPEAU, S., STICE, M. 2010. The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's perspective. **Journal of Experimental Biology**, 213(6), 921–933. doi:10.1242/jeb.040865.

HEREK, J. S., VARGAS, L., TRINDADE, S. A. R., RUTKOSKI, C. F., MACAGNAN, N., HARTMANN, P. A., HARTMANN, M. T. 2020. Can environmental concentrations of glyphosate affect survival and cause malformation in amphibians? Effects from a glyphosate-based herbicide on *Physalaemus cuvieri* and *P. gracilis* (Anura: Leptodactylidae). **Environmental Science and Pollution Research**. doi:10.1007/s11356-020-08869-z

HOSKINS, T. D., BOONE, M. D. 2017. Variation in malathion sensitivity among populations of Blanchard's cricket frogs (*Acris blanchardi*) and implications for risk assessment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 36(7), 1917–1923. doi:10.1002/etc.3715

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2019. **Indicadores de desenvolvimento sustentável**. Rio de Janeiro: IBGE. Disponível em: < <http://www.ibge.gov.br/biblioteca/visualizacao/livros/liv94254.pdf> >. Acesso em: 07 de jan 2020.

IUCN - 2020. **International Union for Conservation of Nature Red List of Threatened Species**, Disponível em: < <https://www.iucnredlist.org/species/57250/11609155> >. Acesso em: 12 de jan 2020.

LAJMANOVICH, R. C., PELTZER, P. M., MARTINUZZI, C. S., ATTADAMO, A. M., COLUSSI, C. L., BASSÓ, A. 2018. Acute toxicity of colloidal silicon dioxide nanoparticles on amphibian larvae: Emerging environmental concern. **International Journal of Environmental Research**, 12(3), 269-278. doi: 10.1007/s41742-018-0089-8.

LANCTÔT, C., NAVARRO-MARTÍN, L., ROBERTSON, C., PARK, B., JACKMAN, P., PAULI, B. D., TRUDEAU, V. L. 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**, 154, 291–303. doi:10.1016/j.aquatox.2014.05.025

LIPINSKI, V. M., SANTOS, T. G., SCHUCH, A. P. 2016. An UV-sensitive anuran species as an indicator of environmental quality of the Southern Atlantic Rainforest. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 165, 174–181. doi:10.1016/j.jphotobiol.2016.10.025

KUNST, L.R., GARCIA, M.V., MACHADO, A.K., BARBISAN, F., SILVEIRA, A.F. 2014. Medial olivocochlear system and genotoxicity in students of the tobacco-producing region. **Revista CEFAC**, 16(6), 1751-1762. doi.org/10.1590/1982-021620147313

MACAGNAN, N., RUTKOSKI, C. F., KOLCENTI, C., VANZETTO, G. V., MACAGNAN, L. P., STURZA, P. F., HARTMANN, P. A., HARTMANN, M. T. 2017. Toxicity of cypermethrin and deltamethrin insecticides on embryos and larvae of *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae). **Environmental Science and Pollution Research**, 24 (25), 20699-20704. doi.org/10.1007/s11356-017-9727-5.

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO FILHO, A. S. 2008. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Australis**. 12 (03),355-381,

MAHMOOD, I., IMADI, S. R., SHAZADI, K., GUL, A., HAKEEM, K. R. 2016. Effects of pesticides on environment. **Plant, Soil and Microbes**, 253–269. doi:10.1007/978-3-319-27455-3_13

MNIF, W., HASSINE, A.I.H., BOUAZIZ, A., BARTEGI A., THOMAS O., ROIG B. 2011. Effect of endocrine disruptor pesticides: A Review. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, 8(6), 2265-2303. doi.org/10.3390/ijerph8062265

MONTEIRO, J. A. N., CUNHA, L. A., COSTA, M. H. P., REIS, H. S., AGUIAR, A. C. S., OLIVEIRA-BAHIA, V. R. L., BURBANO, R. M. R., ROCHA, C. A. M. 2018. Mutagenic and histopathological effects of hexavalent chromium on tadpoles of *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) (Anura, Ranidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 163, 400-407. doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.083.

MORON, V., ROBERTSON, A. W., WARD, M. N. 2006. Seasonal predictability and spatial coherence of rainfall characteristics in the tropical setting of Senegal. **Monthly Weather Review**, 134(11), 3248–3262. doi:10.1175/mwr3252.1

NSIBANDE, S.A., FORBES, P.B.C. 2016. Fluorescence detection of pesticides using quantum dot materials – A review. **Analytica Chimica Acta**, 945, 9–22. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.10.002>

NWANI, C. D., LAKRA, W. S., NAGPURE, N. S., KUMAR, R., KUSHWAHA, B., SRIVASTAVA, S. K. 2010. Toxicity of the Herbicide Atrazine: Effects on Lipid Peroxidation and activities of antioxidant enzymes in the freshwater fish *Channa Punctatus* (Bloch). **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 7(8), 3298–3312. doi:10.3390/ijerph7083298

OBIAKOR, M. O., OKONKWO, J. C., NNABUDE, P. C., EZEONYEJIAKU, C. D. 2012. Eco-genotoxicology: Micronucleus assay in fish erythrocytes as in situ aquatic pollution biomarker: a Review. **Journal of Animal Science Advances**, 2(1): 123-133.

OLIVEIRA F.H, SILVA V.R. 2020. Uso de Agrotóxico ou controle agroecológico de pragas e doenças da agricultura? Uma reflexão a partir do município de Alvorada do Gurguéia-PI. **Brazilian Journal of Agroecology and Sustainability**, 1 (2) BJAS.

PÉREZ-IGLESIAS, J. M., SOLONESKI, S., NIKOLOFF, N., NATALE, G. S., LARRAMENDY, M. L. 2015. 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**, 119, 15–24. doi:10.1016/j.ecoenv.2015.04.045

PIGNATI, W. A., LIMA, F. A. N. DE S. E, LARA, S. S. DE, CORREA, M. L. M., BARBOSA, J. R., LEÃO, L. H. DA C., PIGNATTI, M. G. 2017. Spatial distribution of pesticide use in Brazil: a strategy for Health Surveillance. **Ciência & Saúde Coletiva**, 22(10), 3281–3293. doi:10.1590/1413-812320172210.17742017

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, G. M., PETROCELLI, S. R. 1985. **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**. Hemisphere, 666 p.

RELYEA, R. A., EDWARDS, K. 2010. What doesn't kill you makes you sluggish: how sublethal pesticides alter predator–prey interactions. **Copeia**, 2010(4), 558–567. doi:10.1643/ce-09-027

RELYEA, R.A., DIECKS, N. 2008. An unforeseen chain of events: Lethal effects of pesticides on frogs at sublethal concentrations. **Ecol Appl**, 18:1728–1742. doi: 10.1890/08-0454.1

RIPPLE, W. J., WOLF, C., NEWSOME, T. M., BARNARD, P., MOOMAW, W. R. , 2019. World scientists' warning of a climate emergency. **BioScience**, v. 70, p. 8-12. doi:10.1093/biosci/biz088

ROCHA, ALYN SON DOS SANTOS. 2020. Agriculturas e meio ambiente: uma questão permanente. **Bahia Análise & Dados, Salvador**, 29 (2), 215-234. Disponível em: <<http://publicacoes.sei.ba.gov.br/index.php/bahiaanaliseedados/article/view/243>>. Acesso em: 17 fev. 2020.

RODRIGUES, B. K. 2007. **Avaliação dos impactos de agrotóxicos na região do Alto Mogi-Guaçu (MG) por meio de ensaios laboratoriais com *Danio rerio* (Cypriniformes, Cyprinidae)**. 138f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de São Carlos. São Carlos.

ROSSA-FERES, D. C., GAREY, M. V., CARAMASCHI, U., NAPOLI, M. F., NOMURA, F., BISPO, A. A., BRASILEIRO, C. A., THOMÉ, M. T. C., SAWAYA, R. J., CONTE, C. E., CRUZ, C. A. G., NASCIMENTO, L. B., GASPARINI, J. L., ALMEIDA, A. P., HADDAD, C. F. B. 2017. **Anfíbios da Mata Atlântica**, pp. 233-308. In: MONTEIRO-FILHO, E. L. A., CONTE, C. E. (eds) Revisões em Zoologia, Mata Atlântica. Paraná, Editora UFPR, 492p.

RUTKOSKI, C. F., MACAGNAN, N., FOLADOR, A., SKOVRONSKI, V. J., DO AMARAL, A. M. B., LEITEMPERGER, J., COSTA M. D., HARTMANN P. A. MÜLLER C., LORO V. L., HARTMANN M. T. 2020. Morphological and biochemical traits and mortality in *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae) tadpoles exposed to the insecticide chlorpyrifos. **Chemosphere**, 250:126162. doi: 10.1016 / j.chemosphere.2020.126162.

RUTKOSKI, C. F., MACAGNAN, N., KOLCENTI, C., VANZETTO, G. V., STURZA, P. F., HARTMANN, P. A., HARTMANN, M. T. 2018. Lethal and sublethal effects of the herbicide Atrazine in the Early Stages of development of *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 74(4), 587-593. doi: 10.1007/s00244-017-0501-y.

SCHIESARI, L., GRILLITSCH, B. 2011. Pesticides meet megadiversity in the expansion of biofuel crops. **Frontiers in Ecology and the Environment**, 9(4), 215–221. doi:10.1890/090139

SCHIESARI, L., WAICHMAN, A., BROCK, T., ADAMS, C., GRILLITSCH, B. 2013. Pesticide use and biodiversity conservation in the Amazonian agricultural frontier. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, 368(1619), 20120378–20120378. doi:10.1098/rstb.2012.0378

SEGALLA, M. V., CARAMASCHI, U., CRUZ, C. A. G., GRANT, T., HADDAD, C. F. B., GARCIA, P. C. A., BERNECK, B. V. M., LANGONE, J. A. 2016. **Anfíbios brasileiros: lista de espécies**. Disponível em:

<http://sbherpetologia.org.br/wpcontent/uploads/2016/10/Segallaetal2016-1.pdf>. Acesso em: 05 jan 2020

SINDIVEG. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal, 2018. **O que você precisa saber sobre defensivos agrícolas**. Disponível em: < <https://sindiveg.org.br/wp-content/uploads/2018/08/oquevoceprecisasabersobredefensivosagricolas.pdf> >. Acesso em: 15 de jan de 2020.

SILVA, H. S. V. P., LOIOLA, C., PEREIRA, S. R. F., SANTOS, R. L., DE ANDRADE, G. V., NUNES, G. S. 2013. Toxicidade aguda e genotoxicidade do agrotóxico comercial Folisuper 600br a girinos de *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leiuperidae). **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, 23. doi:10.5380/pes.v23i0.34994

SILVANO, D. L., SEGALLA, M. V. 2005. **Conservação de anfíbios no Brasil**. Megadiversidade, (1): 79-86.

SPARING, D. W., LINDER, G., BISHOP, C. A., KREST S. 2010. Ecotoxicology of amphibians and reptiles. Pensacola, Florida: **Society of Environmental Toxology and Chemistry Press**.

PIGNATI, W.A., SOUZA LIMA, F.A.N., LARA, S.S., CORREA, M.L.M., BARBOSA, J.R., LEÃO, L.H.C., PIGNATTI, M.G. 2017. Spatial distribution of pesticide use in Brazil: a strategy for Health Surveillance. **Ciência & Saúde Coletiva**, 22 (10), 3281-3293. doi: 10.1590/1413-812320172210.1774.

USEPA. 1992. United States Environmental Protection Agency. **Framework for Ecological Risk Assessment**. Washington, Disponível em: <https://rais.ornl.gov/documents/FRMWRK_ERA.PDF>. Acesso em: 05 jan 2020.

USEPA. 1998. United States Environmental Protection Agency. **Guidelines for ecological risk assessment**. Washington, Disponível em: <<https://clu-in.org/download/contaminantfocus/sediments/ECOTXTBX.PDF>>. Acesso em: 5 jan 2020.

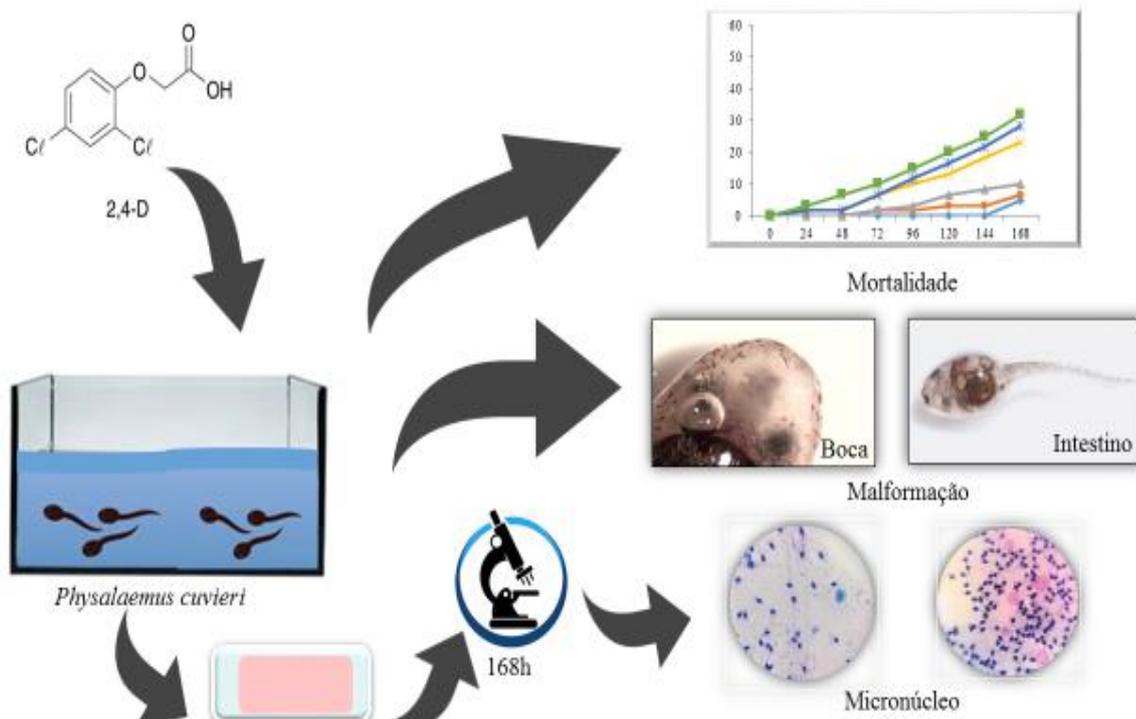
VILLALOBOS, F., DOBROVOLSKI, R., PROVETE, D. B., GOUVEIA, S. F. 2013. Is rich and rare the common share? Describing biodiversity patterns to inform conservation practices for South American anurans. **PLoS ONE**, 8(2), e56073. doi:10.1371/journal.pone.0056073

WALKER, M., WACHLEVSKI, M., NOGUEIRA-COSTA, P., GARCIA, P. C. A., HADDAD, C. F. B. 2018. A new species of *Fritziana* Mello-Leitão 1937 (Amphibia: Anura: Hemiphractidae) from the Atlantic Forest, **Brazil**. **Herpetologica**, 74, 329-3341. doi.org/10.1655/0018-0831.329

WRUBLESWSKI, J., REICHERT JR, F.W., GALON, L., HARTMANN, P.A., HARTMANN, M. T. 2018. Acute and chronic toxicity os pesticides on tadpoles of *Physalaemus curvieri* (Anura, Leptodactylidae). **Ecotoxicology**, 27(3), 369-368. doi.org/10.1007/s10646-018-1900-1

ZAGATTO, P.A., BERTOLETTI, E. 2006. **Ecotoxicologia**. In: Zagatto, P.A. Ecotoxicologia aquática, São Carlos: Rima. 1-12.

**EFEITOS SUBLETAIS DA FORMULAÇÃO COMERCIAL DO HERBICIDA 2,4-D
EM *Physalaemus cuvieri* (ANURA: LEPTODACTYLIDAE)**



RESUMO

Os mananciais hídricos no entorno de áreas agrícolas são altamente expostos à contaminação devido ao escoamento dos agrotóxicos. A contaminação destes recursos hídricos interfere na dinâmica das populações de anfíbios em função da fragilidade desses organismos às substâncias químicas. Anfíbios são considerados bioindicadores ambientais pela alta sensibilidade a agrotóxicos e por integrarem ecossistemas aquáticos e terrestres. O 2,4-D é o segundo herbicida mais vendido no Brasil e já foi detectado em águas superficiais e subterrâneas. É reconhecido como um dos principais poluentes dos ecossistemas aquáticos pela sua capacidade de bioacumulação em organismos não-alvo. Neste cenário, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos subletais de diferentes concentrações da formulação comercial de 2,4-D em relação a mortalidade, atividade natatória, malformações e potencial genotóxico em *Physalaemus cuvieri*. Girinos de *P. cuvieri* foram expostos a seis concentrações de 2,4-D: 0,0, 4,0, 30,0, 52,5, 75,0 e 100,0 $\mu\text{g a.e. L}^{-1}$, por 168 horas. Os girinos apresentaram alterações na atividade natatória, especialmente hiperatividade. Malformações na boca e no intestino foram as alterações mais encontradas sendo significativa na concentração de 100,0 $\mu\text{g a.e. L}^{-1}$. O 2,4-D aumentou a frequência de micronúcleo nas maiores concentrações testadas, além de induzir outras anormalidades nucleares como núcleo lobado, núcleo entalhado, núcleo com bolha e núcleo com microcitose. A mortalidade foi significativa nas concentrações acima de 52,5 $\mu\text{g a.e. L}^{-1}$. Estes resultados demonstram o comprometimento do desenvolvimento e da manutenção da espécie de *P. cuvieri* em seus ambientes naturais.

Palavras-chave: Agrotóxico. Anfíbios. Atividade Natatória. Micronúcleo. Mortalidade.

**SUBLETHAL EFFECTS OF THE COMERCIAL FORMULATION OF 2,4-D
HERBICIDE IN *Physalaemus cuvieri* (ANURA: LEPTODACTYLIDAE)**

ABSTRACT

The water sources surrounding agricultural areas are highly exposed to contamination due to the flow of pesticides. The contamination of these water resources interferes in the dynamics of amphibian populations due to the fragility of these organisms to chemical substances. Amphibians are considered environmental bioindicators for their high sensitivity to pesticides and for integrating aquatic and terrestrial ecosystems. 2,4-D is the second best-selling herbicide in Brazil and has already been detected in surface and underground waters. It is recognized as one of the main pollutants of aquatic ecosystems for its bioaccumulation capacity in non-target organisms. In this scenario, the objective of this work was to evaluate the sublethal effects of different concentrations of the commercial formulation of 2,4-D in relation to mortality, swimming activity, malformations and genotoxic potential in *Physalaemus cuvieri*. *P. cuvieri* tadpoles were exposed to six concentrations of 2,4-D: 0.0, 4.0, 30.0, 52.5, 75.0 and 100.0 $\mu\text{g a.e. L}^{-1}$, for 168 hours. Tadpoles showed changes in swimming activity, especially hyperactivity. Malformations in the mouth and intestine were the most frequently found alterations, being significant in the concentration of 100.0 $\mu\text{g a.e. L}^{-1}$. The use of 2,4-D increased the frequency of the micronucleus in the highest tested concentrations, in addition to inducing other nuclear abnormalities such as lobed nucleus, notched nucleus, bubble nucleus and microcytosis nucleus. The mortality was significant in concentrations above 52.5 $\mu\text{g a.e. L}^{-1}$. These results demonstrate the commitment to the development and maintenance of the *P. cuvieri* species in its natural environments.

Keywords: Pesticide. Amphibians. Swimming activity. Micronucleus. Amphibians. Mortality.

2 INTRODUÇÃO

A extensiva utilização de agrotóxicos nos sistemas agrícolas representa um grave problema ambiental, principalmente nos países em desenvolvimento, cujas economias estão diretamente relacionadas aos produtos do agronegócio (BOMBARDI, 2017). Segundo a Anvisa (2018), o mercado mundial de agrotóxicos cresceu 93% nos últimos dez anos, sendo que no Brasil, este crescimento chegou a 190%. O uso inadequado de agrotóxicos possibilita a contaminação dos sistemas naturais no entorno dos sistemas agrícolas, causando impacto no meio ambiente e declínios populacionais de anfíbios (SLABY *et al.*, 2019).

As contaminações do meio aquático por agrotóxicos podem ocorrer pelo processo de carreamento do solo, aplicação via aérea, lavagem dos equipamentos de pulverização e o uso inadequado, onde a alta toxicidade, pode gerar danos à saúde humana, animal e ambiental (DOMINGUES JÚNIOR *et al.*, 2011). Diversos estudos têm relatado que a presença de agrotóxicos nos corpos hídricos podem atingir altas concentrações, principalmente próximos às regiões agrícolas, onde esses produtos são utilizados (VEIGA *et al.*, 2006; VASCONCELOS, 2014, AGOSTINI *et al.*, 2020).

Os herbicidas visam maximizar a produção agrícola por meio do controle de plantas daninhas. No entanto, o uso excessivo pode causar impactos negativos em diversas espécies não-alvo, principalmente as que ocorrem nos ambientes aquáticos (BOMBARDI, 2017; GAAIED *et al.*, 2019).

No Brasil, os herbicidas representam a classe de agrotóxicos mais utilizada sendo o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) o segundo ingrediente ativo mais vendido no país desde 2013 (IBAMA 2020). De baixo peso molecular, o 2,4-D é um membro da família dos herbicidas clorofenoxiacéticos, pertencente ao grupo fenoxiacético (ANVISA, 2018). Isoladamente ou em combinação com outros dois herbicidas (aminopiralde e picloram), existem 24 formulações comerciais que têm como ingrediente ativo o 2,4-D (MARCATO *et al.*, 2017), o qual é largamente utilizado em grandes culturas, como arroz, aveia, cana-de-açúcar, milho, soja, trigo, dentre outras (LI *et al.*, 2017).

Com alta solubilidade em água (KEARNS *et al.*, 2014), e longa persistência no solo (MARCATO, 2014; ISLAM *et al.* 2018), o 2,4-D é reconhecido como um dos principais poluentes dos ecossistemas aquáticos (ATAMANIUK *et al.*, 2013). Mountassif *et al.* (2008)

reportaram que cerca de 90% deste herbicida ocasionalmente atinge os mananciais hídricos (MOUNTASSIF *et al.*, 2008), podendo ocasionar sérios problemas no ecossistema aquático e risco à saúde humana (KEGLEY *et al.*, 2010; KEARNS *et al.*, 2014).

Dentre os vertebrados, anfíbios anuros são de particular importância para estudos toxicológicos com agrotóxicos, pois muitas espécies se reproduzem em áreas agrícolas ou próximo a essas (MARGARIDO *et al.*, 2013; MACAGNAN *et al.*, 2017; RUTKOSKI *et al.*, 2018), tornando-os espécies modelo como bioindicadores de estresse ambiental (bioindicadores) (RUTKOSKI *et al.*, 2018; WRUBLESWSKI *et al.*, 2018). Esses animais vivem tanto em ambientes aquáticos (larvas e adultos) quanto em ambientes terrestres (adultos) e, por possuírem a pele permeável, permitem maior absorção de substâncias tóxicas (CUSHMAN, 2006; SPARLING *et al.*, 2010; BRADFORD *et al.*, 2011; GONÇALVES *et al.*, 2014; BORGES *et al.* 2019). Embora ainda escassas, nos últimos anos tem aumentado as pesquisas envolvendo os efeitos deste herbicida em anfíbios (COADY *et al.*, 2013; FIGUEIREDO; RODRIGUES, 2014; MESAK *et al.*, 2018; CURI *et al.*, 2019; FREITAS *et al.*, 2019), alertando para seus efeitos tóxicos. No entanto, a alta diversidade de agrotóxicos utilizados ainda requer inúmeros estudos para que os efeitos nocivos ao ambiente sejam avaliados.

Physalaemus cuvieri (FITZINGER, 1826) ou rã-cachorro, como popularmente é conhecida, pertence à família Leptodactylidae. É uma espécie de tamanho pequeno a médio (HADDAD; SAZIMA, 1992), que apresenta uma ampla distribuição geográfica, ocorrendo em boa parte do território brasileiro, leste do Paraguai e norte da Argentina (BORGES-MARTINS, 2007; MIJARES; RODRIGUES; BALDO, 2010; FROST 2020). Essa espécie ocorre em muitos tipos de habitat, sendo geralmente encontrada durante a noite em ambientes abertos ou florestais próxima a corpos d'água lênticos artificiais ou naturais, temporários ou permanentes (MIJARES; RODRIGUES; BALDO, 2010).

No período da desova, essa espécie é encontrada em charcos, açudes e em corpos d'água temporários com sua atividade reprodutiva durante a estação chuvosa (BARRETO; ANDRADE 1995; BASTOS *et al.* 2003). As desovas são depositadas em ninhos de espuma na água próximos as margens e estas podem conter de 277 a 725 ovos (BARRETO, ANDRADE 1995). Na Argentina *P. cuvieri* está listada como localmente ameaçada devido a extração de madeira, a poluição da terra e da água causada pelo escoamento de agrotóxicos e a destruição do habitat para a agricultura (MIJARES *et al.*, 2010).

Herbicidas fenoxiacéticos, como o 2,4-D e seus contaminantes, podem causar aumento da mortalidade fetal, efeito teratogênico e efeitos reprodutivos em diferentes organismos (FACT SHEET, 2000) além de serem considerados carcinogênicos, podendo gerar transtornos endócrinos (KEGLEY *et al.* 2010). Organismos não-alvos expostos ao 2,4-D em um curto período de tempo demonstraram capacidade de bioacumulação (DA FONSECA *et al.*, 2008; KILJANEK *et al.*, 2016).

Dentro deste contexto, este estudo teve por objetivo avaliar os efeitos subletais de diferentes concentrações da formulação comercial de 2,4-D em relação a mortalidade, atividade natatória, malformações e potencial genotóxico em girinos de *Physalaemus cuvieri*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 AGROTÓXICO

O agrotóxico utilizado para a realização dos testes de toxicidade foi à formulação comercial do herbicida 2,4-D (ácido 2, 4-diclorofenoxiacético com 670 g L⁻¹ do equivalente ácido; Nortox®, Arapongas/PR), registrado no Ministério da Agricultura, da Pecuária e Abastecimento – MAPA sob nº 03009.

De acordo com a bula o 2,4-D tem Classificação Toxicológica I - Extremamente Tóxico, Classificação do Potencial de Periculosidade Ambiental III - Produto Perigoso para o Meio Ambiente. Esse herbicida tem meia vida na água de 29 dias (SOUZA, 2014), e a sua solubilidade na água a 20 °C é de 24300 mg L⁻¹, com coeficiente de partição octanol - água log Kow de - 0,82, pressão de vapor a 20 °C é de 0,009 mPa e a constante da Lei de Henry a 4,0 X 10⁻⁰⁶, sendo altamente solúvel em água (IUPAC, 2019).

Para a solução-estoque foi feita a diluição da formulação comercial em água destilada, para obter uma concentração de 500 mg a.e. L⁻¹ de 2,4-D e então procedeu-se o preparo das concentrações utilizadas no estudo: 0,0, 4,0, 30,0, 52,5, 75,0 e 100,0 µg a.e L⁻¹. As concentrações utilizadas foram baseadas no ácido equivalente (a.e.) de 2,4-D utilizado na formulação comercial.

3.2 ORGANISMO-TESTE E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Physalaemus cuvieri foi à espécie utilizada como organismo teste (Figura 1–A). As desovas foram coletadas manualmente em corpos de água lânticos (Figura 1–B/C/D) localizados na Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Campus Erechim – RS (Latitude: 27°43' 46,11" Sul; Longitude: 52°16' 54,40" Oeste), entre os meses de outubro 2018 a janeiro 2019.

As desovas foram coletadas mediante autorização #65820 do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMbio), com aprovação do Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA/UFFS; 23205.003087/2018-11). O experimento foi realizado na Universidade Federal

da Fronteira Sul (UFFS), Campus de Erechim, no Laboratório de Ecologia e Conservação, no período compreendido entre outubro de 2018 a março de 2019.

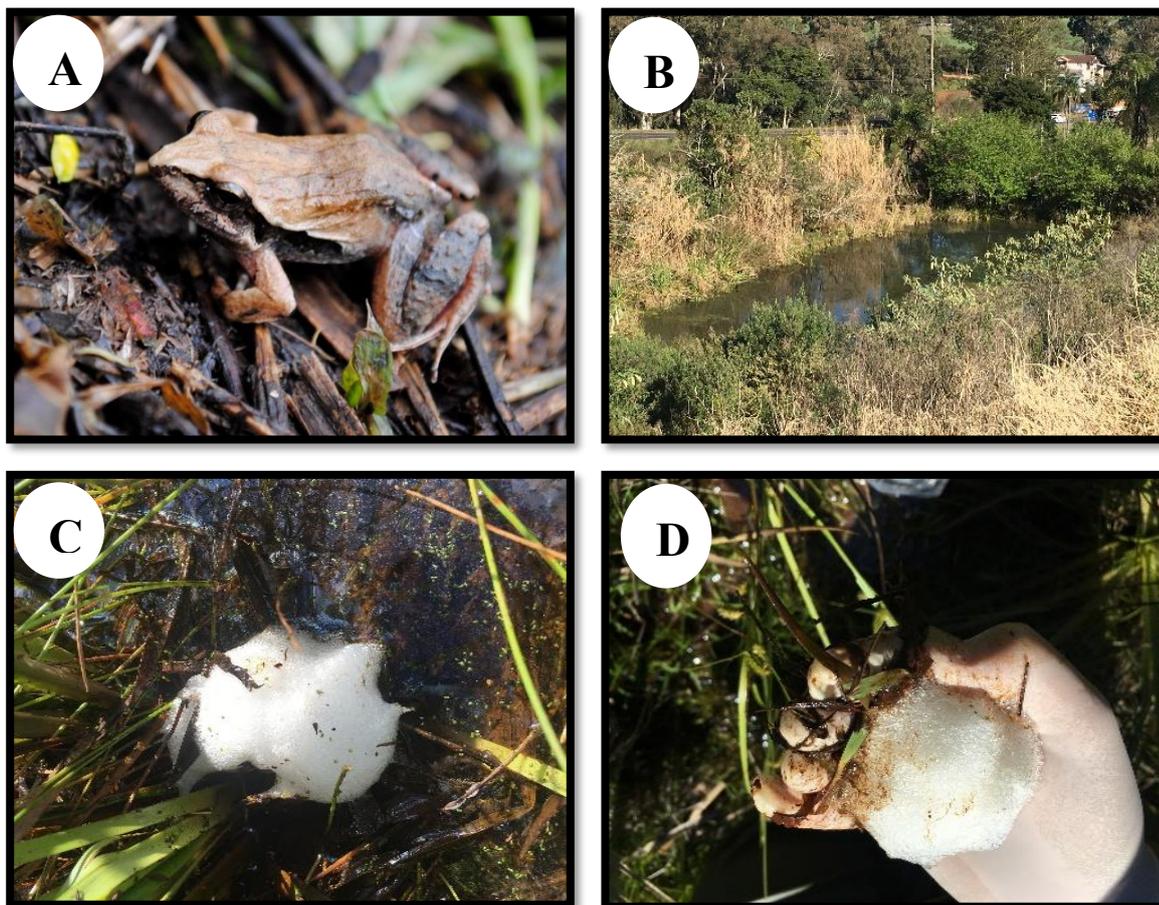


FIGURA 1- *Physalaemus cuvieri* adulto (A). Local da coleta (B). Desova em corpos d' água lânticos (C). Coleta manual das desovas (D). **Fotos:** Gilcinéia dos Santos

As desovas coletadas foram transportadas para o Laboratório de Ecologia e Conservação da UFFS e em seguida acondicionadas em aquários de 15 litros com água de poço artesiano declorada e com aeração constante, com temperatura de 24°C (± 1) (Figura 2).



FIGURA 2 - Criação de girinos de *Physalaemus cuvieri*, Laboratório de Ecologia e Conservação, UFFS. Foto: Gilcinéia dos Santos.

A água utilizada na criação dos girinos e nos experimentos apresentou os seguintes parâmetros: 24°C (± 1); pH, 7,0 ($\pm 0,5$), oxigênio dissolvido de 5 (± 1) mg.L⁻¹, turbidez < 5, condutividade de 160 (± 10) μ S.cm⁻¹, alcalinidade de 9,74 mg CaCO₃.L⁻¹, Na de 44,1 mg.L⁻¹, Mg de 1,35 mg.L⁻¹, Fe de 0,08 mg.L⁻¹, Ni < 0,001 mg.L⁻¹. Os girinos foram alimentados uma vez por dia com ração comercial completa para peixes em flocos (Alcon Basic®) e alface orgânica.

3.2.1 Ensaio de Toxicidade Crônica

Para os ensaios da toxicidade crônica (subletal) foram utilizadas seis diferentes concentrações do herbicida 2,4-D na água: 0,0, 4,0, 30,0, 52,5, 75,0 e 100,0 μ g a.e./ L⁻¹. As concentrações foram selecionadas de acordo com o permitido pela legislação brasileira (4,0-30,0 μ g.L⁻¹; Tabela 1) e a partir de estudos realizados em corpos hídricos dentro da área de ocorrência de *P. cuvieri* (Tabela 1).

TABELA 1 - Concentrações de 2,4-D utilizadas no ensaio de toxicidade crônica em girinos de *Physalaemus cuvieri*.

| TRATAMENTO | 2,4-D ($\mu\text{g a.e/L}^{-1}$) | REFERÊNCIA |
|------------|---------------------------------------|---|
| 1 | 4,0 | Limite máximo em água doce classe I e classe II (resoluções 357/2005, BRASIL, 2005). |
| 2 | 30,0 | Máximo em água doce potável classe III (resolução 2914/2011, BRASIL, 2011; Portaria de Consolidação nº 5 de 28/09/2017, BRASIL, 2017). |
| 3 | 52,2 | Concentração intermediária entre a maior concentração permitida em água doce e a maior encontrada em água superficial. |
| 4 | 75,0 | Encontrada em águas superficiais (PINHEIRO <i>et al.</i> , 2010). |
| 5 | 100,0 | Concentração máxima neste estudo, considerando o registrado em corpos de água lânticos com ocorrência de anfíbios, em áreas agricultáveis na Argentina (AGOSTINI <i>et al.</i> , 2020). |

Fonte: Elaborada pela autora, 2020.

Ao atingirem o estágio de desenvolvimento 25 de acordo com a classificação de Gosner (1960), os girinos foram realocados para recipientes de vidro esterilizados, com seis repetições. Cada recipiente recebeu 10 girinos, compondo uma unidade experimental. Cada recipiente recebeu 500 ml da solução a ser testada, contendo água e a concentração definida de 2,4-D. O grupo controle foi preparado somente com água (Figura 3).



FIGURA 3 - Teste de toxicidade crônica de *Physalaemus cuvieri* com duração de 168 horas a diferentes concentrações da formulação comercial de 2,4-D. **Foto:** Gilcinéia dos Santos.

Os ensaios de toxicidade tiveram duração de sete dias (168 horas). Os girinos foram alimentados diariamente com ração Alcon Basic e alface orgânica. Foram monitorados e registrados os parâmetros de temperatura da água, oxigênio dissolvido, mortalidade dos girinos e analisado o comportamento de atividade natatória dos girinos expostos. Pinças e peneiras foram individualizadas entre os tratamentos para evitar contaminação. Os girinos mortos foram retirados a cada 24 horas.

A atividade natatória foi observada e registrada diariamente, de acordo com o método da lista de verificação comportamental descrita na ASTM E1711 – 12 “*Standard Guide for Measurement of Behavior During Fish Toxicity Tests*”. Foram observados quatro parâmetros comportamentais, os quais foram comparados com o controle: (0) atividade natatória igual do controle, (1) letargia, ou atividade natatória menor que o controle, (2) Hiperatividade, ou atividade natatória maior do controle e (3) atividade natatória com contrações espasmódicas, tremores ou convulsões. Para essa análise, foi feito um estímulo com bastão de vidro, mexendo devagar a água três vezes.

Após 168 h de exposição ao herbicida, os girinos foram analisados para avaliar a ocorrência ou não de malformações. Foram analisados com auxílio de uma lupa os seguintes parâmetros fenotípicos (HU *et al.*, 2015): malformação intestinal (edema e morfologia), anomalias oculares (lente turva e morfologia), coluna (curvatura), malformação na boca (ausência de queratodontes e morfologia dos lábios). As malformações foram fotografadas com o auxílio de um estereomicroscópio binocular (Nikon SMZ 745T).

3.2.2 Teste do Micronúcleo e Anormalidade Nucleares de Eritrócitos

Ao final do ensaio, 10 girinos de cada concentração e do grupo controle foram eutanasiados em solução de lidocaína por aproximadamente 5 minutos conforme descrito por CONCEA (2018). Em seguida, com o auxílio de uma seringa heparinizada foram obtidas amostras de sangue através de punção cardíaca. Com o sangue obtido, foi feito esfregaço e colocado em lâminas limpas e deixado secar por um período de no mínimo 12 horas. Posteriormente as lâminas foram coradas com o Kit Panótico Rápido (LABORCLIN).

Inicialmente as lâminas foram coradas com submissão sequencial em solução de triarilmetano (0,1%), durante 20 segundos, solução de xantenos (0,1%), por 20 segundos e na solução de tiazinas (0,1%), 40 segundos. Posteriormente as lâminas foram lavadas com água destilada e mantidas em temperatura ambiente até a secagem para análise.



FIGURA 4 - Preparação das lâminas de *Physalaemus cuvieri* para o teste de micronúcleo com o Kit de coloração Panótico Rápido. **Foto:** Gilcinéia dos Santos.

As lâminas foram observadas em microscópio óptico, resolução 100x para contagem dos micronúcleos presentes (até 1.000 eritrócitos por lâmina). Foram observadas as frequências de eritrócitos portadores de micronúcleo (LAJMANOVICH *et al.*, 2013) calculados a partir da fórmula:

$$\text{MN (\%)} = \frac{\text{Número de eritrócitos contendo micronúcleo}}{\text{número total de células contabilizadas}} \times 1000$$

Além dos micronúcleos, foram analisadas outras nove Alterações Nucleares Eritrocíticas (ANEs): (1) Células Entalhadas: núcleos com uma pequena evaginação em forma de fenda bem definida, apresentando forma de rim; (2) Células Apoptóticas: núcleos sendo levados a uma inativação e fragmentação, associados à morte celular; (3) Células Binucleadas: células com dois núcleos; (4) Células com Broto Nuclear ou Bolha: células que apresentam uma evaginação pequena da membrana nuclear; (5) Células Lobadas: núcleo que apresenta células que podem ter vários lobos com evaginações que apresentam formato irregular maiores que as do núcleo com bolha; (6) Células Microcitose: Material genético condensado em seu núcleo e o citoplasma reduzido; (7) Células Vacuolizadas: núcleos que apresentam uma região clara destituída de qualquer material visível no seu interior; (8) Células Cariólise: apresenta somente o contorno do núcleo, com cor desvanecida sem material genético; (9) Células Anucleadas: células sem a presença de núcleos (CARRASCO *et al.*, 1990; FENECH *et al.*, 2011; LAJMANOVICH *et al.*, 2013).

3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados obtidos nos ensaios de toxicidade crônica quanto a mortalidade, atividade natatória, avaliações morfológicas e análises de micronúcleo e demais anomalias, foram submetidos à análise de variância ANOVA, com teste *post hoc* de Dunnett, comparando-se os resultados obtidos para os animais do grupo controle e os animais expostos. As diferenças entre as concentrações foram analisadas utilizando-se o teste de Tukey para comparação de médias. Em todas as situações foram considerados nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

O valor de CENO foi calculado para cada um dos efeitos adversos significativos estatisticamente avaliados neste, por análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Dunnett.

Todas as análises foram realizadas utilizando o programa STATISTICA (versão 8.0) e o GraphPad Prism (versão 7.0).

3.4 AVALIAÇÃO DE RISCO ECOLÓGICO

A avaliação de risco ecológico avalia a probabilidade de ocorrência de um efeito adverso como resultado da exposição a um ou mais fatores de estresse, como a exposição aos agrotóxicos (USEPA, 1998). Esta metodologia define um valor de risco considerando a escala do efeito, intensidade, tipo e o potencial do sistema de recuperação, gerando um valor para o nível de preocupação (LOC, *level of concern*) que é igual a 1 para o risco crônico. A partir do LOC é possível interpretar o quociente de risco, analisando o risco potencial para organismos não-alvo.

O risco ecológico foi calculado pelo quociente de risco (HQ, *hazard quotient*), de acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, 1998). O quociente de risco é baseado na concentração estimada no ambiente (CEA) e no valor da concentração de efeito não observado (CENO - maior concentração testada onde não foi observado o efeito adverso), de acordo com a equação:

$$\text{CHQ} = \frac{\text{CEA}}{\text{CENO}}$$

Onde:

CHQ: Quociente de risco crônico;

CEA: Concentração estimada no ambiente;

CENO: Concentração de efeito não observado;

Para o cálculo do quociente de risco crônico foram utilizadas duas concentrações de 2,4-D estimadas para o ambiente (CEA), de acordo com a literatura: (1) 30 $\mu\text{g a.e.L}^{-1}$ como concentração ambiental, sendo considerado um cenário conservador deste herbicida no ambiente por ser permitido pela lei brasileira (BRASIL, 2011, 2017), e (2) 100 $\mu\text{g a.e.L}^{-1}$ como concentração ambiental, como um cenário de alerta, por estar acima da legislação, mas poder ser encontrada no ambiente onde anfíbios se reproduzem (e.g. AGOSTINI *et al.*, 2020).

Os resultados do cálculo de CHQ foram comparados com os níveis de preocupação (LOC) adotados pela USEPA (1998). O valor LOC estabelecido para o risco crônico é 1, isto é, se $\text{LOC} > 1$, existe potencial de risco para organismos aquáticos não-alvo.

Também foram calculados os valores de CEO (concentração de efeito observado – menor concentração onde foi observado efeito adverso) para cada um dos efeitos adversos significativos por ANOVA e Dunnet. Para ter um valor limite da concentração máxima do 2,4-D que pode ser suportada por *P. cuvieri*, foi calculada a máxima concentração aceitável do toxicante (MCAT) para os efeitos adversos, pela média geométrica entre CENO e CEO.

4 RESULTADOS

4.1 ENSAIO CRÔNICO

As concentrações de 52,5, 75,0 e 100,0 µg a.e. L⁻¹ de 2,4-D influenciaram significativamente na mortalidade de girinos de *P. cuvieri* ($F_{(5;36)} = 6,75$, $p < 0,05$) (Tabela 2). Quanto maior o tempo de exposição, maior a mortalidade dos girinos expostos, sendo significativo em 168 horas ($F_{(6;28)} = 2,81$ $p = 0,03$) (Figura 5).

TABELA 2: Número de girinos de *Physalaemus cuvieri* expostos a formulação comercial de 2,4-D durante 7 dias.

| Concentração µg a.e. L ⁻¹ | Mortalidade | | | | | | | Total | Total (%) |
|---|-------------|------|------|------|-------|-------|--------|-------|--------------|
| | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h | 120 h | 144 h | 168 h* | | |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 3 | 5,00 |
| 4 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 | 4 | 6,67 |
| 30 | 0 | 0 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 6 | 10,00 |
| 52,5 | 1 | 0 | 3 | 2 | 2 | 3 | 3 | 14* | 23,33 |
| 75 | 1 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 | 4 | 17* | 28,33 |
| 100 | 2 | 2 | 2 | 3 | 3 | 3 | 4 | 19* | 31,67 |

* significativo em relação ao controle.

Fonte: Elaborada pela autora, 2020.

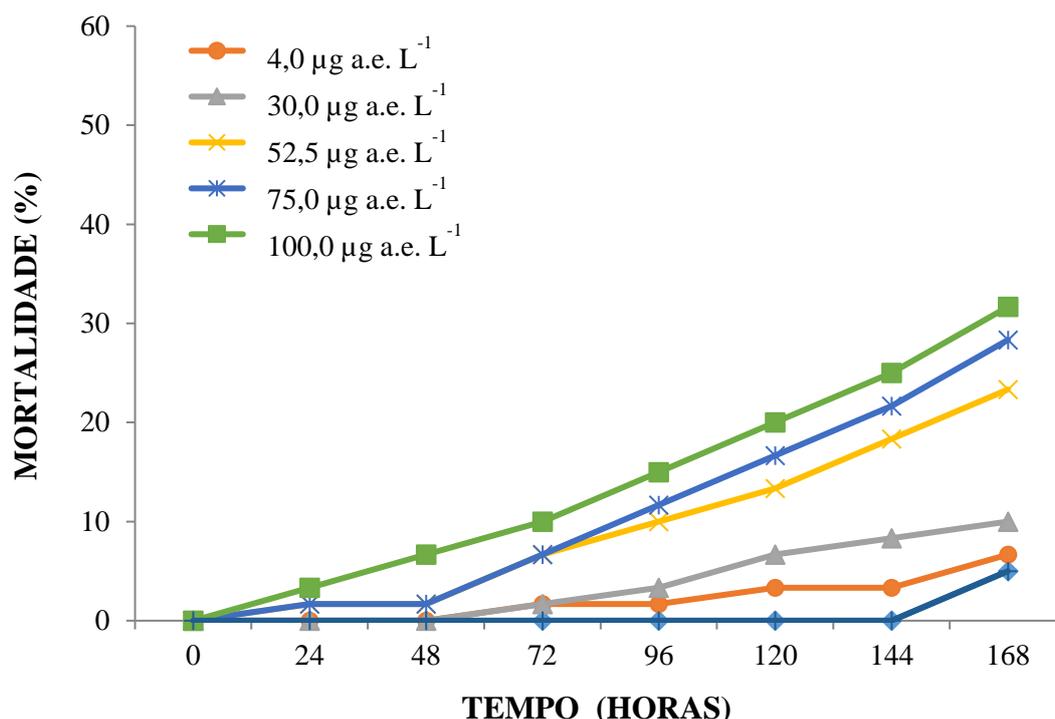


FIGURA 5 - Mortalidade cumulativa (%) de girinos de *Physalaemus cuvieri* expostos a diferentes concentrações da formulação comercial de 2,4-D durante ensaio crônico. **Fonte:** Elaborada pela autora, 2020.

A hiperatividade foi o comportamento natatório mais observado nos girinos expostos a todas as concentrações de 2,4-D (Tabela 3). A concentração de 52,5 µg a.e. L⁻¹ foi a que mais causou letargia nos girinos ($F_{5,36} = 6,48$; $p < 0,05$) e a 100 µg a.e. L⁻¹ causou espasmos ($F_{5,36} = 2,73$; $p = 0,03$). Em relação ao tempo de exposição ao herbicida, o comportamento de hiperatividade e contrações espasmódicas dos girinos aumentou em 144 e 168 horas ($p < 0,05$).

TABELA 3- Girinos de *Physalaemus cuvieri* com alterações na atividade natatória durante o tempo de exposição à diferentes concentrações da formulação comercial de 2,4-D após 168 horas.

| Alterações na atividade natatória | | | | |
|--|-------------------|----------------|----------|-------------------------|
| Concentração (µg a.e.L ⁻¹) | Igual ao controle | Hiperatividade | Letargia | Contrações espasmódicas |
| 4,0 | 4 | 48 | 1 | 7 |
| 30,0 | 6 | 42 | 5 | 7 |
| 52,5 | 17 | 23 | 7* | 13 |
| 75,0 | 17 | 38 | 0 | 5 |
| 100,0 | 24 | 22 | 0 | 14* |

* significativo em relação ao controle pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$)

Fonte: Elaborada pela autora, 2020.

As ocorrências de malformações nos girinos expostos a formulação comercial de 2,4-D foram significativas na concentração de 100 $\mu\text{g a.e. L}^{-1}$, com alterações na boca (ausência de queratodontes), (Figura 6A, 7A e 7B) e no intestino (Figura 6B, 8A e 8B). As alterações na cauda (Figura 6C) e edemas (Figura 6D) foram observadas, mas não diferiram entre as concentrações (Tabela MS1 - Material Suplementar).

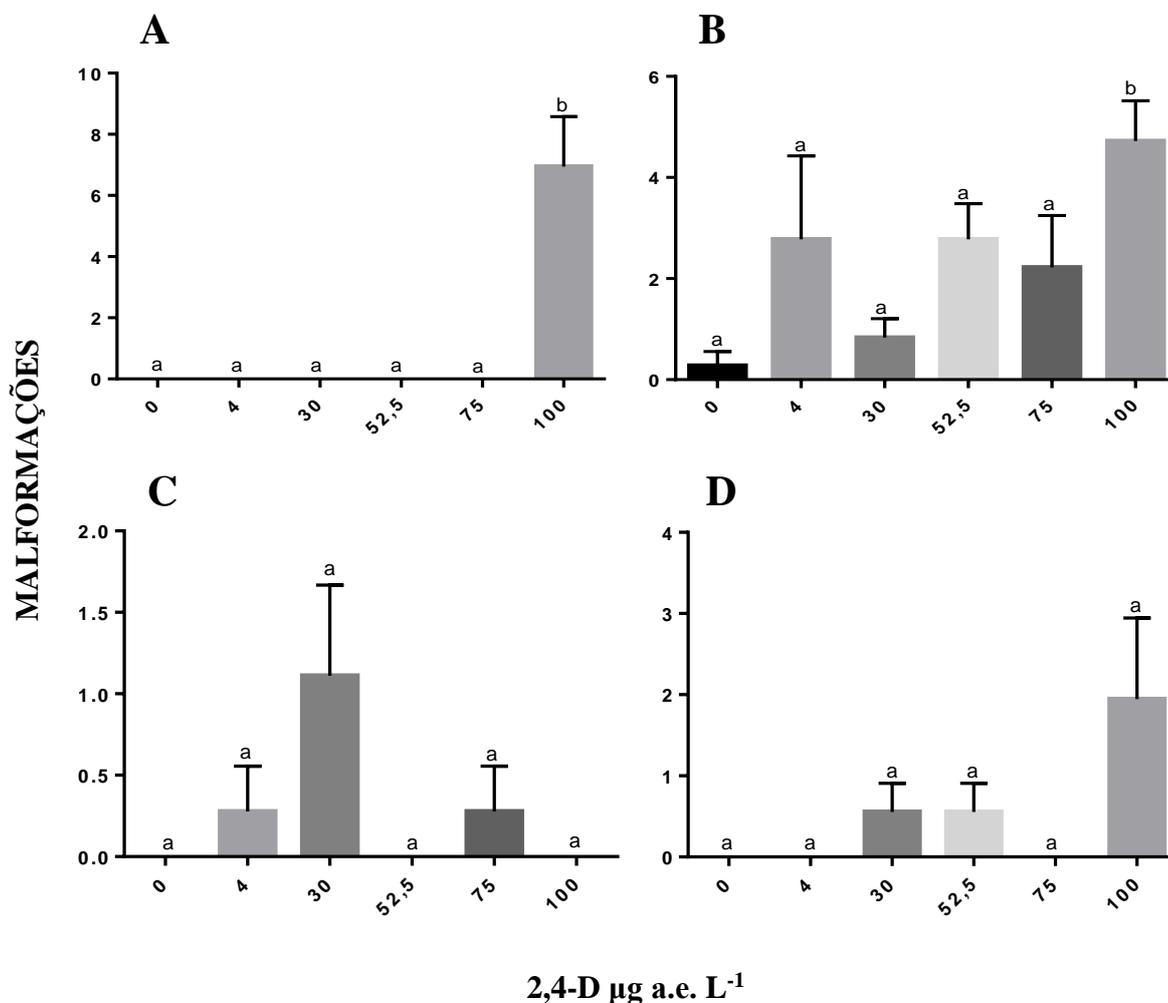


FIGURA 6 - Girinos *Physalaemus cuvieri* (%) com malformação (A) na boca (ausência de queratodontes), (B) no intestino, (C) na cauda e (D) como presença de edemas, após 168 h de exposição à diferentes concentrações da formulação comercial de 2,4-D. Letras diferentes referem-se a diferenças significativas entre os grupos pelo teste de Tukey. **Fonte:** Elaborada pela autora, 2020.

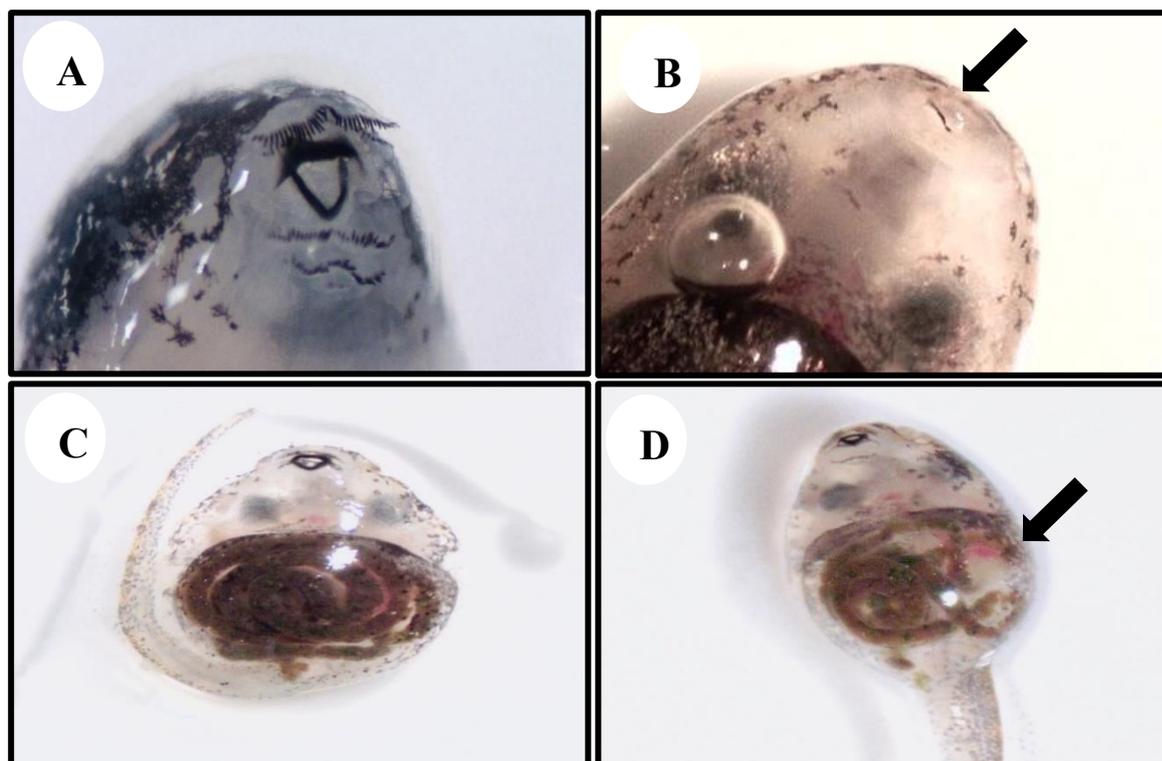


FIGURA 7 - Boca (A-B) e intestino (C-D) de girinos de *Physalaemus cuvieri* expostos a diferentes concentrações da formulação comercial de 2,4-D. (A) boca e (C) intestino de girino do grupo controle, (B) boca e (D) intestino de girino exposto a concentração de 100 µg a.e. L⁻¹. **Fonte:** Elaborada pela autora, 2020.

4.2 MICRONÚCLEO E ALTERAÇÕES NUCLEARES DE ERITRÓCITOS

Foram avaliados 60.921 eritrócitos de girinos de *P. cuvieri* expostos a formulação comercial do herbicida 2,4-D, contabilizando o grupo controle e todas as concentrações utilizadas (Tabela 4). Foram identificados mais micronúcleos em células de girinos expostos em concentrações acima de 52,5 µg a. e. L⁻¹ de 2,4-D (Figura 9A), $F_{5,54}=8,35$; $p<0,01$. (Tabela 4).

TABELA 4 - Frequência de micronúcleos identificado sem eritrócitos de *Physalaemus cuvieri* expostos a diferentes concentrações da formulação comercial de 2,4-D após 168 horas.

| Concentração (µg a.e. L ⁻¹) | Nº de eritrócitos analisados | Nº de micronúcleo detectados | Micronúcleos (‰) |
|--|---------------------------------|---------------------------------|---------------------|
| Controle | 10.321 | 0 | 0 |
| 4,0 | 10.065 | 2 | 0,199 |
| 30,0 | 10.238 | 5 | 0,488 |
| 52,5 | 10.172 | 11* | 1,081 |
| 75,0 | 10.049 | 10* | 0,995 |
| 100,0 | 10.076 | 18* | 1,786 |

*Significativo em relação ao controle, Dunnett ($p<0,05$)

Fonte: Elaborada pela autora, 2020.

Além do micronúcleo, foram registrados oito, das nove alterações nucleares de eritrócitos analisadas nos girinos de *P. cuvieri* expostos ao herbicida 2,4-D (Figura 10). Destas, foram significativas as ANEs núcleo entalhado a partir da concentração de 30 $\mu\text{g a.e. L}^{-1}$, núcleo lobado e núcleo com bolha nas concentrações acima de 52,5 $\mu\text{g a.e. L}^{-1}$ e microcitose na concentração de 52,5 $\mu\text{g a.e. L}^{-1}$ (Figura 9 B-E; Tabela MS2, Material Suplementar).

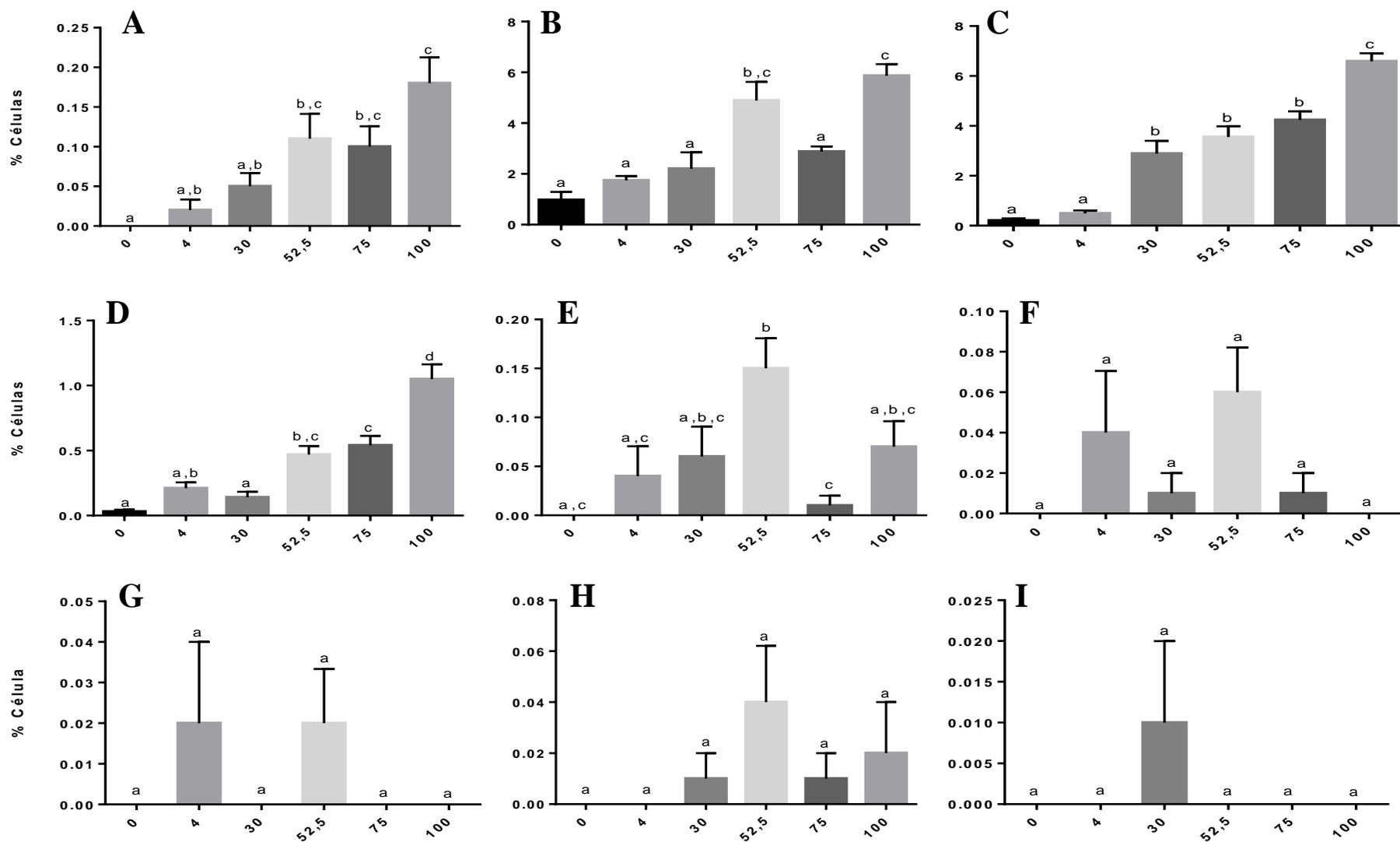


FIGURA 8 – Células (%) e girinos (%) de *Physalaemus cuvieri* expostos à diferentes concentrações da formulação comercial de 2,4-D por 168 horas, onde (A) Micronúcleo e (B-I) alterações nucleares de eritrócitos. (B) Núcleo Lobado, (C) Núcleo Entalhado, (D) Núcleo com Bolha, (E) Microcitose, (F) Núcleo com Apoptose, (G) Núcleo Binucleada, (H) Núcleo com Caríolise e (I) Núcleo Vacuolizado. Letras diferentes referem-se a diferenças significativas entre os grupos. **Fonte:** Elaborada pela autora, 2020.

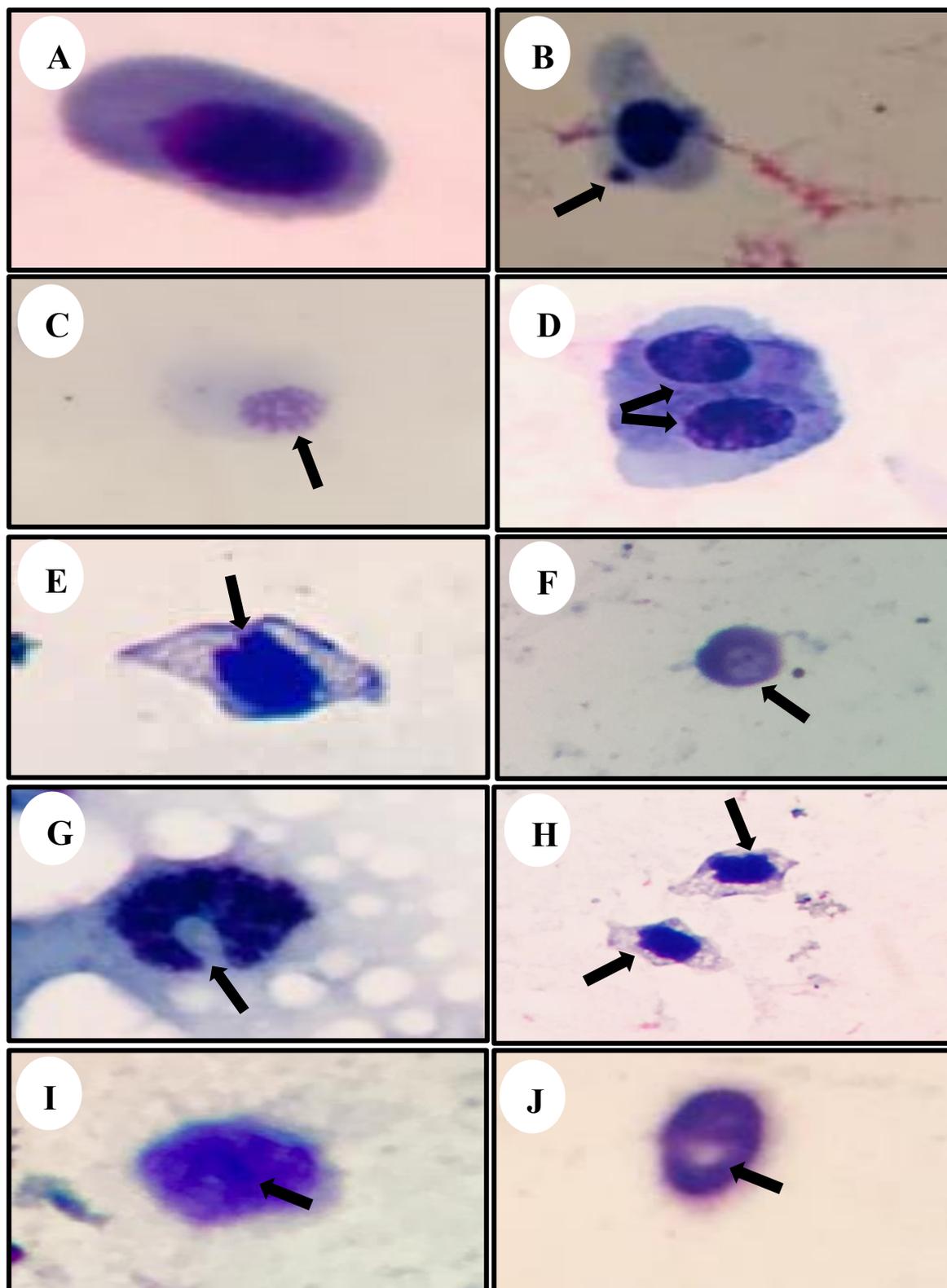


FIGURA 9 - Micronúcleo e Alterações Nucleares de Eritrócitos encontradas em girinos de *Physalaemus cuvieri* expostos à diferentes concentrações da formulação comercial de 2,4-D. (A) Célula com núcleo normal, (B) Célula com Micronúcleo; (C) Células com Apoptose; (D) Célula Binucleada; (E) Célula com Bolha ou Broto Nuclear; (F) Células com Cariólise; (G) Célula Entalhada; (H) Células Lobadas; (I) Células com Microcitose; (J) Célula Vacuolizada. **Fonte:** Elaborada pela autora, 2020.

Núcleo lobado foi a ANE que apresentou o valor mais expressivo com 30,43 % do total de células observadas em todas as concentrações, seguido do núcleo entalhado com 29,50 % e o núcleo com bolha com 4,01%. As outras alterações foram detectadas com menor expressão, em especial o tipo núcleo vacuolizado (Figura 11).

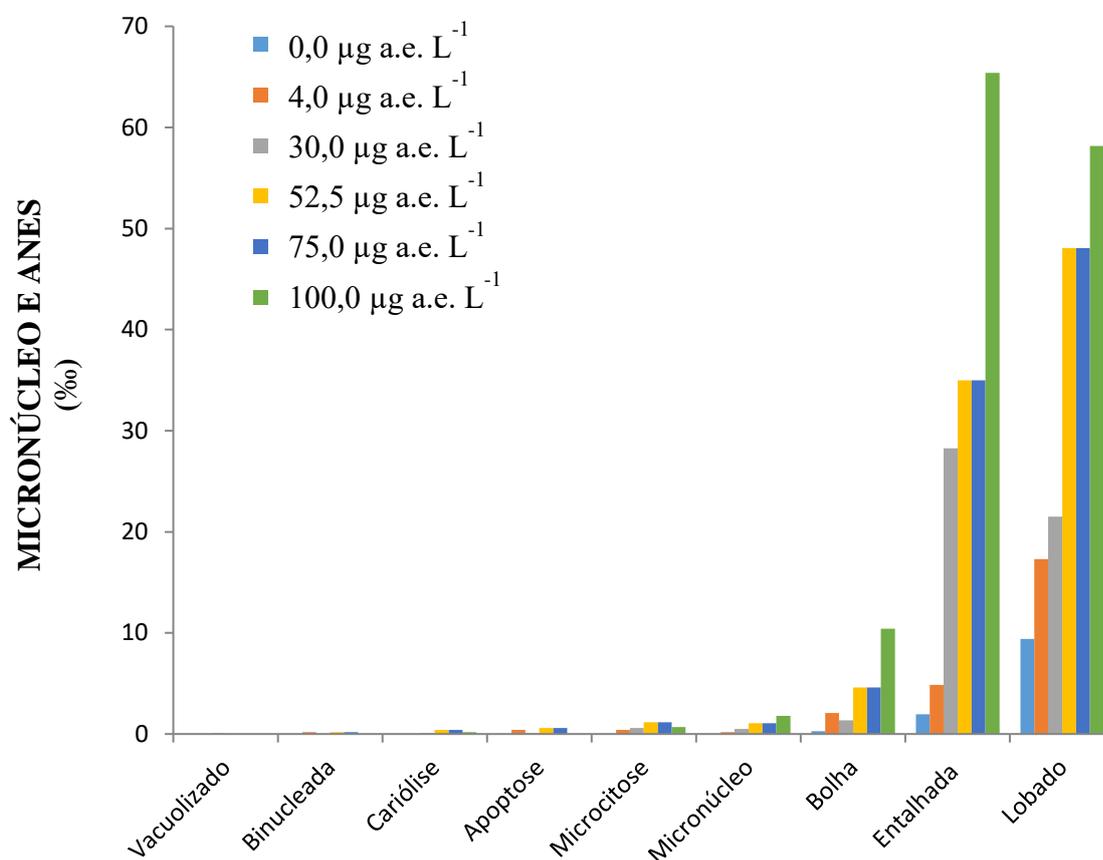


FIGURA 10 - Frequência da ocorrência de alterações nucleares de eritrócitos de girinos de *Physalaemus cuvieri* expostos ao herbicida 2,4-D, nas concentrações de 4,0, 30,0, 52,5, 75,0 e 100,0 µg a.e. L⁻¹, comparados ao controle (%). **Fonte:** Elaborada pela autora, 2020.

A partir de 30,0 µg a.e. L⁻¹ de 2,4-D o número de micrônúcleos e ANEs somados foi significativa nos girinos expostos ($F_{5,54}=33,95$; $p<0,01$), especialmente em 100 µg a.e. L⁻¹ (Figura 12).

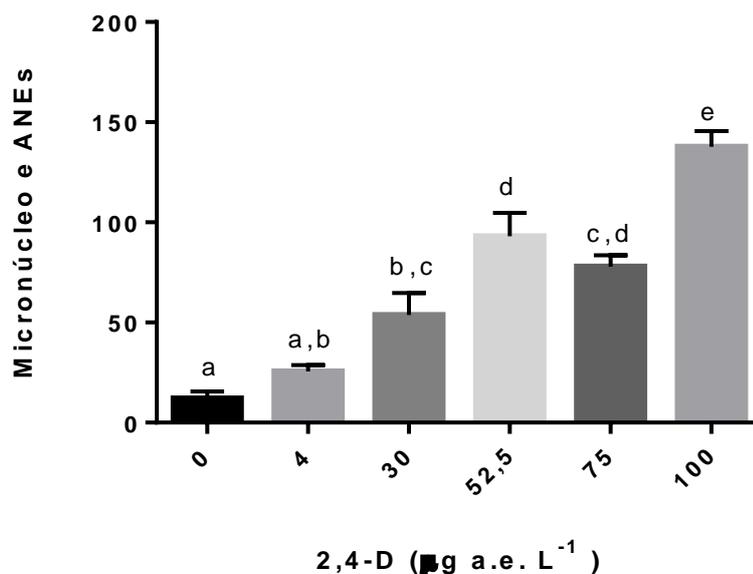


FIGURA 11 - Frequência de micronúcleos e Alterações Nucleares de Eritrócitos de girinos de *Physalaemus cuvieri* expostos à diferentes concentrações da formulação comercial de 2,4-D, após 168 horas. **Fonte:** Elaborada pela autora, 2020.

4.3 ANÁLISE DE RISCO ECOLÓGICO

A avaliação de risco ecológico para o herbicida 2,4-D indicou que, no cenário conservador (CHQ1, 30 µg a.e. L⁻¹), o risco ecológico foi para o potencial genotóxico do herbicida, na soma dos micronúcleos e alterações eritrocitárias. No cenário de alerta (CHQ2, 100 µg a.e. L⁻¹), houve risco ecológico para todos os parâmetros analisados.

Verificou-se concentração de efeito não observado (CENO) entre 4,0 e 75,0 µg a. e. L⁻¹ e máxima concentração aceitável do toxicante (MCAT) entre 10,65 e 86,60 µg a.e. L⁻¹ de 2,4-D. Os valores de risco ecológico observados para mortalidade, atividade natatória (letargia e espasmos), malformações, micronúcleo e ANEs para girinos de *P. cuvieri* utilizados neste trabalho são apresentados na tabela 5.

TABELA 5 - Avaliação de risco ecológico para girinos de *Physalaemus cuvieri* expostos a diferentes concentrações da formulação comercial de 2,4-D ($\mu\text{g a.e. L}^{-1}$), considerando a Concentração de Efeito Não Observado (CENO), Concentração de Efeito Observado (CEO), Máxima Concentração Aceitável do Toxicante (MCTA), Quociente de Risco Crônico – Conservador (CHQ1) e Quociente de Risco Crônico – Alerta (CHQ2).

| | CENO | CEO | MCAT | CHQ1 | CHQ2 |
|---------------------------------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|
| Mortalidade | 30 | 52,5 | 39,69 | 1 | 3,33 |
| Atividade Natatória - Letargia | 30 | 52,5 | 39,69 | 1 | 3,33 |
| Atividade Natatória - Espasmos | 75 | 100 | 86,60 | 0,4 | 1,33 |
| Malformações | 75 | 100 | 86,60 | 0,4 | 1,33 |
| Micronúcleo | 30 | 52,5 | 39,69 | 1 | 3,33 |
| MN + ANES | 4 | 30 | 10,65 | 7,5 | 25 |

Fonte: Elaborada pela autora, 2020.

5 DISCUSSÃO

A formulação comercial do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) causou mortalidade significativa em *P. cuvieri* nas concentrações acima de 52,5 µg a.e. L⁻¹ após sete dias de exposição. Ou seja, a sobrevivência desta espécie pode estar em risco em ambientes onde esse herbicida atinge limites acima do permitido em água doce no Brasil (30,0 µg L⁻¹). Essa concentração está dentro do que foi registrada em rios (PINHEIRO *et al.*, 2010) e abaixo do encontrado em ambientes naturais de anfíbios (75,0 – 209,6 µg. L⁻¹ de 2,4-D; AGOSTINI *et al.*, 2020) ou mesmo estimado para a água superficial em ensaios ecotoxicológicos (1970 µg. L⁻¹, MESAK *et al.*, 2018).

Physalaemus cuvieri foi mais sensível ao 2,4-D do que outras espécies estudadas com o mesmo herbicida. Por exemplo, não houve mortalidade em *Leptodactylus fuscus* (Leptodactylidae), *Physalaemus nattereri* (Leiperidae) e *Lithobates catesbeianus* (Ranidae), após 21 dias de exposição a 2,4-D DMA ® 806 em concentrações mais altas do que no presente estudo (FREITAS *et al.*, 2019). Em *Physalaemus albonotatus*, expostos a 2,4-D Amina Zamba® (262,5 mg/L), a sobrevivência só diminuiu a partir do 13º dia (CURI *et al.*, 2019). Tem sido observado que os girinos nativos são mais vulneráveis ao herbicida 2,4-D do que as espécies comuns (FREITAS *et al.*, 2019) e a sensibilidade é responsiva à espécie e ao contaminante.

Girinos de *P. cuvieri* apresentaram várias alterações na atividade natatória em exposição ao herbicida 2,4-D. Foi observado comportamento de hiperatividade em todas as concentrações avaliadas. Essas alterações podem ter sido decorrentes dos efeitos neurotóxicos verificados em outras espécies de anfíbios (FREITAS *et al.*, 2019b). Além disso, a partir da concentração de 52,5 µg a.e. L⁻¹ observou-se redução na atividade natatória, pela letargia dos girinos. Comportamento similar foi relatado em girinos (*Leptodactylus fuscus*, *Physalaemus nattereri*, *Lithobates catesbeianus*) (FREITAS *et al.*, 2019a) e em peixe-zebra (*Danio rerio*) (GAAIED *et al.* 2019). Os efeitos do 2,4-D no comportamento de animais podem estar relacionados a efeitos de neurotransmissores e enzimas como já apontado por Peltzer *et al.* (2013) em estudos com *Hypsiboas pulchellus*. As alterações na atividade natatória identificam ação neurotóxica, o que corrobora com os efeitos do herbicida 2,4-D no sistema nervoso central e o sistema cardiovascular (GAAIED *et al.*, 2019).

Alterações na atividade natatória, como as observadas neste estudo, podem prejudicar a sobrevivência de *P. cuvieri*, por aumentar a vulnerabilidade a predadores (WIDDER; BIDWELL, 2006; PELTZER *et al.*, 2013), além de diminuir o seu crescimento e comprometer o seu desenvolvimento (SHUMAN-GOODIER; PROPPER 2016).

Neste estudo, o herbicida 2,4-D causou alterações morfológicas nas maiores concentrações testadas, principalmente malformação na boca e no intestino de girinos de *P. cuvieri*. Alterações morfológicas semelhantes foram observadas em *Physalaemus albonotatus* (CURI *et al.*, 2019), assim como malformações intestinais e edemas em *Xenopus laevis* (LENKOWSKI *et al.*, 2010), expostos a formulação comercial de 2,4-D. A ampla gama de malformações em anfíbios foi relatada pela contaminação ambiental por diferentes agrotóxicos, como glifosato (HEREK *et al.*, 2020), cipermetrina e fipronil (MACAGNAN, 2018) e clorpirifós (RUTKOSKI *et al.*, 2020). Dentre as malformações em seus aparatos bucais, destacam-se os queratodontes danificados que, associados à malformação de intestinos, prejudicam o forrageamento e comprometem a alimentação e a respiração dos girinos, ocasionando maior mortalidade desses indivíduos, principalmente durante o período larval (PÉREZ-IGLESIAS *et al.*, 2015).

Com uma menor eficiência de forrageamento, girinos com malformações na boca têm sua capacidade alimentar diminuída, ocasionando maior risco de predação, menor taxa de crescimento, atrasos no desenvolvimento, menor peso corporal e aptidão reduzida (CRUMP *et al.* 1999; TOLEDO 2014; SCHUCH *et al.* 2015; CURI *et al.*, 2019).

Além das alterações morfológicas, a toxicidade pelo 2,4-D pode induzir alterações no metabolismo energético e estresse oxidativo, além de ser agente citotóxico e potencialmente genotóxico (WAFI *et al.*, 2011). Neste estudo, o potencial de genotoxicidade do herbicida 2,4-D foi evidente mesmo em baixas concentrações, como observados pelas alterações em 52,5, 75 e 100 $\mu\text{g a.e. L}^{-1}$. Outros estudos reportaram que o potencial genotóxico de 2,4-D para anfíbios (1.490 $\mu\text{g.L}^{-1}$) (MESAK *et al.*, 2018) e peixes (75 ppm – 756 mg/l) (ATEEQ *et al.*, 2006; ARCAUTE *et al.*, 2016), concentrações superiores às utilizadas no presente estudo.

Quando avaliadas individualmente, as alterações nucleares de eritrócitos (ANEs), núcleo lobado, núcleo entalhado, núcleo com bolha e microcitose demonstraram diferença significativa a partir de 52,5 $\mu\text{g a.e. L}^{-1}$ de 2,4-D. Isso mostra que a exposição de anfíbios a 2,4-D em ambiente aquático pode causar danos nas suas células. Dentes essas, células com núcleo entalhado, núcleo lobado e núcleo com bolha podem ocasiona morte celular, induzir o

desenvolvimento de processos cancerígenos e provocar instabilidade cromossômica (DO AMARAL *et al.* 2018), o que afeta a reprodução e sobrevivência de girinos.

O número de micronúcleos e alterações nucleares eritrocitárias observadas a partir da concentração de 30 $\mu\text{g a. e. L}^{-1}$ indica o potencial genotóxico do herbicida 2,4-D. Apesar da concentração de 30 $\mu\text{g a. e. L}^{-1}$ ser permitida para águas potáveis no Brasil (BRASIL, 2011), espécies de *P. cuvieri* expostas a essas concentrações terão danos celulares, que poderão acarretar em danos metabólicos, alterações alimentares e patologias (FIJAN, 2002, POLLO *et al.*, 2019). Durante o processo de divisão celular dos eritrócitos pode haver rupturas cromossômicas (com efeito clastogênico) ou disfunção de segregação cromossômica, o que ocasiona aumento da produção e liberação de enzimas DNase, e, conseqüentemente dano mitocondrial, clivagem de diferentes proteínas nucleares e citoesqueléticas constituintes, oxidação do RNAm e falhas na polimerização da tubulina (MESAK *et al.* 2018).

A partir das alterações morfológicas, comportamentais e genéticas permitiram verificar que a estimativa conservadora da análise de risco ecológico, utilizando a concentração permitida em lei no Brasil (2,4-D, 30 $\mu\text{g a.e. L}^{-1}$) mostrou baixo risco nos parâmetros mortalidade, atividade natatória e malformações, mas risco quanto ao potencial genotóxico. Já para a estimativa de alerta (2,4-D, 100 $\mu\text{g a.e. L}^{-1}$) demonstrou que todos os parâmetros avaliados apresentaram risco ecológico para *P. cuvieri*, valor do herbicida ainda inferior aos encontrados em habitats naturais de anfíbios (209,6 $\mu\text{g. L}^{-1}$) (AGOSTINI *et al.*, 2020), o que pode significar o declínio nas populações dessa espécie ou mesmo extinção local. A partir dessas análises, determinou-se o valor da máxima concentração aceitável do agrotóxico para a mortalidade (39,69 $\mu\text{g a.e. L}^{-1}$), letargia (39,69 $\mu\text{g a.e. L}^{-1}$), aparecimento de micronúcleo (39,69 $\mu\text{g a.e. L}^{-1}$) e alterações nucleares de eritrócitos mais micronúcleo (10,65 $\mu\text{g a.e. L}^{-1}$) de *P. cuvieri*. Apesar de esses valores serem superior ao permitido por lei, são inferiores as concentrações observadas em corpos de água lânticos em áreas agricultáveis, onde os anfíbios de reproduzem, os quais foram detectados entre 75 $\mu\text{g. L}^{-1}$ (PINHEIRO *et al.*, 2010) e 209,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (AGOSTINI *et al.*, 2020). Assim, esses resultados indicam que concentrações encontradas em ambientes aquáticos no Brasil podem representar um risco ecológico importante para a sobrevivência de girinos de *P. cuvieri*.

Outros estudos de toxicidade subletal realizados com 2,4-D em anfíbios testaram doses maiores do que 100 $\mu\text{g a.e.L}^{-1}$ mostrando efeitos desse herbicida (MESAK *et al.*, 2018, FREITAS *et al.*, 2019). Neste estudo, mostramos que mesmo concentrações baixas de 2,4-D podem causar mortalidade, efeitos na atividade natatória e tem potencial genotóxico em

Physalaemus. O gênero *Physalaemus* (*P. nattereri*, *P. gracilis*, *P. albonotatus*, *P. cuvieri*) tem sido utilizado em vários estudos ecotoxicológicos sobre efeitos de agrotóxicos (FREITAS *et al.* 2017; MACAGNAN *et al.*, 2017; RUTKOSKI *et al.*, 2018; WRUBLESWSKI *et al.*, 2018; CURI *et al.*, 2019; DAAM *et al.* 2019), e tem sido demonstrado que as espécies deste grupo mostram sensibilidade alta ou intermediária ao 2,4-D (FREITAS *et al.*, 2019; CURI *et al.*, 2019).

De acordo com Islam *et al.* (2018), estudos com concentrações elevadas são úteis para compreender os efeitos de produtos químicos em organismos não-alvo. Mas estudos com concentrações permitidas pela Lei e encontradas no ambiente natural são fundamentais para a avaliação dos efeitos ecotoxicológicos de agrotóxicos em espécies de anfíbios que permitam desenvolver critérios de qualidade ambiental e de avaliação de riscos ecológicos (GONÇALVES *et al.*, 2014; WAGNER *et al.*, 2014; PEREZ-IGLESIAS *et al.*, 2016; HEREK, 2017; BENVINDO-SOUZA *et al.*, 2019).

Isso demonstra a necessidade de novos estudos comportamentais com diferentes espécies de anuros para avaliar os riscos ecotoxicológicos do 2,4-D em populações que habitam áreas agrícolas. Esses dados são importantes para representar os impactos ambientais nos ecossistemas aquáticos garantindo uma melhor proteção as comunidades naturais de anfíbios.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo amplia a compreensão sobre os impactos ecotoxicológicos da formulação comercial 2,4-D em girinos de *P. cuvieri*. Foi possível observar que concentrações já encontradas no ambiente natural alteraram a sobrevivência, a mobilidade e causaram malformações na espécie em estudo, quando expostas ao 2,4-D. O teste de micronúcleo (MN) indicou aumento na frequência do número de MN nas concentrações mais altas e anormalidades nucleares de eritrócitos, mesmo na concentração permitida por Lei. Esses resultados confirmam efeitos genotóxicos em *P. cuvieri*, o que pode desencadear a morte celular. A espécie *P. cuvieri* pode ser considerada um organismo modelo para testes ecotoxicológicos relacionados a pesticidas agrícolas por ser suscetível à poluição ambiental. Novas pesquisas com outras espécies de anfíbios podem ampliar a avaliação do risco desse

herbicida em ambiente natural, importantes para a tomada de decisão sobre manejo e medidas conservacionistas dos ambientes aquáticos.

REFERÊNCIAS

- AGOSTINI M.G., ROESLER I., BONETTO C., RONCO A.E., BILENCA D. 2020. Pesticides in the real world: The consequences of GMO-based intensive agriculture on native amphibians. **Conservation**, 108355 . doi: doi.org/10.1016/j.biocon.2019.108355
- ANVISA. 2020. Agência Nacional de vigilância Sanitária. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Monografias+de+Agrotoxicos/Monografias> Acesso: 25 jan 2020.
- ARCAUTE, C.R., SOLONESKI, S., LARRAMENDY, M. 2016. Toxic and genotoxic effects of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-based herbicide on the Neotropical fish *Cnesterodon decemmaculatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 128, 222–229. doi:10.1016/j.ecoenv.2016.02.027
- ATAMANIUK, T. M., KUBRAK, O. I., STOREY, K. B., LUSHCHAK, V. I. 2013. Oxidative stress as a mechanism for toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D): studies with goldfish gills. **Ecotoxicology**, 22(10), 1498–1508. doi:10.1007/s10646-013-1136
- ATEEQ, B., FARAH, M. A., AHMAD, W. 2006. Evidence of apoptotic effects of 2,4-D and butachlor on walking catfish, *Clarias batrachus*, by transmission electron microscopy and DNA degradation studies. **Life Sciences**, 78(9), 977–986. doi:10.1016/j.lfs.2005.06.008
- BARRETO, L., ANDRADE, G. V. 1995. Aspects of the reproductive biology of *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leptodactylidae) in northeastern Brazil. **Amphibia-Reptilia**, 16(1), 67–76. doi:10.1163/156853895x00208
- BASTOS, R.P., MOTTA, J.A.O., LIMA, L.P., GUIMARÃES, L.D. 2003. **Anfíbios da Floresta Nacional de Silvânia, Estado de Goiás**. Goiânia, RP Bastos.
- BENVINDO-SOUZA, M., SANTOS OLIVEIRA, E. A., ASSIS, R. A., ARAÚJO SANTOS, C. G., BORGES, R. E., DE MELO E SILVA, D., RAQUEL DE SOUZA SANTOS, L. 2019. Micronucleus test in tadpole erythrocytes: trends in studies and new paths. **Chemosphere**, 124910. doi:10.1016/j.chemosphere.2019.124910
- BOMBARDI, L. M. 2017. **Geografia do uso de agrotóxicos no Brasil e conexões com a União Européia**. São Paulo: Laboratório de Geografia Agrária FFLCH – USP,

BORGES-MARTINS, M., BECKER, F.G., COLOMBO, P., MELO, M.T.Q., ZANK, C. 2007. **Anfíbios**. In: Becker Fg, Ra Ramos E La Moura. Biodiversidade: Regiões da Lagoa do Casamento e dos Butiazais de Tapes, Planície Costeira do Rio Grande do Sul. Brasília. p. 276 - 291.

BRADFORD, D.F., KNAPP, R.A., SPARLING, D.W., NASH, M.S., STANLEY, K.A., TALLENT-HALSELL, N.G., MCCONNELL, L.L., SIMONICH, S.M. 2011. Pesticide distributions and population declines of California, USA, alpine frogs, *Rana muscosa* and *Rana sierrae*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 30(3), 682–691. doi:10.1002/etc.425

BRASIL. 2005. **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. Brasília.

BRASIL. 2011. **Portaria nº 2.914, 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. Brasília.

BRASIL. 2017. **Portaria de Consolidação Nº 5, de 28 de setembro de 2017**. Consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde. Brasília.

CARRASCO, K. R., TILBURY, K. L., MYERS, M. S. 1990. Assessment of the piscine micronucleus test as an in siter biological indicator of chemical contaminant effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**. 47, 2123-2436. doi:org/10.1139/f90-237.

COADY, K., MARINO, T., THOMAS, J., SOSINSKI, L., NEAL, B., HAMMOND, L. 2013. An evaluation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in the amphibian metamorphosis assay and the fish Short-Term reproduction assay. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 90, 143–150. doi:10.1016/j.ecoenv.2012.12.025

CONCEA, 2018. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Gabinete do Ministro. Resolução Normativa nº 37, de 15 de fevereiro de 2018. Baixa a Diretriz da Prática de Eutanásia. **Diário Oficial da União**, Brasília, Acesso em: 09 abril de 2019.

CRUMP, D., BERRIL, M., COULSON, D., LEAN, D., MCGILLIVRAY, L., SMITH, A. 1999. Sensitivity of amphibian embryos, tadpoles, and larvae to enhanced UV-B radiation in

natural pond conditions. **Canadian Journal of Zoology**, 77: 1,956–1,96. doi.org/10.1139/z99-161

CURI, L. M., PELTZER, P. M., SANDOVAL, M. T., LAJMANOVICH, R. C. 2019. Acute toxicity and sublethal effects caused by a commercial herbicide formulated with 2,4-D on *Physalaemus albonotatus* tadpoles. **Water, Air, & Soil Pollution**, 230 (1), 1-345. doi.org/10.1007/s11270-018-4073-x.

CUSHMAN, S. A. 2006. Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: A review and prospectus. **Biological Conservation**, 128(2), 231–240. doi:10.1016/j.biocon.2005.09.031

DAAM, M.A., MOUTINHO, M.F., ESPÍNDOLA, E.L.G., SCHIESARI L. 2019. Lethal toxicity of the herbicides acetochlor, ametryn, glyphosate and metribuzin to tropical frog larvae. **Ecotoxicology**, 28, 707–715. doi.org/10.1007/s10646-019-02067-5

DA FONSECA, M.B., GLUSCZAK, L., SILVEIRA MORAES, B., DE MENEZES, C.C., PRETTO, A., TIerno, M.A., ZANELLA, R., GONÇALVES, F.F., LÚCIA LORO, V. 2008. The 2,4-D herbicide effects on acetylcholinesterase activity and metabolic parameters of piava freshwater fish (*Leporinus obtusidens*). **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 69, 416– 420. doi:10.1016/j.ecoenv.2007.08.006

DO AMARAL, D. F., MONTALVÃO, M. F., DE OLIVEIRA MENDES, B., DA COSTA ARAÚJO, A. P., DE LIMA RODRIGUES, A. S., MALAFAIA, G 2018. Sub-lethal effects induced by a mixture of different pharmaceutical drugs in predicted environmentally relevant concentrations on *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) (Anura, ranidae) tadpoles. **Environmental Science and Pollution Research**. 26(1), :600-616. doi:10.1007/s11356-018-3656-9

DOMINGUES JÚNIOR, A.P. 2011. **Avaliação dos efeitos do herbicida glifosato sobre o cafeeiro: respostas bioquímicas e fisiológicas**. 2011.73 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Unicamp, Campinas.

FENECH, M., KIRSCH-VOLDERS, M., NATARAJAN, A. T., SURRALLE, J., CROTT, J. W., PARRY, J., NORPPA, H., EASTMOND, D. A., TUCKER, J. D., THOMAS, P. 2011. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, 26 (1), 125-132. doi: 10.1093/mutage/geq052.

FIJAN, N. 2002. Morphogenesis of blood cell lineages in channel catfish. **Journal of Fish Biology**, 60(4), 999–1014. doi:10.1111/j.1095-8649.2002.tb02424.x

FREITAS, J.S., FELÍCIO, A.A., TERESA, F.B., ALMEIDA, E.A. 2017. Combined effects of temperature and clomazone (Gamit®) on oxidative stress responses and B-esterase activity of *Physalaemus nattereri* (Leiuperidae) and *Rhinella schneideri* (Bufonidae) tadpoles. **Chemosphere**, 185, 548-562. doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.061

FREITAS, J.S., GIROTTO, L., GOULART, B.V., ALHO, L.O.G., GEBARA, R.C., MONTAGNER, C.C., SCHIESARI, L., ESPÍNDOLA E.L.G. E. 2019. Effects of 2,4-D-based herbicide (DMA® 806) on sensitivity, respiration rates, energy reserves and behavior of tadpoles. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 182, 109446. doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109446

FROST D. Amphibian species of the world: an online reference. **American Museum of Natural History**, New York. Acessado em: 06 jan 2020. <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia>

GAAIED, S., OLIVEIRA, M., DOMINGUES, I., BANNI, M. 2019. 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid herbicide effects on zebrafish larvae: development, neurotransmission and behavior as sensitive endpoints. **Environmental Science and Pollution Research**, 27(4), 3686–3696. doi: 10.1007/s11356-019-04488-5.

GONÇALVES M.W., VIEIRA T.B., MACIEL N.M., CARVALHO W.F., LIMA L.S.F., GAMBALE P.G., NOMURA F., BASTOS R.P., SILVA D.M. 2014. Detecting genomic damages in the frog *Dendropsophus minutus*: preserved versus perturbed areas. **Environmental Science and Pollution Research**, 22(5), 3947–3954. doi:10.1007/s11356-014-3682-1

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

HADDAD, C. F. B., SAZIMA, I. 1992. **Anfíbios anuros da Serra do Japi**. In: MORELLATO, L.P.C. Org. História natural da Serra do Japi: ecologia e preservação de uma área florestal no Sudeste do Brasil. Campinas, UNICAMP/FAPESP. p.188-211.

HEREK, J. S., VARGAS, L., TRINDADE, S. A. R., RUTKOSKI, C. F., MACAGNAN, N., HARTMANN, P. A., HARTMANN, M. T. 2020. Can environmental concentrations of glyphosate affect survival and cause malformation in amphibians? Effects from a glyphosate-based herbicide on *Physalaemus cuvieri* and *P. gracilis* (Anura: Leptodactylidae). **Environmental Science and Pollution Research**. doi:10.1007/s11356-020-08869-z

HU, L., ZHU, J., ROTCHEL, J.M., 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**, 508, 258-265. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.11.086

IBAMA, 2020. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Boletins anuais de produção, importação, exportação e vendas de agrotóxicos no Brasil**. Disponível em: < <http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>>. Acesso em 16 janeiro. 2020.

ISLAM, F., WANG, J., MUHAMMAD, F., JHAN, M.A., XU, M.S.S., ZHU, L., ZHAO, J., MUÑOS, M., LI, S., ZHOU, Q. X.W. 2018. Potential impact of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on human and ecosystems. **Environment International**, 111, 332–351. doi:10.1016/j.envint.2017.10.020

IUPAC, 2019. 2,4-D. Disponível em: <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/4.htm>. Acesso em: 19 dez 2019.

LAJMANOVICH, R.C., JUNGES, C.M., ATTADAMO, A.M., PELTZER, P., CABAGNA-ZENKLUSEN, M.C., BASSO, A. 2013. Individual and mixture toxicity of commercial formulations containing glyphosate, metsulfuron-methyl, bispyribac-sodium, and picloram on *Rhinella arenarum* tadpoles. **Water, Air, & Soil Pollution**, 224 (3), 1-13. doi.org/10.1007/s11270-012-1404-1.

LENKOWSKI, J.R., SANCHEZ-BRAVO, G., MCLAUGHLIN, K.A. 2010. Low concentrations of atrazine, glyphosate, 2,4-dichloro phenoxy acetic acid, and triadimefon exposures have diverse effects on *Xenopus laevis* organ morphogenesis. **Journal of Environmental Sciences**, 22(9), 1305–1308. doi:10.1016/s1001-0742(09)60254-0

LI, K., WU, J.Q., JIANG, L.L., SHEN, L.Z., LI, J.Y., HE, Z.H., WEI, P., LV, Z. HE, M.F. 2017. Developmental toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in zebrafish embryos. **Chemosphere**, 171, 40-48. . doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.032

KEARNS, J. P., WELLBORN, L. S., SUMMERS, R. S., KNAPPE, D. R. U. 2014. 2,4-D adsorption to biochars: Effect of preparation conditions on equilibrium adsorption capacity and comparison with commercial activated carbon literature data. **Water Research**, 62, 20–28. doi:10.1016/j.watres.2014.05.023

KEGLEY, S.E.; HILL, B.R.; ORME, S.; CHOI, A.H. 2010. **Pan Pesticide Database**. Pesticide Action Network, North America, Disponível em: <http://www.pesticideinfo.org>. Acesso: 10 jan 2020

KILJANEK, T., NIEWIADOWSKA, A., SEMENIUK, S., GAWEL, M., BORZECKA, M., POSYNIK, A. 2016. Multi-residue method for the determination of pesticides and pesticide metabolites in honeybees by liquid and gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry—Honeybee poisoning incidents. **Journal of Chromatography A**, 1435, 100–114. doi:10.1016/j.chroma.2016.01.045

MACAGNAN N. 2018. **Avaliação dos efeitos letais e subletais dos inseticidas cipermetrina e fipronil em girinos de *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae)**. 2018. 87 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Federal da Fronteira Sul, Erechim.

MACAGNAN, N., RUTKOSKI, C. F., KOLCENTI, C., VANZETTO, G. V., MACAGNAN, L. P., STURZA, P. F., HARTMANN, P. A., HARTMANN, M. T. 2017. Toxicity of cypermethrin and deltamethrin insecticides on embryos and larvae of *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae). **Environmental Science and Pollution Research**, 24 (25), 20699-20704. doi.org/10.1007/s11356-017-9727-5.

MARCATO, A. C. C. 2014. **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. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro. Rio Claro – São Paulo.

MARCATO A.C.C., SOUZA C.P., FONTANETTI C.S. 2017. Herbicide 2,4-D: A Review of Toxicity on Non-Target Organisms. **Water Air Soil Pollut**, 228:120. doi 10.1007/s11270-017-3301-0

MARGARIDO, T. C. S.; FELÍCIO, A. A.; ROSSA-FERES, D. C.; ALMEIDA, E. A. 2013. Biochemical biomarkers in *Scinax fuscovarius* tadpoles exposed to a commercial formulation of the pesticide fipronil. **Marine Environmental Research**, 91, 61–67. doi:10.1016/j.marenvres.2013.02.001

MESAK, C., DE OLIVEIRA MENDES, B., DE OLIVEIRA FERREIRA, R., MALAFAIA G. 2018. Mutagenic assessment of *Lithobates catesbeianus* tadpoles exposed to the 2, 4-D herbicide in a simulated realistic scenario. **Environ Sci Pollut Res**, 25: 15235. doi:10.1007/s11356-018-1979-1

MIJARES, A., RODRIGUES, M. T., BALDO, D. 2010. *Physalaemus cuvieri*. The IUCN Red List of Threatened Species: Disponível em: <https://www.iucnredlist.org/species/57250/11609155>. Acesso 10 jan de 2020.

MOUNTASSIF, D., KABINE, M., KARIMA MOUNCHID, MOUNAJI, K., LATRUFFE, N., EL KEBBAJ, M. S. 2008. Biochemical and histological alterations of cellular metabolism

from jerboa (*Jaculus orientalis*) by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid: Effects on d-3-hydroxybutyrate dehydrogenase. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 90(2), 87–96. doi:10.1016/j.pestbp.2007.08.001

PELTZER, P. M., JUNGES, C. M., ATTADEMO, A. M., BASSÓ, A., GRENÓN, P., LAJMANOVICH, R. C. 2013. Cholinesterase activities and behavioral changes in *Hypsiboas pulchellus* (Anura: Hylidae) tadpoles exposed to glufosinate ammonium herbicide. **Ecotoxicology**. 22(7), 1165–1173. doi:10.1007/s10646-013-1103-8

PÉREZ-IGLESIAS, J. M., FRANCO-BELUSSI, L., MORENO, L., TRIPOLE, S., DE OLIVEIRA, C., NATALE, G. S. 2016. Effects of glyphosate on hepatic tissue evaluating melanomacrophages and erythrocytes responses in neotropical anuran *Leptodactylus latinasus*. **Environmental Science and Pollution Research**, 23(10), 9852–9861. doi:10.1007/s11356-016-6153-z

PÉREZ-IGLESIAS, J. M., SOLONESKI, S., NIKOLOFF, N., NATALE, G. S., LARRAMENDY, M. L. 2015. 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**, 119, 15–24. doi:10.1016/j.ecoenv.2015.04.045

PINHEIRO, A., SILVA, M. R., KRAISCH, R. 2010. Presença de pesticidas em águas superficiais e subterrâneas na bacia do Itajaí, SC. **Revista de Gestão de Água da América Latina**, 7 (2), 17-26. doi.org/10.21168/reg.v7n2.p17-26.

POLLO, F.E.; GRENAT, P.R.; OTERO, M.A.; BABINI, S.; SALAS, N.E.; MARTINO, A.L. 2019. Evaluation *in situ* of genotoxic and cytotoxic response in the diploid/polyploid complex *Odontophrynus* (Anura: Odontophrynidae) inhabiting agroecosystems. **Chemosphere**, 216, 306-312. doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.149.

RUTKOSKI, C.F. 2019. **Toxicidade de três inseticidas em vertebrado não-alvo, usando como modelo *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae)**. 2019, 97 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Federal da Fronteira Sul, Erechim.

RUTKOSKI, C. F., MACAGNAN, N., FOLADOR, A., SKOVRONSKI, V. J., DO AMARAL, A. M. B., LEITEMPERGER, J., COSTA M. D., HARTMANN P. A. MÜLLER C., LORO V. L., HARTMANN M. T. 2020. Morphological and biochemical traits and mortality in *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae) tadpoles exposed to the insecticide chlorpyrifos. **Chemosphere**, 250:126162. doi: 10.1016 / j.chemosphere.2020.126162.

RUTKOSKI, C. F., MACAGNAN, N., KOLCENTI, C., VANZETTO, G. V., STURZA, P. F., HARTMANN, P. A., HARTMANN, M. T. 2018. Lethal and sublethal effects of the herbicide atrazine in the Early Stages of development of *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, **74** (4), 587-593. doi: 10.1007/s00244-017-0501-y.

SCHUCH, A. P., LIPINSKI, V. M., SANTOS, M. B., SANTOS, C. P., JARDIM, S. S., CECHIN, S. Z., LORETO, E. L. S. 2015. Molecular and sensory mechanisms to mitigate sunlight-induced DNA damage in treefrog tadpoles. **Journal of Experimental Biology**, **218**(19), 3059–3067. doi:10.1242/jeb.126672

SHUMAN-GOODIER, M. E., PROPPER, C. R. 2016. A meta-analysis synthesizing the effects of pesticides on swim speed and activity of aquatic vertebrates. **Science of The Total Environment**, **565**, 758–766. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.04.205

SLABY S, MARIN M, MARCHAND G, LEMIERE S. 2019. Exposures to chemical contaminants: What can we learn from reproduction and development endpoints in the amphibian toxicology literature? **Environ Pollut**, **248**:478-495. doi: 10.1016/j.envpol.2019.02.014.

SOUZA K.B. 2014. **Avaliação da remoção do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) pelo sistema convencional de tratamento de água e pelo processo de nanofiltração**. 2014. 150f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental). Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória.

SPARLING, D. W., LINDER, G., BISHOP, C. A., KREST S. 2010. **Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles**. Pensacola, Florida: Society of Environmental Toxixology and Chemistry Press.

TOLLEDO J.,SILVA E.T.,NUNES-DE-ALMEIDA C.H.,TOLEDO L.F. L. 2014.Anomalous tadpoles in a Brazilian oceanic archipelago: implications of oral anomalies on foraging behaviour, food intake and metamorphosis Herpetological Society. **The Herpetological Journal**, **24**(4), p.237-243.

USEPA. 1998. United States Environmental Protection Agency. **Guidelines for ecological risk assessment**. Washington, Disponível em: <<https://clu-in.org/download/contaminantfocus/sediments/ECOTXTBX.PDF>>. Acesso em: 3 julho 2019.

VASCONCELOS, A. M. 2014.**Avaliação dos efeitos do agrotóxico Vertimec® 18CE sobre girinos de *Lithobates catesbeianus* (Amphibia, Anura, Ranidae)**. 2014. 149 f. Tese

(Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental). – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

VEIGA, M. M., SILVA, D. M., VEIGA, L. B. E., FARIA, M. V. DE C. 2006. Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, 22(11), 2391–2399. doi:10.1590/s0102-311x2006001100013

WAFAT., CHAIEB IKBAL C., MOHAMED H. 2011. Environmental fate and effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic herbicide **Herbicides: Properties, Crop Protection and Environmental Hazards**. v. 4, p. 161-187.

WAGNER, N., ZÜGHART, W., MINGO, V., LÖTTERS, S. 2014. Are deformation rates of anuran developmental stages suitable indicators for environmental pollution? Possibilities and limitations. **Ecological Indicators**, 45, 394–401. doi:10.1016/j.ecolind.2014.04.039

WIDDER, P. D., BIDWELL, J. R. 2006. Cholinesterase activity and behavior in chlorpyrifos-exposed *Rana sphenoccephala* tadpoles. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 25(9), 2446. doi:10.1897/05-522r.1

WRUBLESWSKI, J., REICHERT JR, F.W., GALON, L., HARTMANN, P.A., HARTMANN, M. T. 2018. Acute and chronic toxicity os pesticides on tadpoles of *Physalaemus curvieri* (Anura, Leptodactylidae). **Ecotoxicology**, 27 (3), 369-368. doi.org/10.1007/s10646-018-1900-1

2,4-D: Fact Sheet. Disponível em: <http://npic.orst.edu/factsheets/archive/2,4-DTech.html>. Acesso em: 19 dez 2019.

MATERIAL SUPLEMENTAR

TABELA 1: Malformações observadas em girinos de *Physalaemus cuvieri* expostas a formulação comercial de 2,4-D após 168 horas. O número das malformações é maior que o número de girinos analisados pois alguns indivíduos apresentaram mais de um tipo de malformação.

| Concentração ($\mu\text{g a.e.L}^{-1}$) | Nº de girinos analisados | Boca | Intestino | Cauda | Edema | Nº total de malformações | Nº e % de girinos com malformações |
|--|-----------------------------|------|-----------|-------|-------|-----------------------------|--|
| 0 | 50 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | 56 | 0 | 10 | 1 | 0 | 11 | 11 (19,6) |
| 30 | 54 | 0 | 3 | 6 | 2 | 11 | 11 (20,3) |
| 52,5 | 46 | 0 | 10 | 0 | 2 | 12 | 11 (23,9) |
| 75 | 43 | 0 | 8 | 1 | 0 | 9 | 9 (20,9) |
| 100 | 41 | 25* | 17* | 0 | 4 | 46 * | 25 (60,9)* |

* significativo em relação ao controle.

Fonte: Elaborada pela autora, 2020.

TABELA 2: Média \pm desvio padrão (mínimo e máximo) de alterações nucleares de eritrócitos (ANEs) em girinos de *Physalaemus cuvieri*, encontradas no controle e em diferentes concentrações, após exposição a formulação comercial do herbicida 2,4-D pelo período de 168 horas.

| ANE | CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{g a.e.L}^{-1}$) | | | | | |
|-------------------------------------|---|-------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | Controle | 4 | 30 | 52,5 | 75 | 100 |
| Apoptose | 0 | 0,4 \pm 0,97 (0-3) | 0,1 \pm 0,32 (0-1) | 0,6 \pm 0,70 (0-2) | 0,1 \pm 0,32 (0-1) | 0 |
| Binucleada | 0 | 0,2 \pm 0,63 (0-2) | 0 | 0,2 \pm 0,42 (0-1) | 0 | 0 |
| Bolha | 0,3 \pm 0,48 (0-1) | 2,1 \pm 1,45 (0-4) | 1,4 \pm 1,35 (0-4) | 4,7 \pm 2,06 (2-9)* | 5,4 \pm 2,32 (2-10)* | 10,5 \pm 3,57 (4-16)* |
| Cariólise | 0 | 0 | 0,1 \pm 0,32 (0-1) | 0,4 \pm 0,70 (0-2) | 0,1 \pm 0,32 (0-1) | 0,2 \pm 0,63 (0-2) |
| Entalhada | 2 \pm 2,79 (0-9) | 4,9 \pm 3,81 (0-11) | 28,9 \pm 16,29 (14-60)* | 35,6 \pm 13,28 (9-54)* | 42,4 \pm 10,93 (25-66)* | 65,9 \pm 10,13 (51-86)* |
| Lobada | 9,7 \pm 10,02 (2-35) | 17,4 \pm 5,58 (10-30) | 22 \pm 20,52 (4-69) | 48,9 \pm 23,24 (5-87)* | 28,8 \pm 6,44 (16-37)* | 58,6 \pm 14,65 (37-80)* |
| Microcitose | 0 | 0,4 \pm 0,97 (0-3) | 0,6 \pm 0,97 (0-2) | 1,5 \pm 0,97 (0-3)* | 0,1 \pm 0,32 (0-1) | 0,7 \pm 0,82 (0-2) |
| Vacuolizada | 0 | 0 | 0,1 \pm 0,32 (0-1) | 0 | 0 | 0 |
| Número de Células Analisadas | 10.321 | 10.065 | 10.229 | 10.172 | 10.049 | 10.076 |
| Total de ANE (%) | 1,16 | 2,52 | 5,20 | 9,03 | 7,65 | 13,48 |

*Significativo em relação ao controle pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborada pela autora, 2020.

TABELA 3: Anova e teste Dunnett para cada alteração nucleares eritrocitária em girinos de *Physalaemus cuvieri* expostos a formulação comercial do herbicida 2,4-D (4-100 $\mu\text{g a.e.L}^{-1}$).

| ANE | Valor de F | Valor de p (Anova) | Valor de p (Dunnett) | Significativo para as concentrações |
|-------------|------------------|--------------------|----------------------|-------------------------------------|
| Apoptose | $F_{5,54}=2,22$ | $p=0,07$ | - | - |
| Binucleada | $F_{5,54}=1,11$ | $p=0,37$ | - | - |
| Bolha | $F_{5,54}=31,14$ | $p<0,01$ | $p<0,01$ | 52,5, 75 e 100 |
| Cariolise | $F_{5,54}=1,24$ | $p=1,24$ | - | - |
| Entalhada | $F_{5,54}=50,53$ | $p<0,01$ | $p<0,01$ | 30, 52,5, 75 e 100 |
| Lobada | $F_{5,54}=16,07$ | $p<0,01$ | $p<0,05$ | 52,5, 75 e 100 |
| Microcitose | $F_{5,54}=4,87$ | $p<0,01$ | $p<0,01$ | 52,5 |
| Vacuolizada | $F_{5,54}=1,00$ | $p=0,43$ | - | - |

Fonte: Elaborado pela autora, 2020.