



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

ALEXANDRE FOLADOR

EFEITOS TÓXICOS DE CONCENTRAÇÕES AMBIENTALMENTE
RELEVANTES DOS HERBICIDAS 2,4-D E IMAZETAPIR EM GIRINOS DE
PHYSALAEMUS CUVIERI

ERECHIM, RS

2024

ALEXANDRE FOLADOR

**EFEITOS TÓXICOS DE CONCENTRAÇÕES AMBIENTALMENTE
RELEVANTES DOS HERBICIDAS 2,4-D E IMAZETAPIR EM GIRINOS DE
*PHYSALAEMUS CUVIERI***

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

Orientador (a): Prof. Dra. Marilia Hartmann

Mestrando: Alexandre Folador

Erechim, RS

2024

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Folador, Alexandre

EFEITOS TÓXICOS DE CONCENTRAÇÕES AMBIENTALMENTE RELEVANTES DOS HERBICIDAS 2,4-D E IMAZETAPIR EM GIRINOS DE PHYSALAEMUS CUVIERI: EFEITOS TÓXICOS DE CONCENTRAÇÕES AMBIENTALMENTE RELEVANTES DOS HERBICIDAS 2,4-D E IMAZETAPIR EM GIRINOS DE PHYSALAEMUS CUVIERI / Alexandre Folador. -- 2024.

65 f.

Orientadora: Doutora Marília Teresinha Hartmann

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Erechim,RS, 2024.

1. Anura, Ecotoxicologia, Genotoxicidade, Agrotóxicos. I. Hartmann, Marília Teresinha, orient. II. Universidade Federal da Fronteira Sul. III. Título.

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

ALEXANDRE FOLADOR

**TÍTULO: EFEITOS TÓXICOS DE CONCENTRAÇÕES AMBIENTALMENTE
RELEVANTES DOS HERBICIDAS 2,4-D E IMAZETAPIR EM GIRINOS DE
PHYSALAEMUS CUVIERI**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental.

Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em 14/02/2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Marília Hartmann – UFFS
Orientadora

Prof.^a Dr.^a Raquel Aparecida Mendes Lima – IFTO
Avaliador

Prof.^a Dr.^a Aline Pompermaier – UFFS
Avaliador

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Marília Hartmann pelos conhecimentos transmitidos, pela oportunidade de desenvolver esta pesquisa no laboratório de Ecologia e Conservação e por toda orientação e amizade ao longo destes anos.

Aos colegas do laboratório de Ecologia e Conservação, especialmente ao Guilherme e a Bruna, por toda ajuda nos experimentos.

A minha família por todo incentivo.

Aos professores do PPGCTA por todos os conhecimentos transmitidos.

Aos técnicos de laboratório pela disposição em ajudar sempre.

Ao PPGCTA e a UFFS pelo apoio e infraestrutura disponibilizados.

A todos que de alguma forma contribuíram para esta conquista, muito obrigado!

RESUMO

A presença de resíduos de agrotóxicos em ambientes aquáticos é preocupante devido a possibilidade de causarem efeitos adversos na biota aquática. O Brasil é um dos maiores consumidores de agrotóxicos no mundo em função do seu potencial agrícola e de produção de alimentos e, devido a isso, resíduos dos agrotóxicos podem atingir o habitat de anfíbios e causar efeitos prejudiciais a esses organismos. Dentre os agrotóxicos, os herbicidas 2,4-D e imazetapir destacam-se pelo seu amplo uso. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade subletal de uma formulação comercial de 2,4-D e imazetapir em girinos de *Physalaemus cuvieri*. Para ambos os herbicidas, os girinos foram expostos durante 14 dias a concentrações ambientalmente relevantes. Os animais foram expostos a 0, 1, 7, 21, 35 e 50 µg/L de 2,4-D e 0, 1, 13, 57, 100, 200, 300 e 400 µg/L de Imazetapir. A sobrevivência e a atividade natatória foram monitoradas durante todo o período experimental. Parâmetros de crescimento foram medidos no início e no final do experimento. Ao final do ensaio, os girinos foram observados quanto a ocorrência de anormalidades morfológicas na boca, intestino, cauda e, também foram feitos esfregaços sanguíneos para avaliar o potencial genotóxico dos herbicidas. Além disso, foi calculado o coeficiente de risco ecológico, a fim de determinar o potencial risco desses dois herbicidas para espécies não alvo. Os girinos expostos aos dois herbicidas apresentaram perda de peso, alterações na boca e no intestino, assim como alterações nucleares eritrocitárias e micronúcleo. Nenhum composto causou alterações morfológicas e na atividade natatória dos animais, no entanto, ambos herbicidas causaram genotoxicidade e risco crônico aos girinos de *P. cuvieri*. Com isso, conclui-se que as formulações estudadas apresentam toxicidade subletal e cito-genotoxicidade em concentrações que podem ocorrer na natureza e afetar a saúde de *P. cuvieri*.

Palavras-chave: Anura, Ecotoxicologia, Genotoxicidade, Agrotóxicos

ABSTRACT

The presence of pesticide residues in aquatic environments is of concern due to the possibility of causing adverse effects on aquatic biota. Brazil is one of the largest consumers of pesticides in the world due to its agricultural and food production potential and due to this, pesticide residues can reach amphibian habitats and cause harmful effects to these organisms. Among pesticides, the herbicides 2,4-D and imazethapyr stand out for their wide use. Therefore, the objective of this work was to evaluate the sublethal toxicity of a commercial formulation of 2,4-D and imazethapyr in *Physalaemus cuvieri* tadpoles. For both herbicides, tadpoles were exposed for 14 days to environmentally relevant concentrations. Animals were exposed to 0, 1, 7, 21, 35 and 50 µg/L of 2,4-D and 0, 1, 13, 57, 100, 200, 300 and 400 µg/L of Imazetapyr. Survival and swimming activity were monitored throughout the experimental period. Growth parameters were measured at the beginning and end of the experiment. At the end of the test, the tadpoles were observed for the occurrence of morphological abnormalities in the mouth, intestine, tail and blood smears were also taken to evaluate the genotoxic potential of the herbicides. Furthermore, the ecological risk coefficient was calculated in order to determine the potential risk of these two herbicides to non-target species. Tadpoles exposed to the two herbicides showed weight loss, changes in the mouth and intestine, as well as erythrocyte nuclear and micronucleus changes. Neither compound caused morphological changes or changes in the swimming activity of the animals, however, both herbicides caused genotoxicity and chronic risk to *P. cuvieri* tadpoles. Therefore, it is concluded that the formulations studied present sublethal toxicity and cytogenotoxicity at concentrations that can occur in nature and affect the health of *P. cuvieri*.

Keywords: Anura, Ecotoxicology, Genotoxicity, Pesticides.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	8
1. INTRODUÇÃO GERAL	9
2. OBJETIVOS	11
2.1 Objetivo Geral	11
2.2 Objetivos Específicos	11
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
3.1 Agrotóxicos	11
3.2 Anfíbios	15
3.3 Anfíbios como organismos modelo e biomarcadores de toxicidade ecotoxicológicos.....	16
REFERÊNCIAS.....	18
CAPÍTULO 1 - TOXICIDADE DE CONCENTRAÇÕES AMBIENTALMENTE RELEVANTES DE UMA FORMULAÇÃO COMERCIAL DE 2,4-D EM GIRINOS DE <i>PHYSALAEMUS CUVIERI</i>	26
1. Introdução	27
2. Metodologia	28
2.1 Organismo modelo	28
2.2 Composto testado	29
2.3 Design experimental.....	29
2.4 Mortalidade, tamanho do corpo, crescimento e alterações morfológicas.....	30
2.5 Atividade natatória.....	30
2.6 Anormalidades nucleares	31
2.7 Análises Estatísticas e de Risco Ecológico.....	31
3. Resultados	32
3.1 Mortalidade, tamanho do corpo, crescimento e alterações morfológicas.....	32
3.2 Atividade natatória.....	34
3.3 Análise de anormalidades eritrocitárias (ANEs) e micronúcleo.....	35
3.4 Risco ecológico	37
4. Discussão	37
5. Conclusão	39
REFERÊNCIAS	40

CAPÍTULO 2 – HERBICIDA IMAZETAPIR É CITOTÓXICO E CAUSA DIMINUIÇÃO DE PESO EM GIRINOS DE <i>PHYSALAEMUS CUIVERI</i>	45
1. Introdução	46
2.1 Organismo modelo	47
2.2 Agrotóxico	48
1.3 Design experimental	48
2.4 Sobrevivência, morfologia e crescimento	49
2.5 Atividade natatória	49
2.6 Anormalidades nucleares	50
2.7 Análise estatística e Análise de Risco Ecológico	50
2. Resultados	51
3.1 Efeitos na sobrevivência, morfologia e tamanho do corpo	51
3.2 Atividade natatória.....	52
2.3 Análise de anormalidades eritrocitárias (ANEs) e micronúcleo	53
3.4 Risco ecológico	55
3. Discussão	55
4. Conclusão	57
REFERÊNCIAS	58

APRESENTAÇÃO

A dissertação está dividida em introdução geral, referencial teórico e possui dois capítulos no formato de artigo científico. O primeiro capítulo aborda os efeitos de uma formulação comercial de 2,4-D e o segundo de uma formulação comercial de imazetapir em girinos de *Physalaemus cuvieri*. Após a introdução geral e o referencial teórico foram apresentadas as referências bibliográficas utilizadas, no formato da norma da ABNT vigente. Para os capítulos, as referências bibliográficas estão elaboradas de acordo com os requisitos da revista a serem submetidos.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é um dos maiores produtores de grãos e um dos quatro maiores consumidores de agrotóxicos do mundo (Santos et al., 2022). Os agrotóxicos são utilizados por exemplo para o controle de insetos e plantas invasoras na agricultura e podem ser tóxicos para outros organismos não alvo (Tudi et al., 2021). Devido ao intenso uso, essas substâncias químicas ameaçam a qualidade dos ecossistemas (Dehnert et al., 2021), sendo, atualmente, um dos principais contaminantes do meio ambiente (Santos et al., 2022).

Os agrotóxicos podem ser dispersos por todo o ambiente através da deriva, lixiviação ou escoamento, e podem atingir os recursos hídricos (Pérez-Iglesias et al. 2020; Monticelli Barizon et al., 2023). No Brasil, já foram demonstrados vários resíduos de agrotóxicos em águas superficiais, e que existe risco potencial à vida aquática para pelo menos 59% deles (Albuquerque et al., 2016). Ou seja, cada vez mais aumentam as evidências de que agrotóxicos têm efeitos ecológicos prejudiciais sobre a biota, principalmente em paisagens agrícolas (Brühl; Zaller, 2019). Organismos não-alvo, incluindo peixes, anfíbios, moluscos, crustáceos, diatomáceas e biofilmes, podem absorver e responder a compostos tóxicos de inúmeras formas, dependendo das características físico-químicas do composto, da fonte e da suscetibilidade individual da espécie (Stanley et al., 2016).

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, tornando-os espécies modelo em estudos de contaminação ambiental (exemplos: Margarido et al., 2013; Macagnan et al., 2017; Rutkoski et al., 2018; Wrubleswski et al., 2018). Existem muitas razões para estudos ecotoxicológicos serem realizados com anfíbios, especialmente para avaliar o efeito de agrotóxicos. Os efeitos causados por agrotóxicos em girinos podem comprometer a viabilidade de populações, assim impactando de forma negativa, já que os anuros são um grupo ameaçado com declínio em todo mundo (Agostini et al., 2020). Esse grupo está diminuindo drasticamente, com mais de um terço de todas as espécies conhecidas (~7.000) ameaçadas de extinção, e a perda desta biodiversidade pode representar uma ameaça crescente à saúde global (Bishop et al., 2012; Kolby, 2018). Além disso, a maioria das espécies de anfíbios é ecologicamente incomparável entre os vertebrados, pois passam parte de sua vida inicial na água, enquanto nos estágios

posteriores (adultos) estão em terra, e por possuírem pele permeável, pode ocorrer maior absorção de substâncias tóxicas (Bradford et al., 2011; Gonçalves et al., 2014). Conseqüentemente, esses organismos enfrentam um risco de contaminação com agrotóxicos tanto no meio aquático quanto no terrestre.

Um dos agrotóxicos que pode contaminar o meio aquático é o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) que foi sintetizado pela primeira vez no ano de 1941 e atualmente é um herbicida bastante utilizado para controle de plantas daninhas de folhas largas (Gaaied et al., 2022) em culturas de trigo, milho, algodão, tabaco e soja (Freitas et al., 2019), além de cana-de-açúcar e arroz (Viriato et al., 2020). Atualmente, o 2,4-D é empregado na confecção de diversas formulações comerciais amplamente utilizadas no mundo (Curi et al. 2019). Devido a vasta utilização, esse herbicida já foi encontrado em águas superficiais em várias partes do mundo, como na Argentina (100 µg/L; Agostini et al., 2020), Brasil (75 µg/L; Pinheiro et al., 2010; 90 µg/L; De Castro Lima et al., 2020) e México (0,038 µg/L; Félix–Cañedo et al., 2013).

Além do 2,4-D, o imazetapir é outro herbicida bastante utilizado no Brasil, empregado para o controle de plantas daninhas em culturas de trigo, cevada, alfafa e soja, sendo que especificamente na cultura de soja é utilizado como alternativa para controle de plantas daninhas resistentes ao glifosato (Soloneski et al., 2017). Os estudos de monitoramento das concentrações deste composto no ambiente aquático são mais escassos que para o 2,4-D, mas, já foi demonstrada sua ocorrência em águas superficiais no Brasil (6,54 µg/L; Almeida et al., 2019), Canadá (0,011 µg/L; Donald et al., 2007) e Estados Unidos (0,689 µg/L; Battaglin et al., 2000).

Existem poucos estudos avaliando a toxicidade de formulações comerciais destes dois agrotóxicos em anfíbios (Santos et al., 2024; Pavan et al., 2021; Carvalho et al., 2019). Além disso, ambos os agrotóxicos foram detectados em córregos próximos e no entorno do Parque Natural Municipal de Sertão (dados não publicados), localizado no município de Sertão, no estado do Rio Grande do Sul – Brasil, o que é preocupante pois podem afetar a saúde destes animais. O plano de manejo (PNM Sertão) estabelece que:

O Parque Natural Municipal de Sertão – PNM Sertão está incluído no Sistema Estadual de Unidades de Conservação – SEUC (Decreto Municipal nº 027 de 06 de agosto de 1998) e integra o Sistema Nacional de Unidades de Conservação – SNUC desde 2011 (Lei Municipal nº 1.974 de 31 de outubro de 2011). Categorizada como Unidade de Conservação (UC) de Proteção Integral, possui como objetivo primordial a conservação da natureza, sendo admitido apenas o uso indireto dos seus recursos naturais, com exceção dos casos previstos em Lei (Capítulo III, Artigo 7º, § 1º do SNUC).

Como os estudos com concentrações ambientalmente relevantes de agrotóxicos também são escassos (Albuquerque et al., 2016), faz-se necessária a realização de estudos avaliando o efeito de concentrações realísticas de 2,4-D e imazetapir, visto que, diversos organismos não-alvo, como os anfíbios, podem ser expostos e ter seu desenvolvimento e sobrevivência afetados no meio em que vivem.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos tóxicos de concentrações ambientalmente relevantes de formulações comerciais dos herbicidas 2,4-D e imazetapir em girinos de *Physalaemus cuvieri*.

2.2 Objetivos Específicos

- Verificar a sobrevivência de girinos *Physalaemus cuvieri* expostos a concentrações sub-letais de 2,4-D e imazetapir;
- Avaliar a ocorrência de possíveis alterações morfológicas após a exposição crônica dos girinos *Physalaemus cuvieri* ao 2,4-D e imazetapir;
- Avaliar a ocorrência de alterações na atividade natatória de girinos de *Physalaemus cuvieri* expostos ao 2,4-D e imazetapir;
- Determinar a existência ou não da indução de micronúcleos e anormalidades nucleares eritrocitárias nos eritrócitos dos girinos após a exposição ao 2,4-D e imazetapir;
- Realizar a avaliação de risco ecológico do 2,4-D e imazetapir em *Physalaemus cuvieri*, com base nos efeitos tóxicos e genotóxicos de cada agrotóxico testado.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Agrotóxicos

De acordo com o Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), no Brasil são utilizados 325 diferentes ingredientes ativos de agrotóxicos e afins, que dão origem a 2854 produtos formulados (Agrofit, 2022). Os relatórios do Instituto

Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis mostram que somente em 2022 (últimos dados divulgados), foram vendidas 800,652 toneladas de ingredientes ativos de agrotóxicos no País (Ibama, 2022). Os agrotóxicos são percebidos como um grupo altamente regulamentado de produtos químicos em relação ao seu risco para o meio ambiente (Brühl; Zaller, 2019), no entanto cada vez mais estudos mostram a toxicidade desses compostos para organismos não alvo (Benli et al., 2007; Rutkoski et al., 2018; Pavan et al., 2021).

Segundo a lei 7.802/89 (Brasil, 1989) e decretos 10.833/2021, que alterou o Decreto 4.074/2002, os agrotóxicos são definidos como:

Os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos.

Os agrotóxicos são classificados de I a V (Tabela 1), segundo as normas de regulamentação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa, 2019). Para as classes também são atribuídas cores, sendo que os agrotóxicos da classe I e II são rotulados com a cor vermelha e considerados extremamente tóxicos e altamente tóxicos, respectivamente. Os agrotóxicos da classe III são representados pela cor amarela e classificados como medianamente tóxicos. Nas classes IV e V estão enquadrados os agrotóxicos rotulados pela cor azul e considerados pouco tóxico ou como produto improvável de causar dano agudo, respectivamente. Por fim, os agrotóxicos que apresentam a cor verde na embalagem são considerados como não classificados. Ou seja, quanto menor a classe, maior é seu nível toxicológico. Além disso, agrotóxicos cuja embalagem possui a cor vermelha apresentam elevada periculosidade ao meio ambiente e os que possuem a cor verde menor periculosidade.

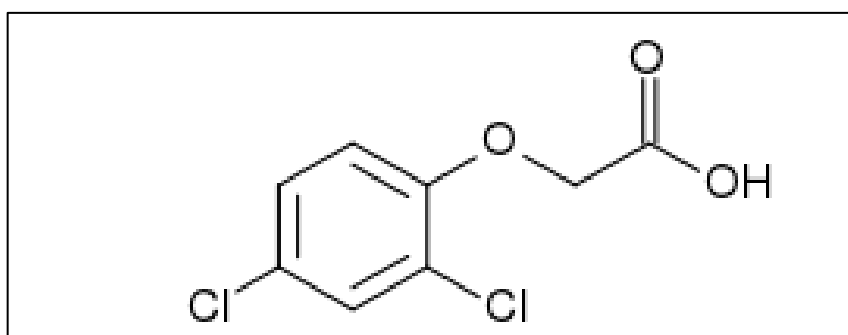
Tabela 1- Classificação toxicológica dos agrotóxicos segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2019)

Categoria de Classe	Nível Toxicológico	Cor referência
Classe I	Extremamente tóxico	Red
Classe II	Altamente Tóxico	
Classe III	Mediamente Tóxico	Yellow
Classe IV	Pouco Tóxico	Blue
Classe V	Produto Improvável de Causar Dano Agudo	
Não classificado	Produto Não Classificado	Green

Fonte: Anvisa (2019)

O herbicida 2,4-D enquadra-se como classe I, segundo a Anvisa (2019), sendo considerado extremamente tóxico ao meio ambiente. Seu uso está regulamentado no Brasil para culturas de algodão, arroz, aveia, cana-de-açúcar, café, centeio, cevada, citros, milho, trigo, soja, sorgo, pastagens, dentre outros (Anvisa, 2019). O 2,4-D está listado nos Relatórios de comercialização de agrotóxicos (Ibama, 2022), como o segundo agrotóxico mais vendido no Brasil, com 59098 toneladas de ingrediente ativo vendido, atrás somente do glifosato com 230519 toneladas. O 2,4-D, cuja molécula é $C_8H_6Cl_2O_3$ (Figura 1), consiste em um ácido, porém, é produzido na forma de sal inorgânico, amina ou éster e apresenta solubilidade em água (a 25°C) de 900 mg/L (Marcato et al., 2017). Seu ponto de fusão é de 140,5°C, com massa molar de 221,03 g/mol (Kennepohl; Munro, 2001). Também, possui tempo de meia vida no solo menor que 7 dias e em água de 7,5 dias (Castro, 2010). O coeficiente de partição octanol-água (k_{ow}) em pH mais elevado é de 0,028 e em pH mais baixo de 18,23, indicando que a bioacumulação pode ser afetada pelo pH (Marcato et al., 2017; Wang et al., 1994).

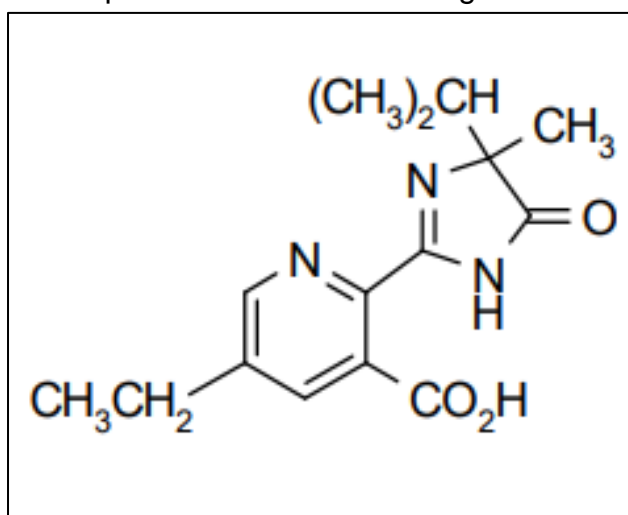
Figura 1- Estrutura química da molécula do Agrotóxico 2,4 D



Fonte: Anvisa, 2016.

O herbicida Imazetapir pertence ao grupo das imidazolinonas, é classificado como mediamente tóxico (classe III), e altamente móvel em solo, segundo a Anvisa (2019). No Brasil está permitido o uso deste composto em culturas de amendoim, arroz, ervilha, feijão, grão de bico, lentilha, soja, sorgo e pastagens (Anvisa, 2019). Não está entre os dez agrotóxicos mais vendidos em 2021, porém, teve uma comercialização de 203,81 toneladas de IA (Ibama, 2021). Sua molécula é $C_{12}H_{19}N_3O_3$ (Figura 2), com massa molecular de 289,3 g/mol, log de Kow de 1,04 (Schneider, 2013) e solubilidade em água de 1400 mg/L (20°C) (Chang et al., 2021). Apresenta tempo de meia vida na água de 1,6 a 6,2 dias (Santos et al., 2008) e de 90 dias em solo, além de possuir alto potencial de lixiviação (Gomes, 2008) pode ser utilizado como pré e pós emergente (Costa, 2018)

Figura 2- Estrutura química da molécula do agrotóxico Imazetapir.



Fonte: Schneider, 2013.

Nas plantas, o mecanismo de ação do 2,4-D inclui elevação da plasticidade da membrana celular, bem como da síntese de proteínas e etileno, o que acarreta na divisão celular descontrolada e efeitos prejudiciais ao tecido vascular (Usepa, 2005; Marcato et al., 2017). Além disso, tem efeito similar ao ácido auxina indolacético (IAA), componente natural em grande parte das plantas, porém, no caso do herbicida, ele promove um crescimento acelerado da planta, o que resulta em morte da planta-alvo (Marcato et al., 2017; Oruc; Sevgiler; Uner, 2004; Benli et al., 2007). Já o mecanismo de ação dos agrotóxicos do grupo das imidazolinonas baseia-se na inibição da enzima acetolactato sintase, o que provoca interrupção na síntese de proteínas e de DNA,

afetando o crescimento celular, até ocasionar a morte da planta daninha (Soloneski et al., 2017).

3.2 Anfíbios

Atualmente existem 8.714 espécies de anfíbios descritas no mundo, sendo 222 da ordem Gymnophiona (cecílias), 822 Caudata (salamandras) e 7.670 Anura (sapos, rãs e prerecas) (Frost, 2024). O Brasil possui a maior quantidade de espécies descritas, com mais de 1.185 espécies, sendo a maioria de anuros (1.144 espécies) seguidos por cecílias (39) e salamandras (5) (Segalla et al., 2021). No decorrer das últimas duas décadas, principalmente nos últimos anos, os anfíbios vêm sofrendo declínio, estando ameaçados de extinção em todo o mundo (Amphibiaweb, 2023). A destruição de habitats é o principal fator que contribui para a redução de espécies, destacando-se o desmatamento de florestas nativas e as mudanças climáticas (Amphibiaweb, 2023; Karlsson et al. 2021).

Além disso, os anfíbios estão sujeitos aos efeitos negativos dos agrotóxicos por possuírem a pele altamente permeável, o que facilita a troca de água, gases e eletrólitos com o meio ambiente (Brühl et al., 2013), com isso, são bastante vulneráveis a degradação ambiental e a qualidade da água (Amphibiaweb, 2023). Por possuírem tanto a fase de vida aquática como terrestre, podem ser contaminados mais facilmente, quando estão na fase aquática, por serem expostos a concentrações de agrotóxicos que atingem o ambiente aquático devido ao escoamento ou deriva da pulverização, enquanto que, na fase terrestre, podem entrar em contato com as aplicações diretas dos agrotóxicos (Brühl et al., 2013).

Os anfíbios são biologicamente únicos entre todos os vertebrados: são os únicos tetrápodes com embrião não protegido por uma cavidade amniótica e com larva nadadora (Shan et al, 2023). Conseqüentemente, esses organismos enfrentam um risco sem precedentes de contaminação com agrotóxicos tanto no meio aquático quanto no terrestre. O gênero *Physalaemus* (*P. nattereri*, *P. gracilis*, *P. albonotatus* e *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; Herek et al. 2020a, 2020b). A espécie *P. cuvieri*, possui rápido desenvolvimento aquático na fase larval (girinos), e apresenta uma ampla distribuição geográfica no território brasileiro.

Atualmente está classificada na Lista Vermelha como Menos Preocupantes (LC – Least-Concern) devido a sua ampla gama de habitats, sendo conhecida no Sul, Sudeste, Nordeste e Região Central do Brasil, além da Argentina, Paraguai e Uruguai (Borges-Martins, 2007; Mijares et al., 2010; Frost, 2022). Contudo, *P. cuvieri* está listada como localmente ameaçada na Argentina devido à alta contaminação por agrotóxicos, redução do habitat natural para promover a agricultura e extração de madeira (Mijares et al., 2010). Esta espécie deposita seus ovos próximos ou entre a vegetação, em massas de espuma que é produzido através do movimento realizado pelas pernas na água durante o amplexo (Barreto; Andrade, 1995). Estes ambientes são comumente associados às áreas de agricultura, o que pode facilitar a contaminação por agrotóxicos (Achaval; Olmos, 2003; Lenhardt et al. 2015).

3.3 Anfíbios como organismos modelo e biomarcadores de toxicidade ecotoxicológicos

A introdução de poluentes no ambiente acarreta a necessidade da avaliação dos seus efeitos na biota, a curto e longo prazo (Sisino; Oliveira-Filho, 2013). Ensaios de toxicidade são ferramentas que possibilitam essa avaliação e são complementares as análises químicas e físicas tradicionais, uma vez que essas não são capazes de avaliar o efeito de poluentes ambientais em organismos vivos (Costa et al., 2008). Além disso, os ensaios de toxicidade dividem-se em agudo e crônico, sendo que o agudo, objetiva determinar o efeito letal de dado composto em um curto período de tempo e o crônico, avaliar o efeito subletal em um período de tempo mais longo (Costa et al., 2008).

Atualmente, utilizam-se espécies padronizadas para realização de estudos ecotoxicológicos para avaliar a toxicidade de substâncias químicas (OECD, 2016). Essa avaliação de toxicidade pode ser realizada em uma grande variedade de organismos invertebrados e vertebrados (OECD, 2016). Em ambientes aquáticos, têm sido utilizados como organismos os moluscos, vermes bentônicos, esponjas, anfíbios e peixes (Silva, 2005). No caso dos anfíbios, as normas que padronizam os estudos são escassas e pouco difundidas, o que faz com que esses organismos sejam pouco utilizados, apesar de serem bons indicadores de qualidade ambiental (Vasconcelos, 2014; Gonçalves et. al, 2014).

Para avaliar o efeito das substâncias em organismos são utilizados biomarcadores que consistem em qualquer tipo de alteração bioquímica, fisiológica

ou morfológica possível de ser mensurada após a exposição do organismo a um composto tóxico (Islas-Flores et al., 2013). Alterações na atividade natatória e anomalias morfológicas como alterações na boca, intestino, cauda e ocorrência de edemas vem sendo utilizadas para avaliar os efeitos de agrotóxicos em anfíbios (Macagnan et al., 2017; Rutkoski et al., 2018; Wrubleswski et al., 2018; Herek et al. 2020a, 2020b; Pavan et al., 2021). Prejuízos na locomoção de girinos podem acarretar em maior susceptibilidade a predadores (Relyea, 2005), assim como os defeitos na formação da boca e intestino afetam a obtenção e absorção de alimentos, podendo comprometer a sobrevivência dos animais (Rutkoski et al., 2020).

Além disso, para verificar o efeito de poluentes ambientais em anfíbios o teste de micronúcleo vem sendo utilizado nos últimos anos como uma ferramenta para avaliar danos ao DNA (Benvindo-Souza et al., 2020). De acordo com Fenech et al (2020) as causas da formação de micronúcleos podem ser divididas em seis tipos: a) defeitos genéticos nas proteínas que afetam a mitose; b) exposição a genotoxinas químicas; c) exposição à radiação ionizante; d) defeitos genéticos em enzimas que atuam na reparação do DNA; e) geração excessiva de genotoxinas endógenas, provenientes de processos metabólicos; e f) falta de micronutrientes que são utilizados como cofatores durante a replicação e reparo do DNA.

Em estudos com anfíbios, outra análise complementar ao teste de micronúcleo utilizada é a avaliação de anormalidades nucleares eritrocitárias (ANEs) que também podem ocorrer durante o processo de divisão celular (Benvindo-Souza et al., 2020; Herek et al., 2021; Pavan et al., 2021). Os tipos mais comuns segundo Lajmanovich et al. (2015) são: (1) Apoptose: núcleos com fragmentação; (2) Célula Binucleada: células com dois núcleos; (3) Núcleo com Bolha: células que apresentam uma evaginação pequena da membrana nuclear, com aspecto de bolha encostada no núcleo; (4) Cariólise: apresenta somente o contorno do núcleo, sem material genético; (5) Núcleo Lobado: núcleo com vários lobos com evaginações que apresentam formato irregular; (6) Núcleo Entalhado: núcleos com uma pequena evaginação em forma de fenda bem definida, com formato similar a um rim; (7) Núcleo Vacuolizado: núcleos que apresentam uma pequena região sem material visível no seu interior; e (8) Anucleada: célula com ausência de núcleo.

Os efeitos toxicológicos de formulações comerciais de 2,4-D e imazetapir tem sido poucos estudados em girinos. Girinos de *Physalaemus albonotatus* expostos

ao 2,4-D apresentaram sobrevivência comprometida, alterações morfológicas na boca e no intestino, danos hepáticos e aceleração da metamorfose (Curi et al., 2019). Viriato et al (2020) demonstraram que o 2,4-D promoveu inibição do crescimento embrionário em *Lithobates catesbeianus* e Mesak et al. (2018) demonstraram aumento na frequência de micronúcleo e ANEs na mesma espécie exposta ao 2,4-D. Além disso, o efeito neurotóxico do 2,4-D através da inibição da enzima acetilcolinesterase foi relatado por Freitas et al. (2022) em girinos de *L. castesbeianus*. Para imazetapir, Pérez-Iglesias et al (2015) observaram efeitos na sobrevivência e genotoxicidade em girinos de *Hypsiboas pulchellus*. Efeitos similares com aumento de micronúcleo e/ou ANEs foram verificados em girinos de *Rhinella arenarum* (Carvalho et al., 2019) e em *Leptodactylus latinasus* (Pérez-Iglesias et al., 2020) expostos ao imazetapir. No entanto, devido a ampla variedade de formulações comerciais destes herbicidas, faz-se necessária a realização de mais estudos avaliando a toxicidade desses compostos em diferentes espécies de anfíbios.

REFERÊNCIAS

ACHAVAL, F., OLMOS, A.. Anfíbios y Reptiles del Uruguay. In: Achaval, F; Olmos, A. **Anfíbios y reptiles del Uruguay**, Facultad de Ciencias. Montevideo, Uruguay, 136 p., 2003.

AGOSTINI, M. G.; ROESLER, I.; BONETTO, C.; RONCO, A. E.; BILENCA, D.. Pesticides in the real world: the consequences of gmo-based intensive agriculture on native amphibians. **Biological Conservation**, v. 241, p. 1-8, 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2019.108355>.

AGROFIT. 2022. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Brazilian Ministry of Agriculture**, Livestock and Farm Supplies. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em 25 de março 2022.

ALBUQUERQUE, A. F. et al. Pesticides in Brazilian freshwaters: a critical review. **Environmental Science: Processes & Impacts**, v. 18, n. 7, p. 779-787, 2016. <https://doi.org/10.1039/C6EM00268D>

AMPHIBIAWEB. **Species List**. 2023. Disponível em: <https://amphibiaweb.org/about/index.html>. Acesso em: 17 ago 2023

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Publicada reclassificação toxicológica de agrotóxicos**. 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2019/publicada-reclassificacao-toxicologica-de>

agrotoxicos#:~:text=Categoria%20%20E2%80%93%20Produto%20Extremament e%20T%C3%B3xico,T%C3%B3xico%20%20E2%80%93%20faixa%20azul%3A%2059 9. Acesso em: 03 mar. 2023.

ASSMANN, B.; DARIVA, G. ; MARINHO, J. R. . Amphibian anurans of an araucarian rainforest in southern Brazil. **Perspectiva**, v. 37, p. 133, 2013.

BARRETO, L.; ANDRADE, G.V. Aspects of the reproductive biology of *Physalaemus Cuvieri* (Anura: Leptodactylidae) in northeastern Brazil. **Amphibia – Reptilia**, v. 16, p. 67-76, 1995. 10.1163/156853895X00208.

BENLI, A. Ç. K.; SARdKAYA, R.; SEPICI-DINCEL, A.; SELVI, M.; ŞAHIN, D.; ERKOÇ, F.. Investigation of acute toxicity of (2,4-dichlorophenoxy)acetic acid (2,4-D) herbicide on crayfish (*Astacus leptodactylus* Esch. 1823). **Pesticide Biochemistry And Physiology**, v. 88, n. 3, p. 296-299, 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2007.01.004>.

BENVINDO-SOUZA, M.; OLIVEIRA, E. A. S.; ASSIS, R. A.; SANTOS, C. G. A.; BORGES, R. E.; SILVA, D.M.; SANTOS, L. R. S. Micronucleus test in tadpole erythrocytes: trends in studies and new paths. **Chemosphere**, v. 240, p. 1-7, 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124910>.

BISHOP et al. The Amphibian Extinction Crisis - what will it take to put the action into the Amphibian Conservation Action Plan? **Journals Open Edition**, v. 5, n. 2., 2012. Disponível: <https://journals.openedition.org/sapiens/1406>. Acesso: 03 jul. 2023.

BOMBARDI, L. M. **Geografia do Uso de Agrotóxicos no Brasil e Conexões com a União Europeia**. São Paulo: FFLCH - USP, 2017.

BORGES-MARTINS, M et al. **Anfíbios**. In: BECKER, F.G.; RAMOS, R.A.; MOURA, L.A. Biodiversidade: Regiões da Lagoa do Casamento e dos Butiazais de Tapes, Planície Costeira do Rio Grande do Sul. Brasília. p. 276 - 291. 2007.

BRADFORD, D.F. et al. Pesticide distributions and population declines of California, USA, alpine frogs, *Rana muscosa* and *Rana sierrae*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, n.3, p. 682–691, 2011. 10.1002/etc.425

Brasil. **Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989**. Brasília, 1989. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l7802.htm. Acesso em: 10 mar. 2023.

BRASIL. **Decreto nº 10.833, de 07 de outubro de 2021**. Altera o Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, que regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2021/decreto/d10833.htm. Acesso em: 24 de nov. 2023.

BRÜHL, C. A.; SCHMIDT, T.; PIEPER, S.; ALSCHER, A. Terrestrial pesticide exposure of amphibians: an underestimated cause of global decline?. **Scientific Reports**, v. 3, n. 1, p. 1-4, 2013. <http://dx.doi.org/10.1038/srep01135>.

BRÜHL, C. A.; ZALLER, J. G. Biodiversity Decline as a Consequence of an Inappropriate Environmental Risk Assessment of Pesticides. **Frontiers In Environmental Science**, v. 7, p. 1-4, 2019. <http://dx.doi.org/10.3389/fenvs.2019.00177>

CARVALHO, W. F.; ARCAUTE, C. R. de; PÉREZ-IGLESIAS, J. M.; LABORDE, M. R. R.; SOLONESKI, S.; LARRAMENDY, M. L. DNA damage exerted by mixtures of commercial formulations of glyphosate and imazethapyr herbicides in *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) tadpoles. **Ecotoxicology**, v. 28, n. 3, p. 367-377, 2019. <http://dx.doi.org/10.1007/s10646-019-02029-x>.

CASTRO, F. D. de. **Degradação do Ácido Diclorofenoxiacético (2,4-D) com Ozônio eletrogerado**. 2010. (Mestrado em Química) – Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia.

CHANG, Q.; JI, W. LU, Q.; XUE, J.; HUA, R.; WU, X.. Bioavailability and toxicity of imazethapyr in maize plant estimated by four chemical extraction techniques in different soils. **Science Of The Total Environment**, v. 801, p. 149594, 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149594>.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G.. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, [S.L.], v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008. <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422008000700038>.

CURI, L. M.; PELTZER, P. M.; SANDOVAL, M. T.; LAJMANOVICH, R. C. Acute Toxicity and Sublethal Effects Caused by a Commercial Herbicide Formulated with 2,4-D on *Physalaemus albonotatus* Tadpoles. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 230, n. 1, p. 1-15, 2019. <http://dx.doi.org/10.1007/s11270-018-4073-x>.

DAAM, M.A. et al. Lethal toxicity of the herbicides acetochlor, ametryn, glyphosate and metribuzin to tropical frog larvae. **Ecotoxicology**, v. 28, p. 707–715, 2019. [doi.org/10.1007/s10646-019-02067-5](http://dx.doi.org/10.1007/s10646-019-02067-5)

DE CASTRO LIMA, J. A. M. et al., “Modern agriculture” transfers many pesticides to watercourses: a case study of a representative rural catchment of southern Brazil. **Environmental Science And Pollution Research**, v. 27, n. 10, p. 10581-10598, 2020. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-019-06550-8>.

DEHNERT, G. K. et al. Impacts of subchronic exposure to a commercial 2,4-D herbicide on developmental stages of multiple freshwater fish species. **Chemosphere**, v. 263, p. 1-11, 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127638>.

DONALD, D. B.; CESSNA, A. J.; SVERKO, E.; GLOZIER, N. E.. Pesticides in Surface Drinking-Water Supplies of the Northern Great Plains. **Environmental Health Perspectives**, v. 115, n. 8, p. 1183-1191, 2007. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.9435>.

EGEA-SERRANO, A. MIRCO S. “Effects of Insecticides on a *Phytotelmata-Breeding* Amphibian: Malathion Impact on *Phyllodytes Luteolus*”. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 36, n. 2, p. 422–428, 2017. <https://doi.org/10.1002/etc.3555>

EL-NAHHAL, I.; EL-NAHHAL, Y. Pesticide residues in drinking water, their potential risk to human health and removal options. **Journal of Environmental Management**, v. 299, p. 1-31, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113611>

FÉLIX-CAÑEDO, T. E.; DURÁN-ÁLVAREZ, J. C.; JIMÉNEZ-CISNEROS, B. The occurrence and distribution of a group of organic micropollutants in Mexico City's water sources. **Science Of The Total Environment**, v. 454-455, p. 109-118, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.02.088>.

FENECH, M. Cytokinesis-Block Micronucleus Cytome Assay Evolution into a More Comprehensive Method to Measure Chromosomal Instability. **Genes**, v. 11, n. 10, p. 1-13, 2020. <http://dx.doi.org/10.3390/genes11101203>

FREITAS, J. S. et al. Effects of 2,4-D-based herbicide (DMA® 806) on sensitivity, respiration rates, energy reserves and behavior of tadpoles. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, v. 182, p. 1-12, 2019. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109446>.

FREITAS, J. S.; PINTO, T. J. da S.; YOSHII, M. P. C.; S., L. C. M. da; LOPES, L. F; P.; OGURA, A. P.; GIROTTO, L.; MONTAGNER, C. C.; ALHO, L.O. G.; GEBARA, R. C. Realistic exposure to fipronil, 2,4-D, vinasse and their mixtures impair larval amphibian physiology. **Environmental Pollution**, v. 299, p. 118894, 2022. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2022.118894>.

FREITAS, J.S. et al. 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**, v. 185, p. 548-562, 2017. doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.061

FROST D. **Amphibian species of the world**: an online reference. American Museum of Natural History, New York, 2021. Disponível em: <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia>. Acesso em: 06 jan. 2022.

FROST, D. **Amphibian Species of the World**: an Online Reference. 2024 Version 6.2 (Date of access). Electronic Database accessible at <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.php>. American Museum of Natural History, New York, USA. Disponível em: doi.org/10.5531/db.vz.0001. Acesso em: 4 jan. 2024.

GAAIED, S. et al. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) affects DNA integrity and retina structure in zebrafish larvae. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 56, p. 85402-85412, 2022. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-022-21793-8>.

GOMES, M. et al. Movimento do herbicida imazetapir em um neossolo quartzarênico típico e em um latossolo de textura média das nascentes do rio Araguaia, município de Mineiros (GO). *Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, Curitiba, v. 18, p.115-122, jan./dez. 2008.

GONÇALVES M.W. et al. Detecting genomic damages in the frog *Dendropsophus minutus*: preserved versus perturbed areas. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 5, p. 3947–3954, 2014. doi:10.1007/s11356-014-3682-1

GONÇALVES M.W.; CARVALHO W.F.; PEREIRA R.R.; SILVA D.M.; BASTOS R.P.; CRUZ A.D. Avaliação de danos genômicos em anfíbios anuros do cerrado goiano. **Estudos**, v. 41, p. 89–104, 2014. <https://doi.org/10.18224/est.v41i0.3856>.

GRIPP, H. S. et al. Biochemical effects of fipronil and its metabolites on lipid peroxidation and enzymatic antioxidant defense in tadpoles (*Eupemphix nattereri*:

Leiuperidae). **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 136, p. 173-179, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.10.027>

HEREK, J. S. et al. 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**, v. 27, p. 22619- 22630, 2020. 10.1007/s11356-020-08869-z.

HEREK, J.S. et al. Genotoxic effects of glyphosate on *Physalaemus* tadpoles. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 81, p. 1-7, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103516>

IBAMA. **Relatórios de comercialização de agrotóxicos. 2021** Disponível em:<https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#sobreosrelatorios>. Acesso: 03 mar 2023.

IBAMA. **PERFIL AMBIENTAL 2,4-D (ÁCIDO) CAS 94-75-7. 2019**. Disponível em: https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/arquivos/perfis-ambientais/2019/Perfil%20Ambiental%20-%2024-%20cido%20-%20202_10_2019.pdf. Acesso em 09 jan. 2024.

ISLAS-FLORES, H.; GÓMEZ-OLIVÁN, L. M.; GALAR-MARTÍNEZ, M.; COLÍN-CRUZ, A.; NERI-CRUZ, N.; GARCÍA-MEDINA, S. Diclofenac-induced oxidative stress in brain, liver, gill and blood of common carp (*Cyprinus carpio*). **Ecotoxicology And Environmental Safety**, [S.L.], v. 92, p. 32-38, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.01.025>.

KENNEPOHL, E.; MUNRO, I. C. **Phenoxy herbicides (2,4-D)**. In R. I. Krieger & W. C. Krieger (Eds.), *Handbook of pesticide toxicology*. p. 1623–1638. San Diego: Academic. 2001.

KOLBY, J. E. Amphibia: global amphibian declines caused by an emerging infectious disease and inadequate immune responses. In: **Advances in comparative immunology**. Springer, p. 981-990. 2018. https://doi.org/10.1007/978-3-319-76768-0_29

LAJMANOVICH, R. C. et al. Harmful effects of the dermal intake of commercial formulations containing chlorpyrifos, 2, 4-D, and glyphosate on the common toad *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae). **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 226, n. 427, p. 1-12, 2015. <https://doi.org/10.1007/s11270-015-2695-9>

MACAGNAN, N. et al. Toxicity of cypermethrin and deltamethrin insecticides on embryos and larvae of *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 25, p. 20699-20704, 2017. doi.org/10.1007/s11356-017-9727-5.

MAGGI, F.; TANG, F. H. M.; LACECILIA, D.; MCBRATNEY, A. PEST-CHEMGRIDS, global gridded maps of the top 20 crop-specific pesticide application rates from 2015 to 2025. **Scientific Data**, v. 6, n. 1, p. 1-20, 2019. <http://dx.doi.org/10.1038/s41597-019-0169-4>.

MARCATO, A. C. de C.; SOUZA, C. P. de; FONTANETTI, C. S.. Herbicide 2,4-D: a review of toxicity on non-target organisms. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 228, n. 3, p. 1-12, 2017. <http://dx.doi.org/10.1007/s11270-017-3301-0>.

MARGARIDO, T. C. S et al. Biochemical biomarkers in *Scinax fuscovarius* tadpoles exposed to a commercial formulation of the pesticide fipronil. **Marine Environmental Research**, v. 91, p. 61–67, 2013. 10.1016/j.marenvres.2013.02.001

MESAK, C. et al. Mutagenic assessment of *Lithobates catesbeianus* tadpoles exposed to the 2, 4- D herbicide in a simulated realistic scenario. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 15, p. 15235-15244, 2018. 10.1007/s11356-018-1979-1

MIJARES, A. et al. *Physalaemus cuvieri*. The IUCN Red List of Threatened Species: 2010. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org/species/57250/11609155>. Acesso 10 jan de 2022.

MORAES, R. F. **Agrotóxicos no Brasil: padrões de uso, política da regulação e prevenção da captura regulatória**. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada. - Brasília : Rio de Janeiro : Ipea, 2019. Disponível em: Acesso em: 03 mar. 2023.

MOREIRA, R. A. et al. Mortality, spatial avoidance and swimming behavior of bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*) exposed to the herbicide diuron. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 230, n. 6, p. 1-12, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11270-019-4168-z>

NAGY, K. et al. Systematic review of comparative studies assessing the toxicity of pesticide active ingredients and their product formulations. **Environmental Research**, v. 181, p. 1-19, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108926>.

NALCACI, O. O.; SIRIN, S.; OVEZ, B. Toxicity determination of various phenoxyalkanoic acid herbicides using cress seed in phosphate contaminated aqueous media. **Water Pollution VIII: Modelling, Monitoring and Management**, v. 1, p. 301-307, 2006. 10.2495/WP060311

OECD – Organisation for Economic Co-operation and Development. **OECD Test Guidelines for the Chemicals**. Disponível em: <<https://www.oecd.org/env/ehs/testing/oecdguidelinesforthetestingofchemicals.htm>. Acesso em: 15 fev. 2022.

ORUC, E. O.; SEVGILER, Y.; UNER, N. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. **Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 137, n. 1, p. 43-51, 2004. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2003.11.006>.

PAVAN, F. A. et al. Morphological, behavioral and genotoxic effects of glyphosate and 2, 4-D mixture in tadpoles of two native species of South American amphibians. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 85, p. 1-11, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2021.103637>

PÉREZ-IGLESIAS, J. M.; BRODEUR, J. C.; LARRAMENDY, M. L.. An imazethapyr-based herbicide formulation induces genotoxic, biochemical, and individual organizational effects in *Leptodactylus latinasus* tadpoles (Anura: leptodactylidae). **Environmental Science And Pollution Research**, v. 27, n. 2, p. 2131-2143, 2020. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-019-06880-7>.

PÉREZ-IGLESIAS, J.M.; SOLONESKI, S.; NIKOLOFF, N.; NATALE, G.s.; LARRAMENDY, M.L.. Toxic and genotoxic effects of the imazethapyr-based herbicide formulation Pivot H® on montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). **Ecotoxicology And Environmental Safety**, v. 119, p. 15-24, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.04.045>.

PINHEIRO, A.; SILVA, M.; KRAISCH, R. Presença de pesticidas em águas superficiais e subterrâneas na bacia do Itajaí, SC. **Revista de Gestão de Água da América Latina**, v. 7, n. 2, p. 17-26, 2010. <http://dx.doi.org/10.21168/rega.v7n2.p17-26>.

PNM Sertão. **PLANO DE MANEJO DO PARQUE NATURAL MUNICIPAL DE SERTÃO RIO GRANDE DO SUL – RS**. 2015. Disponível em: <https://www.sema.rs.gov.br/upload/arquivos/202112/15143538-1plano-manejo-pnm-sertao-introducao.pdf>. Acesso em 15 jan. 2024.

RELYEA, A. R. The Lethal Impacts of Roundup and Predatory Stress on Six Species of North American Tadpoles. **Archives Of Environmental Contamination And Toxicology**, v. 48, n. 3, p. 351-357, 2004. <http://dx.doi.org/10.1007/s00244-004-0086-0>.

RUTKOSKI, C. F. et al. 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**, v. 74, n. 4, p. 587-593, 2018. [10.1007/s00244-017-0501-y](http://dx.doi.org/10.1007/s00244-017-0501-y).

RUTKOSKI, C. F. et al. Morphological and biochemical traits and mortality in *Physalaemus gracilis* (Anura: leptodactylidae) tadpoles exposed to the insecticide chlorpyrifos. **Chemosphere**, v. 250, p. 1-9, 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126162>.

SANTOS, A. T. et al. Genotoxic and melanic alterations in *Lithobates catesbeianus* (Anura) tadpoles exposed to fipronil insecticide. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 16, p. 20072-20081, 2021. [10.1007/s11356-020-11948-w](http://dx.doi.org/10.1007/s11356-020-11948-w)

SANTOS, F.M., MARCHESAN, E., MACHADO, S.L.O., AVILA, L.A., ZANELLA, R., GONÇALVES, F.F.. Persistência dos herbicidas imazethapyr e clomazone em lâmina de água do arroz irrigado. **Planta daninha**, v. 26, p. 875–881, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582008000400019>

SANTOS, I. C.dos. et al. Genomic instability evaluation by BMCyt and telomere length in Brazilian family farmers exposed to pesticides. **Mutation Research**, v. 878, p. 1-8, 2022. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2022.503479>.

SEGALLA, Magno V. et al. List of Brazilian amphibians. *Herpetologia Brasileira*, v. 10, n. 1, p. 121-216, 2021.

SILVA, D. C. **Efeitos tóxicos e genéticos ocasionados por agrotóxicos**. 2005. 57 f. Monografia (Especialização em Gestão de Recursos Naturais), Universidade do Extremo Sul Catarinense -UNESC, Criciúma.

SISINNO, C.L.S.; OLIVEIRA-FILHO, E.C. **Princípios de toxicologia ambiental: conceitos e aplicações**. Rio de Janeiro: Interciência, 2013. ISBN 978-85-7193-263-0.

STANLEY, J.; PREETHA, G.; STANLEY. **Pesticide toxicity to non-target organisms**. Berlin, Germany: Springer, 2016.

SCHNEIDER, S. E; Determinação de Agrotóxicos e Fármacos em Água Empregando Extração em Fase Sólida, GC-MS e UHPLCMS/MS. **Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental da Universidade Federal do Rio Grande (RS)**. Santo Antônio da Patrulha, RS – Brasil. 2013.

TUDI, M. et al. Agriculture development, pesticide application and its impact on the environment. **International journal of environmental research and public health**, v. 18, n. 3, p. 1112, 2021. 10.3390/ijerph18031112

USEPA—United States Environmental Protection Agency. 2005. **Reregistration eligibility decision for 2,4-D**. Washington, DC: United States Environmental Protections Agency. Disponível em: https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/pdf/24d_red.pdf. Acesso em: 15 mar. 2023.

VASCONCELOS, A. M. **Avaliação dos efeitos do agrotóxico Vertimec® 18CE sobre girinos de *Lithobates catesbeianus* (Amphibia, Anura, Ranidae)**. 2014. 147 f. Tese 36 (Doutorado em Engenharia Ambiental) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

VIRIATO, C. et al. Evaluation of the potential teratogenic and toxic effect of the herbicide 2,4-D (DMA® 806) in bullfrog embryos and tadpoles (*Lithobates catesbeianus*). **Chemosphere**, v. 266, p. 1-12, 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129018>.

VIRIATO, C.; FRANÇA, F. M.; SANTOS, D. S.; MARCANTONIO, A. S.; BADARÓ-PEDROSO, C.; FERREIRA, C. M. Evaluation of the potential teratogenic and toxic effect of the herbicide 2,4-D (DMA® 806) in bullfrog embryos and tadpoles (*Lithobates catesbeianus*). **Chemosphere**, v. 266, p. 129018, 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129018>

WAGNER, N. et al. Questions concerning the potential impact of glyphosate-based herbicides on amphibians. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 32, n. 8, p. 1688-1700, 2013.

WANG, Y. -S.; YEN, J. -H.; HSIEH, Yar -Ning; CHEN, Yun -Lin. Dissipation of 2,4-D glyphosate and paraquat in river water. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 72, n. 1-4, p. 1-7, 1994. <http://dx.doi.org/10.1007/bf01257113>.

WRUBLESWSKI, J. et al. Acute and chronic toxicity os pesticides on tadpoles of *Physalaemus curvieri* (Anura, Leptodactylidae). **Ecotoxicology**, v. 27, n. 3, p. 369-368, 2018. doi.org/10.1007/s10646-018-1900-1.

CAPÍTULO 1 - TOXICIDADE DE CONCENTRAÇÕES AMBIENTALMENTE RELEVANTES DE UMA FORMULAÇÃO COMERCIAL DE 2,4-D EM GIRINOS DE *PHYSALAEMUS CUVIERI*.

Resumo

O Brasil é um dos maiores consumidores do herbicida 2,4-D devido ao seu potencial agrícola, no entanto, resíduos desse agrotóxico podem atingir o habitat de anfíbios e causar efeitos prejudiciais a esses organismos. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade de uma formulação comercial de 2,4-D em girinos de *Physalaemus cuvieri*. Durante 14 dias os girinos foram expostos as concentrações ambientalmente realísticas de 2,4-D, sendo 0, 1, 7, 21, 35 e 50 µg/L. A sobrevivência e a atividade natatória foram monitoradas durante todo o período experimental. Parâmetros de tamanho do corpo foram medidos no início e no final do experimento. Ao final do ensaio, os girinos foram observados quanto a ocorrência de anormalidades morfológicas na boca, intestino, cauda e, também foram feitos esfregaços sanguíneos para avaliar a presença de anormalidades nucleares. Além disso, foi calculado o coeficiente de risco ecológico, a fim de determinar potencial risco em espécies não alvo. Os girinos expostos ao 2,4-D apresentaram perda de peso, alterações na boca e no intestino, assim como alterações nucleares eritrocitárias e micronúcleo. O coeficiente de risco demonstrou que o composto estudado apresenta risco crônico. Com isso, conclui-se que a formulação estudada apresenta toxicidade subletal e genotoxicidade em concentrações que podem ocorrer na natureza.

1. Introdução

Os agrotóxicos consistem em produtos utilizados para proteger as culturas contra pragas e doenças nocivas (Syfrudin et al., 2021). Embora o solo seja o principal compartimento de aplicação dos agrotóxicos, os recursos hídricos estão bastante suscetíveis a contaminação por agrotóxicos em função do escoamento dos campos agrícolas (Sarker et al., 2021). Outras fontes pontuais e difusas também contribuem para a entrada de agrotóxicos no ambiente aquático como o descarte inadequado de agrotóxicos, vazamentos de locais de armazenamento, uso urbano e lançamentos de efluentes oriundos do processo de fabricação (Syfrudin et al., 2021). Devido ao crescimento populacional e maior demanda de produção de alimentos espera-se um aumento na utilização de agrotóxicos na agricultura, contudo, pouco se sabe sobre os efeitos causados pelos agrotóxicos nos ecossistemas (Tang et al., 2021).

Desta forma são necessários estudos para avaliar os efeitos dos agrotóxicos, como por exemplo do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), que é considerado o primeiro herbicida de auxina desenvolvido na década de 1940 e que atualmente segue sendo usado para controle de plantas daninhas de folhas largas (Gaaied et al., 2022). O 2,4-D consiste em um herbicida utilizado em pré e pós emergência (Arcaute et al., 2016) em culturas de soja, arroz, milho, trigo e cana-de-açúcar (Freitas et al., 2019). Em baixas concentrações este herbicida imita auxinas naturais das plantas, que participam da divisão e alongamento celular e, em altas concentrações, atua como herbicida afetando o crescimento de folhas largas (Arcaute et al., 2016). Além do grande uso agrícola, o 2,4-D também é aplicado em ecossistemas aquáticos para controle de plantas daninhas aquáticas e conseqüentemente, efeitos indiretos em organismos aquáticos não-alvo podem ocorrer (Dehnert et al., 2021). Devido a ampla utilização, esse herbicida vem sendo detectado em águas superficiais em várias regiões do mundo (Gaaied et al., 2022) como na Argentina (100 µg/L; Agostini et al., 2020), Brasil (75 µg/L; Pinheiro et al., 2010; 90 µg/L; De Castro Lima et al., 2020), México (0,038 µg/L; Félix–Cañedo et al., 2013) e China (125 ng/L; Sun et al., 2020).

Agrotóxicos tais como os herbicidas podem afetar negativamente a saúde dos anfíbios, que são um grupo de vertebrados não-alvo destes compostos químicos (Arcaute et al., 2020) e essa pode ser uma das causas da perda de populações de

anfíbios em todo o mundo (Suárez et al., 2016; Attademo et al., 2021). Devido a pele permeável e ciclo de vida aquático e terrestre (geralmente), os anfíbios são considerados bons indicadores da poluição ambiental, podendo estar expostos a contaminantes inclusive na fase embrionária (Ji et al., 2016). *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leptodactylidae) é uma espécie neotropical que se distribui na América do Sul e com ocorrência comum em biomas abertos (Miranda et al., 2019; Nascimento et al., 2021). Devido a ampla distribuição geográfica, são organismos modelos que podem estar suscetíveis a diversos contaminantes (Nascimento et al., 2021), inclusive a 2,4-D.

Apesar do amplo uso de 2,4-D, a toxicidade de formulações comerciais foi pouco estudada em girinos. O 2,4-D apresentou baixa toxicidade aguda em *Lithobates catesbeianus*, porém, houve diminuição do crescimento embrionário e do baço, alterações em células imunes e histopatológicas (Viriato et al., 2020). Em *Physalaemus albonotatus* foram observadas alterações morfológicas na boca e no fígado, além de redução da sobrevivência e aceleração do desenvolvimento após a exposição a 2,4-D (Curi et al., 2019). Também, foi verificada ocorrência de genotoxicidade em *L. catesbeianus* (Mesak et al., 2018) e de alterações enzimáticas, como aumento na atividade enzima de biotransformação glutationa S-transferase em *Leptodactylus fuscus* (Freitas et al., 2019). Além disso Wingen et al. (2023) relataram a ocorrência de estresse oxidativo após a exposição de *Scinax squalirostris* a 2,4-D.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade de concentrações ambientalmente relevantes de uma formulação comercial de 2,4-D em girinos de *Physalaemus cuvieri*, avaliando como *endpoints* sobrevivência, crescimento, alterações morfológicas e na atividade natatória, bem como o potencial genotóxico.

2. Metodologia

2.1 Organismo modelo

Foram coletadas desovas da espécie *Physalaemus cuvieri* em uma lagoa em área não agricultável, localizada no município de Erechim, estado do Rio Grande do sul – Brasil (Latitude: 27°43' 46,11" Sul; Longitude: 52°16' 54,40" Oeste e colocadas

em água reconstituída (ASTM E1439-12), em aquários de vidro (15 L), no laboratório de Ecologia e Conservação da Universidade Federal da Fronteira Sul – campus Erechim, até atingirem o estágio de desenvolvimento 25 (Gosner, 1960). Neste estágio os girinos apresentam tubo oral formado e estruturas corporais para natação completa (Gosner, 1960). A alimentação foi feita com ração comercial completa para peixes em flocos (Alcon Basic®) e alface orgânica, ministrada a cada 24 h, para ambos os alimentos.

2.2 Composto testado

O agrotóxico testado foi a formulação comercial U 46 BR (concentrado solúvel, SL), contendo 806g/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 670 g/L de equivalente ácido e 380,9 g/L de ingredientes inertes. Foi preparada uma solução estoque utilizando-se água destilada, na concentração de 500 mg/L do composto de 2,4 D.

2.3 Design experimental

A água utilizada para aclimação e ensaios ecotoxicológicos foi preparada seguindo as orientações descritas na ASTM E1439-12/2012, denominada solução FETAX, sendo composta por 625 mg de NaCl, 96 mg de NaHCO₃, 30 mg de KCl, 15 mg de CaCl₂, 60 mg de CaSO₄ · 2H₂O e 75 mg de MgSO₄ por litro de água destilada, com pH de 7,0 a 7,5. Os parâmetros de qualidade da água (físicos e químicos) foram monitorados a cada cinco dias, para garantir os níveis de qualidade. A temperatura e oxigênio foram medidos diariamente, sendo que a oxigenação foi feita artificialmente com compressores de ar de aquários para peixes. A temperatura da água foi estabilizada a partir da aclimação da sala com ar condicionado (23°C). Os parâmetros de pH e a amônia foram monitorados a cada 120 horas.

Para realização do ensaio de toxicidade crônica, 10 girinos em estágio de desenvolvimento 25 (Gosner, 1960) foram colocados em um recipiente de vidro esterilizado contendo 500 ml de água (FETAX) mais o agrotóxico. As concentrações testadas foram de 1, 7, 21, 35 e 50 µg/L de 2,4-D. Todas as concentrações testadas são consideradas ambientalmente realísticas, baseadas em dados da literatura (Pinheiro et al., 2010; Pfeuffer, 2011; Agostini et al., 2020; De Castro Lima et al., 2020). Em paralelo, o grupo controle foi conduzido somente com a solução FETAX (a mesma água usada na criação dos animais). Cada recipiente de vidro foi considerado uma

unidade experimental e cada concentração o tratamento. Os tratamentos e controle foram realizados em triplicata, ou seja, com três repetições, contendo 10 girinos em cada unidade experimental (n = 30). O ensaio crônico teve duração de 14 dias, e as soluções foram renovadas a cada 5 dias. Durante o ensaio, os girinos foram alimentados diariamente com a mesma alimentação da criação.

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais, CEUA da UFFS (nº 3268061022).

2.4 Mortalidade, tamanho do corpo, crescimento e alterações morfológicas

A mortalidade foi avaliada a cada 24 horas, sendo que os girinos mortos foram contabilizados e retirados do aquário. Para avaliar o tamanho do corpo e crescimento os animais foram medidos e pesados no primeiro e último dia do experimento. Para medir o comprimento total utilizou-se um paquímetro Universal Analógico Mitutoyo 530-140BR e para pesar uma balança digital SHIMADZU modelo UX620H, respectivamente. Essas duas medidas juntas foram consideradas tamanho do corpo. O crescimento foi considerado a diferença entre o comprimento e peso do primeiro e do último dia.

Ao final do experimento os animais foram avaliados quanto a ocorrência de malformações e para isso todos os animais foram observados em estereomicroscópio binocular (Nikon SMZ 745T) e fotografados com uma câmara acoplada ao mesmo. As estruturas corporais analisadas foram: (a) boca (ausência parcial ou total de queratodontes), (b) morfologia do intestino, (c) curvatura da cauda (d) presença de edema no corpo.

2.5 Atividade natatória

A atividade natatória foi observada e registrada em vídeo no 1º (primeiro), 7º (sétimo) e 14º (décimo quarto) dia do ensaio e analisada manualmente posteriormente. Foi feito um estímulo com bastão de vidro em cada unidade experimental, mexendo devagar a água três vezes e, foi realizada uma gravação em vídeo da movimentação dos girinos, por 30 segundos. Essas gravações foram avaliadas em relação aos seguintes parâmetros comportamentais: (1) atividade normal, considerada a atividade do controle, (2) atividade igual a do controle, (3) letargia, ou atividade natatória menor que o controle, (4) hiperatividade, ou atividade

natatória maior do controle e (5) espasmos. Cada um desses parâmetros foi analisado separadamente, contando o número de girinos em cada unidade experimental que apresentou o comportamento no momento da avaliação. Para definir quantos girinos apresentaram alterações na atividade natatória, realizou-se a soma da quantidade de girinos que apresentaram letargia, hiperatividade, espasmos ou imobilidade, e classificou-se como atividade natatória irregular.

2.6 Anormalidades nucleares

Ao final do teste foram retiradas amostras de sangue de todos os animais. Previamente, os indivíduos foram anestesiados com lidocaína a 5% (50 mg/g), de acordo com o CONCEA (2018). Foi retirada uma gota de sangue, através de punção cardíaca, com seringas de insulina descartáveis e heparinizadas. Após, foi realizado o esfregaço sanguíneo em lâminas de vidro. As lâminas permaneceram secando por 12 h, e posteriormente foram coradas utilizando o kit panótico rápido (Laborclin Ltda, Brasil), segundo as instruções do fabricante.

A presença de anormalidades nucleares nos eritrócitos (ANEs), incluindo micronúcleos, foram verificadas com resolução de 100x em microscópio óptico, a partir da análise de 1.000 eritrócitos por lâmina. A frequência de eritrócitos portadores de ANEs foi calculada em relação ao total de células analisadas e o resultado foi apresentado em porcentagem (%). Foi avaliada a ocorrência de micronúcleo e oito ANEs denominadas, apoptose, célula binucleada, núcleo com bolha, cariólise, núcleo lobado, núcleo entalhado, núcleo vacuolizado e célula anucleada, de acordo com Lajmanovich et al (2015).

2.7 Análise Estatística e de Risco Ecológico

Os dados foram analisados quanto a normalidade e homogeneidade, pelos testes de *Shapiro-Wilk* e *Bartlett*, respectivamente. Utilizou-se *Anova One-Way*, seguida do teste de *Tukey*, para dados paramétricos. Para dados não paramétricos foi usado o teste de *Kruskal-Wallis*, seguido do teste de *Dunn*. O nível de confiança utilizado foi de 95% ($p < 0,05$). As análises foram feitas através do programa *GraphPad Prism 8.3.4*. Com base nos resultados estatísticos definiu-se a concentração de efeito adverso não observado (em inglês - No observed adverse effect concentration; NOEC) e o nível mais baixo de efeito adverso observado (em inglês - lowest observed adverse

effect level; LOEL) para os *endpoints* que apresentaram diferença significativa em relação ao controle. A concentração tóxica máxima aceitável (em inglês: maximum acceptable toxicant concentration - MATC) foi determinada matematicamente como a média geométrica de NOEC e LOEL. Os dados de NOEC, LOEL e MATC foram utilizados para análise de risco ecológico. O risco ecológico foi calculado pelo quociente de risco crônico (CHQ), de acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, 1998). O quociente de perigo crônico é baseado na concentração ambiental estimada (CAE) e na NOEC, calculada como CAE/NOEC. Como CAE foi utilizada a máxima concentração de 2,4-D registrada em água superficial que foi de 100 µg/L (Agostini et al., 2020) e como NOEC os resultados obtidos neste estudo. Os resultados de CHQ foram comparados com os níveis de preocupação adotados pela USEPA (1998). O valor estabelecido para o risco crônico é 1, isto é, se o resultado do risco foi maior que 1 (>1), os efeitos nocivos são provavelmente devidos ao contaminante em questão.

3. Resultados

3.1 Mortalidade, tamanho do corpo, crescimento e alterações morfológicas

A maior incidência de mortalidade ocorreu na concentração de 50 µg/L (13,3%), porém, não houve diferença significativa em relação ao controle ($K_{6,18} = 0.8300$; $p = 0.9751$) (Tabela 1). O comprimento total dos girinos não sofreu alterações significativas ($F_{5,12} = 2.266$; $p = 0.1141$) ao final do experimento (Tabela 1). Após a exposição de *P. cuvieri* a concentração de 2,4-D, os girinos expostos a concentração de 50 µg/L apresentaram perda de peso ($F_{5,12} = 3.956$; $p = 0.0237$), significativa em relação ao controle, com redução média de 53,19 % de peso (Tabela 1).

Quanto as alterações morfológicas, houve maior ocorrência de alterações na boca e no intestino na concentração de 35 µg/L, em 22,2% e 14,8% respectivamente. Não houve ocorrência significativa de alterações na boca ($K_{6,18} = 7,108$; $p = 0,2127$) e intestino ($K_{6,18} = 2,671$; $p = 0,7506$) em relação a controle (Tabela 1; Figura 1). Alterações na cauda dos girinos não foram observadas nos tratamentos com 2,4-D em relação ao controle ($K_{6,18} = 5,000$; $p = 0,4159$).

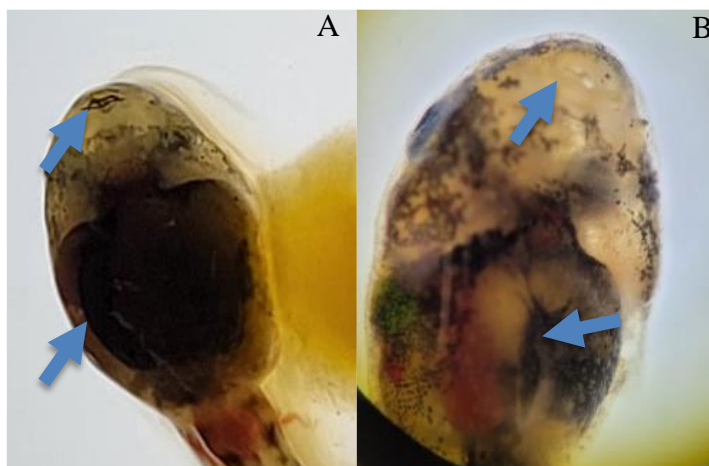
Tabela 1 - Parâmetros morfológicos de mortalidade, comprimento, peso e alterações morfológicas em girinos *P. cuvieri* expostos a formulação comercial em 2,4-D.

Concentração (µg/L)	N° de girinos ao final ensaio	Mortalidade	Comprimento (mm)	Peso (g)	N° de girinos com alteração na boca	N° de girinos com alteração no intestino
Controle	28	2 (6,6%) ^a	19,02 ± 1,97 ^a	0,11 ± 0,04 ^a	0 ^a	0 ^a
1	29	1 (3,3%) ^a	17,94 ± 1,57 ^a (- 5,71%)	0,09 ± 0,04 ^a (-13,23%)	1 (3,4%) ^a	1 (3,4%) ^a
7	27	3 (10,0%) ^a	16,55 ± 2,25 ^a (- 12,97%)	0,1 ± 0,06 ^a (- 8,17%)	4(14,8%) ^a	4 (14,8%) ^a
21	28	2 (6,6%) ^a	18,00 ± 3,43 ^a (5,38%)	0,11 ± 0,04 ^a (4,88%)	1 (3,5%) ^a	2 (3,5%) ^a
35	27	3 (10,0%) ^a	15,57 ± 2,31 ^a (- 18,16%)	0,11 ± 0,06 ^a (-1,86%)	6(22,2%) ^a	4 (14,8%) ^a
50	26	4 (13,3%) ^a	17,64 ± 2,53 ^a (- 7,27%)	0,05 ± 0,03^b (- 53,19%)	1 (3,8%) ^a	3 (11,5%) ^a

OBS: Letras diferentes indicam diferença significativa em relação ao controle pelo Teste de Tukey.

Fonte: Autor, 2023.

Figura 1 – Alterações observadas na boca e no intestino de girinos de *Physalaemus cuvieri*, no estágio 25 de Gesner. Imagem aumentada em 10 vezes. A: Controle; B: Boca parcialmente sem queratodontes e intestino em formato não-espiral.



Fonte: Autor, 2023.

3.2 Atividade natatória

Não ocorreram alterações significativas na atividade natatória (letargia e hiperatividade) dos girinos no dia 1 (Letargia: $K_{6,18} = 3,400$; $p=0,6386$; Hiperatividade: $K_{6,18} = 4,133$; $p=0,5304$), no dia 7 (Letargia: $K_{6,18} = 4,255$; $p= 0,5133$; Hiperatividade: não houve) e no dia 14 (Letargia: $K_{6,18} = 6,886$; $p=0,2293$; Hiperatividade: não houve) do experimento de exposição, em relação ao controle (Tabela 2).

Tabela 2 – Atividade natatória de girinos de *P. cuvieri* expostos a 2,4-D.

Concentração ($\mu\text{g/L}$)	Número de girinos com Letargia			Número de girinos com Hiperatividade		
	0 (Dias)	7 (Dias)	14 (Dias)	0 (Dias)	7 (Dias)	14 (Dias)
Controle	0	0	0	0	0	0
1	0	0	2	1	0	0
7	1	2	2	2	0	0
21	0	0	0	0	0	0
35	1	0	0	2	0	0
50	0	1	2	0	0	0

Fonte: Autor, 2023.

3.3 Análise de anormalidades eritrocitárias (ANEs) e micronúcleo

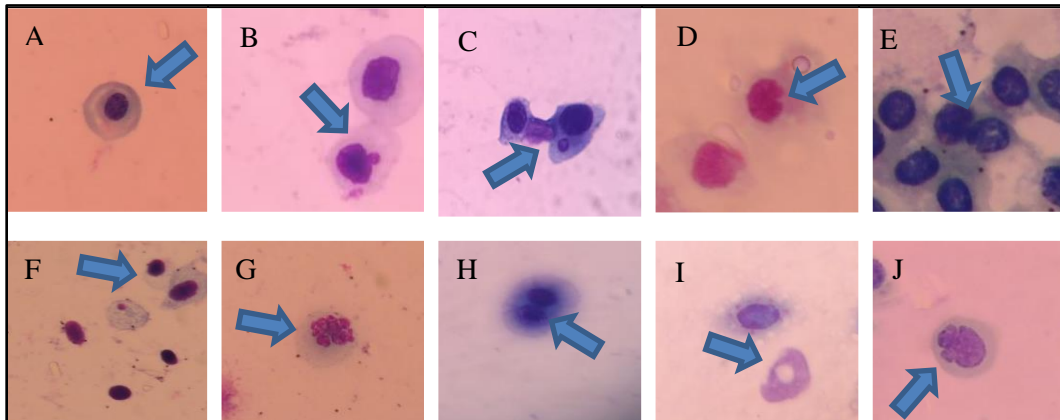
As ANEs observadas consistiram em célula anucleada, apoptose, binucleada, broto, cariólise, entalhada, lobada e micronúcleo (Tabela 3; Figura 2). Para cada grupo foram analisadas dez mil células e a maior incidência de anormalidades foi encontrada na maior concentração (Tabela 3). Na concentração de 50 µg/L verificou-se um aumento significativo na quantidade de células anucleadas ($K_{6,18} = 13,27$; $p=0,0210$) e em apoptose ($K_{6,18} = 12,91$; $p=0,0242$), em relação ao controle. Houve um aumento significativo ($F_{5,12} = 10,45$; $p=0,0005$) em relação ao controle de células com broto nas concentrações de 21, 35 e 50 µg/L. Nas concentrações de 35 e 50 µg/L houve um aumento significativo na frequência de células lobadas ($F_{5,12} = 12,44$; $p=0,0002$) e com micronúcleo ($K_{6,18} = 15,72$; $p=0,0077$).

Tabela 3 - Anormalidades nucleares de eritrócitos (ANE's) encontradas em girinos de *P. cuvieri* expostos as concentrações de 0 (controle), 1, 7, 21, 35 e 50 µg/L de 2,4-D. Os dados representam média ± erro padrão, valor mínimo-máximo. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de *Tukey/Dunn* ($p < 0,05$).

Anomalia	Concentração (µg/L)					
	Controle	1	7	21	35	50
Anucleada	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0,3 ± 0,5 ^a (1-2)	0,3 ± 0,4^b (1-1)
Apoptose	0,2 ± 0,4 ^a (1-2)	0,2 ± 0,4 ^a (0-2)	1,0 ± 0,3 ^a (1-3)	0,8 ± 0,5 ^a (1-2)	1,3 ± 0,5 ^a (0-2)	2,5 ± 0,5^b (1-4)
Binucleada	0,3 ± 0,6 ^a (1-2)	0,3 ± 0,3 ^a (0-2)	0,4 ± 0,1 ^a (1-2)	1,1 ± 0,8 ^a (0-3)	0,2 ± 0,2 ^a (0-1)	0,7 ± 0,3 ^a (1-3)
Broto	1,4 ± 0,3 ^a (0-3)	2,7 ± 1,5 ^a (0-8)	1,4 ± 1,2 ^a (0-5)	5,0 ± 1,0^b (0-12)	5,1 ± 2,0^b (0-12)	8,3 ± 1,8^b (5-15)
Cariólise	0 ^a	0,1 ± 0,2 ^a (0-1)	0,6 ± 0,6 ^a (1-4)	0 ^a	0,5 ± 0,4 ^a (1-2)	0,6 ± 0,7 ^a (1-6)
Entalhada	8,9 ± 1,5 ^a (1-4)	13,3 ± 4,2 ^a (3-24)	12,1 ± 4,3 ^a (0-35)	4,6 ± 1,2 ^a (1-5)	5,6 ± 2,4 ^a (1-14)	5,0 ± 2,5 ^a (0-9)
Lobada	8,8 ± 1,1 ^a (5-13)	12,9 ± 9,1 ^a (0-22)	16,6 ± 5,3 ^a (0-23)	20,3 ± 1,8 ^a (7-34)	25,6 ± 3,6^b (10-36)	40,8 ± 7,7^b (20-55)
Micronúcleo	0 ^a	0,2 ± 0,4 ^a (0-2)	0,5 ± 0,2 ^a (0-3)	1,5 ± 0,2 ^a (0-4)	3,1 ± 0,5^b (1-6)	2,7 ± 7,0^b (2-4)
Vacuolizada	0,1 ± 0,2 ^a (0-1)	0 ^a (2-5)	1,0 ± 1,2 ^a (0-3)	1,1 ± 1,4 ^a (0-5)	0,4 ± 0,5 ^a (0-2)	0 ^a
Nº células analisadas	10000	10000	10000	10000	10000	10000
Total de ANEs (%)	1,19	2,87	3,45	3,29	4,15	6,19

Fonte: Autor, 2023.

Figura 2- Eritrócito normal e Anormalidades Nucleares nos Eritrócitos avaliadas em girinos de *P. cuvieri* expostos a formulação comercial de 2,4-D. Legenda: Imagem aumentada em 100 vezes. A: Controle; B: Broto; C: Micronúcleo; D: Célula Entalhada; E: Vacuolizada F: Cariólise; G: Apoptose; H: Célula Binucleada; I: Célula Anucleada; J: Célula Lobada.



Fonte: Autor, 2023.

3.4 Risco ecológico

O NOEC variou de 7 a 50 µg/L, o LOEC de 21 a 50 µg/L e a MATC de 12,12 a 41,83 µg/L (Tabela 4). O quociente de risco crônico variou de 2 a 14,28 (Tabela 4), sendo maior para o *endpoint* broto.

Tabela 4 - Valores de concentração de efeito não observado (NOEC), concentração de efeito observado (LOEC), máxima concentração aceitável de toxicante (MATC) e quociente de risco crônico (CHQ) para os *endpoints* peso e anormalidades eritrocitárias (ANEs).

<i>Endpoint</i>	NOEC (µg/L)	LOEC (µg/L)	MATC (µg/L)	CHQ
Peso	35	50	41,83	2,85
Anucleada	35	50	41,83	2,85
Apoptose	35	50	41,83	2,85
Broto	7	21	12,12	14,28
Micronúcleo	21	35	27,11	4,76

Fonte: Autor, 2023.

4. Discussão

As alterações mais evidentes em girinos de *P. cuvieri* no estágio 25 de Gosner (1960) expostos ao 2,4-D foram redução da biomassa corporal e aumento na frequência de anormalidades nucleares eritrocitárias, incluindo micronúcleo. Apesar de serem constatadas poucas alterações morfológicas na boca, intestino, cauda, atividade natatória, assim como baixa mortalidade, os parâmetros alterados indicam que o herbicida foi tóxico nas condições estudadas. Alterações na boca, intestino e micronúcleo também foram observadas por Santos et al. (2024), no qual efeitos tóxicos em girinos de *P. cuvieri* expostos a outra formulação comercial de 2,4-D (com 720 g/L de equivalente ácido) foram verificados na concentração de 52,2 µg/L, enquanto neste trabalho a formulação comercial (contendo 806 g/L de ácido) causou efeitos tóxicos a partir de 35 µg/L, ficando evidente que a toxicidade pode variar dependendo da formulação comercial testada.

Alterações na boca, evidenciadas pela redução de queratodontes, estão diretamente associadas com prejuízos para a obtenção de alimentos, podendo afetar o crescimento e o desenvolvimento dos girinos (Pérez-Iglesias et al., 2015; Pavan et al., 2021). O crescimento e sobrevivência também podem ser influenciados por

alterações morfológicas do intestino, visto que, afetam a absorção de alimentos (Pavan et al., 2021).

Nas condições estudadas, o 2,4-D não afetou o comprimento total do corpo dos girinos e a atividade natatória. O mesmo ocorreu para outros anfíbios expostos a 2,4-D, como em *Lithobates catesbeianus* que não apresentou alterações no comprimento do corpo quando exposto a diferentes formulações comerciais de 2,4-D (Mesak et al., 2018) e *Boana pardalis*, que não teve alterações na atividade natatória em contato com o ingrediente ativo desse herbicida (Moutinho et al., 2020). No entanto, os girinos de *P. cuvieri* perderam peso após a exposição a 50 µg/L, o que sugere que o herbicida afetou a ingestão ou absorção do alimento. A redução no peso também ocorreu em *Leptodactylus latrans* expostos a mistura de 2,4-D e glifosato (Pavan et al., 2021), apontando que realmente agrotóxicos podem influenciar na aquisição ou não de massa corporal. A redução no peso pode ocorrer em função de diminuição de forrageamento e distúrbios no metabolismo lipídico (Liu et al., 2021), além de alterações no metabolismo da tireoide (Hersikorn and Smits, 2011). Contudo, os mecanismos sobre como o 2,4-D afeta girinos não são bem compreendidos, pelo fato de que há ingredientes inertes não especificados nas formulações, sendo necessários mais estudos que avaliem o efeito destes compostos, bem como da formulação comercial completa. Além disso, existem diferenças entre os produtos comercializados a base de 2,4-D, pois como visto em girinos de *L. catesbeianus* expostos a outra formulação comercial, houve redução no comprimento e ausência de alterações na biomassa corporal (Freitas et al., 2019), sugerindo que os efeitos podem ser distintos dependendo da espécie e formulação usada.

A avaliação de ANEs e micronúcleo consiste em um importante parâmetro para avaliar o potencial genotóxico de contaminantes (Benvindo-Souza et al., 2020). Neste estudo, foi verificado um aumento na frequência de células anucleadas, lobadas, com broto e micronúcleo. A presença de células anucleadas pode indicar necessidade de aumento de transporte de oxigênio no organismo e é um processo que pode ocorrer em girinos expostos a ambientes contaminados (Barni et al., 2007). Já a ocorrência de células binucleadas e com micronúcleo está associada com alterações no processo de divisão celular, enquanto que as demais anormalidades podem ter relação com falhas na amplificação do DNA (Pollo et al., 2015). A presença de broto no núcleo da célula pode ser considerada uma estrutura semelhante ao

micronúcleo (Prieto et al., 2008) e células com apoptose indicam morte celular (Fenech, 2000). Com isso, pode-se constatar que o 2,4-D foi genotóxico aos girinos de *P. cuvieri* e estes resultados corroboram com os de Mesak et al (2018), no qual girinos de *Lithobates catesbeianus* expostos a uma formulação comercial de 2,4-D apresentaram diferentes anormalidades eritrocitárias, incluindo micronúcleo, que podem afetar o desenvolvimento celular provocando a morte celular. Anormalidades nucleares e micronúcleo foram observadas em outras espécies de anfíbios expostas a formulações comerciais de 2,4-D isoladas ou misturadas com outros herbicidas como em girinos de *Lithobates catesbeianus* (Mesak et al., 2018), *Boana faber* e *Leptodactylus latrans* (Pavan et al., 2021).

O 2,4-D apresentou risco crônico para *P. cuvieri*, em concentrações consideradas realísticas. A MATC de 12,12 µg/L é menor que o valor máximo permitido para 2,4-D pela legislação brasileira na água de consumo humano (30 µg/L) (Brasil, 2021). Já a MATC 41,83 µg/L é maior que do limite estabelecido na legislação, porém, é menor que algumas concentrações possíveis de serem encontradas na natureza (Agostini et al., 2020), o que sugere que podem ocorrer efeitos prejudiciais em anfíbios anuros, como malformação da boca e intestino e genotoxicidade. Além disso, o CHQ para todos os *endpoints* foi maior que o limite do nível de preocupação (LOC=1) para risco crônico (USEPA, 1998), indicando que há potencial de risco crônico para organismos aquáticos não-alvo.

5. Conclusão

Concentrações ambientalmente realísticas de 2,4-D causaram perda de peso corporal e aumento na frequência de anormalidades celulares e micronúcleo em girinos de *P. cuvieri*, o que pode afetar o desenvolvimento e comprometer a sobrevivência destes animais na natureza. Além disso, o herbicida estudado apresentou risco crônico para anfíbios, sugerindo que valores máximos permitidos na legislação devem passar por frequentes reavaliações.

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. *Biological Conservation*, 241, 108355. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.108355>
- Arcaute, C. R. de, Brodeur, J. C., Soloneski, S., & Larramendy, M. L. (2020). Toxicity to *Rhinella arenarum* tadpoles (Anura, bufonidae) of herbicide mixtures commonly used to treat fallow containing resistant weeds: Glyphosate–dicamba and glyphosate–flurochloridone. *Chemosphere*, 245, 125623. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125623>
- Arcaute, C. R. de, Soloneski, S., & Larramendy, M. L. (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. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.02.027>
- ASTM E1439-12. Standard guide for conducting the frog embryo teratogenesis assay-Xenopus (Fetax). <https://www.astm.org/e1439-12.html>
- Attademo, A. M., Lajmanovich, R. C., Peltzer, P. M., Boccioni, A. P. C., Martinuzzi, C., Simoniolo, F., & Repetti, M. R. (2021). Effects of the emulsifiable herbicide Dicamba on amphibian tadpoles: An underestimated toxicity risk? *Environmental Science and Pollution Research*, 28(24), 31962–31974. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-13000-x>
- Barni, S., Boncompagni, E., Grosso, A., Bertone, V., Freitas, I., Fasola, M., & Fenoglio, C. (2007). Evaluation of *Rana ssk esculenta* blood cell response to chemical stressors in the environment during the larval and adult phases. *Aquatic Toxicology*, 81(1), 45–54. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.10.012>
- 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. (2020). Micronucleus test in tadpole erythrocytes: Trends in studies and new paths. *Chemosphere*, 240, 124910. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124910>
- BRASIL. 2021. Portaria GM/MS Nº 888, de 4 de maio de 2021. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2021/prt0888_24_05_2021_rep.html. Acesso em: 02 ago 2023
- CONCEA – 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, 22 fev. 2018.
- 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), 22. <https://doi.org/10.1007/s11270-018-4073-x>
- De Castro Lima, J. A. M., Labanowski, J., Bastos, M. C., Zanella, R., Prestes, O. D., De Vargas, J. P. R., Mondamert, L., Granado, E., Tiecher, T., Zafar, M., Troian, A., Le

Guet, T., & Dos Santos, D. R. (2020). "Modern agriculture" transfers many pesticides to watercourses: A case study of a representative rural catchment of southern Brazil. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(10), 10581–10598. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06550-8>

Dehnert, G. K., Freitas, M. B., Sharma, P. P., Barry, T. P., & Karasov, W. H. (2021). Impacts of subchronic exposure to a commercial 2,4-D herbicide on developmental stages of multiple freshwater fish species. *Chemosphere*, 263, 127638. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127638>

Félix–Cañedo, T. E., Durán–Álvarez, J. C., & Jiménez–Cisneros, B. (2013). The occurrence and distribution of a group of organic micropollutants in Mexico City's water sources. *Science of The Total Environment*, 454–455, 109–118. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.02.088>

Fenech, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455(1–2), 81–95. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00065-8](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00065-8)

Freitas, J. S., Giroto, L., Goulart, B. V., Alho, L. D. O. G., Gebara, R. C., Montagner, C. C., Schiesari, L., & Espíndola, E. L. G. (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. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109446>

Gaaied, S., Oliveira, M., Barreto, A., Zakhama, A., & Banni, M. (2022). 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) affects DNA integrity and retina structure in zebrafish larvae. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(56), 85402–85412. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-21793-8>

Gosner, K. L. (1960). A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, 16(3), 183–190. <https://www.jstor.org/stable/3890061>

Hersikorn, B. D., & Smits, J. E. G. (2011). Compromised metamorphosis and thyroid hormone changes in wood frogs (*Lithobates sylvaticus*) raised on reclaimed wetlands on the Athabasca oil sands. *Environmental Pollution*, 159(2), 596–601. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.10.005>

Ji, Q., Lee, J., Lin, Y.-H., Jing, G., Tsai, L. J., Chen, A., Hetrick, L., Jocoy, D., & Liu, J. (2016). Atrazine and malathion shorten the maturation process of *Xenopus laevis* oocytes and have an adverse effect on early embryo development. *Toxicology in Vitro*, 32, 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.12.006>

Lajmanovich, R. C., Attademo, A. M., Simoniello, M. F., Poletta, G. L., Junges, C. M., Peltzer, P. M., Grenón, P., & Cabagna-Zenklusen, M. C. (2015). Harmful effects of the dermal intake of commercial formulations containing chlorpyrifos, 2,4-d, and glyphosate on the common toad *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae). *Water, Air, & Soil Pollution*, 226(12), 427. <https://doi.org/10.1007/s11270-015-2695-9>

Liu, R., Qin, Y., Diao, J., & Zhang, H. (2021). *Xenopus laevis* tadpoles exposed to metamifop: Changes in growth, behavioral endpoints, neurotransmitters, antioxidant system and thyroid development. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 220, 112417. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112417>

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. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(15), 15235–15244. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1979-1>

Miranda, N. E. D. O., Maciel, N. M., Lima-Ribeiro, M. S., Colli, G. R., Haddad, C. F. B., & Collevatti, R. G. (2019). Diversification of the widespread neotropical frog *Physalaemus cuvieri* in response to Neogene-Quaternary geological events and climate dynamics. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 132, 67–80. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.11.003>

Moutinho, M. F., De Almeida, E. A., Espíndola, E. L. G., Daam, M. A., & Schiesari, L. (2020). Herbicides employed in sugarcane plantations have lethal and sublethal effects to larval *Boana pardalis* (Amphibia, hylidae). *Ecotoxicology*, 29(7), 1043–1051. <https://doi.org/10.1007/s10646-020-02226-z>

Nascimento, Í. F., Guimarães, A. T. B., Ribeiro, F., Rodrigues, A. S. D. L., Estrela, F. N., Luz, T. M. D., & Malafaia, G. (2021). Polyethylene glycol acute and sub-lethal toxicity in neotropical *Physalaemus cuvieri* tadpoles (Anura, leptodactylidae). *Environmental Pollution*, 283, 117054. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117054>

OECD 474. OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS. Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. 2016.

Pavan, F. A., Samojeden, C. G., Rutkoski, C. F., Folador, A., Da Fré, S. P., Müller, C., Hartmann, P. A., & Hartmann, M. T. (2021). Morphological, behavioral and genotoxic effects of glyphosate and 2,4-D mixture in tadpoles of two native species of South American amphibians. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 85, 103637. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2021.103637>

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. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.04.045>

Pfeuffer, R. J. (2011). South Florida Water Management District ambient pesticide monitoring network: 1992 to 2007. *Environmental Monitoring and Assessment*, 182(1–4), 485–508. <https://doi.org/10.1007/s10661-011-1892-2>

Pinheiro, A., Silva, M., & 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. <https://doi.org/10.21168/rega.v7n2.p17-26>

Pollo, F. E., Bionda, C. L., Salinas, Z. A., Salas, N. E., & Martino, A. L. (2015). Common toad *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867) and its importance in assessing environmental health: Test of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes.

Environmental Monitoring and Assessment, 187(9), 581.
<https://doi.org/10.1007/s10661-015-4802-1>

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

Santos, G., Rutkoski, C. F., Folador, A., Skovronski, V. J., Müller, C., Pompermaier, A., Hartmann, P. A., & Hartmann, M. (2024). 2,4-D-based herbicide underdoses cause mortality, malformations, and nuclear abnormalities in *Physalaemus cuvieri* tadpoles. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 109840. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2024.109840>

Sarker, S., Akbor, Md. A., Nahar, A., Hasan, M., Islam, A. R. Md. T., & Siddique, Md. A. B. (2021). Level of pesticides contamination in the major river systems: A review on South Asian countries perspective. *Heliyon*, 7(6), p. 1-12.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07270>

Suárez, R. P., Zaccagnini, M. E., Babbitt, K. J., Calamari, N. C., Natale, G. S., Cerezo, A., Codugnello, N., Boca, T., Damonte, M. J., Vera-Candioti, J., & Gavier-Pizarro, G. I. (2016). Anuran responses to spatial patterns of agricultural landscapes in Argentina. *Landscape Ecology*, 31(10), 2485–2505. <https://doi.org/10.1007/s10980-016-0426-2>

Sun, Y., Cao, M., Wan, Y., Wang, H., Liu, J., Pan, F., He, W., Huang, H., & He, Z. (2020). Spatial variation of 2,4-D and MCPA in tap water and groundwater from China and their fate in source, treated, and tap water from Wuhan, Central China. *Science of The Total Environment*, 727, 138691.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138691>

Syafrudin, M., Kristanti, R. A., Yuniarto, A., Hadibarata, T., Rhee, J., Al-onazi, W. A., Algarni, T. S., Almarri, A. H., & Al-Mohaimed, A. M. (2021). Pesticides in drinking water—A review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(2), 468. <https://doi.org/10.3390/ijerph18020468>

Tang, F. H. M., Lenzen, M., McBratney, A., & Maggi, F. (2021). Risk of pesticide pollution at the global scale. *Nature Geoscience*, 14(4), 206–210.
<https://doi.org/10.1038/s41561-021-00712-5>

USEPA. 1998. Guidelines for ecological risk assessment. 11-1672-1663.
<https://www.epa.gov/risk/guidelines-ecological-risk-assessment>

Viriato, C., França, F. M., Santos, D. S., Marcantonio, A. S., Badaró-Pedroso, C., & Ferreira, C. M. (2021). Evaluation of the potential teratogenic and toxic effect of the herbicide 2,4-D (DMA® 806) in bullfrog embryos and tadpoles (*Lithobates catesbeianus*). *Chemosphere*, 266, 129018.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129018>

Wingen, N. M. D. A., Cubas, G. K., & Oliveira, G. T. (2023). Impact of 2,4-D and glyphosate-based herbicides on morphofunctional and biochemical markers in *Scinax*

squalirostris tadpoles (Anura, hylidae). Chemosphere, 340, 139918.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.139918>

CAPÍTULO 2 – HERBICIDA IMAZETAPIR É CITOTÓXICO E CAUSA DIMINUIÇÃO DE PESO EM GIRINOS DE *PHYSALAEMUS CUIVERI*

Resumo

Os ambientes aquáticos são um dos compartimentos ambientais que mais vem sendo impactos pela utilização de agrotóxicos na agricultura e, os anfíbios estão entre os vertebrados aquáticos que mais sofrem os efeitos dessas substâncias. O presente estudo avaliou os efeitos tóxicos de uma formulação comercial de imazetapir em girinos de *Physalaemus cuvieri* expostos as concentrações de 0, 1, 13, 57, 100, 200, 300 e 400 µg/L durante 14 dias. Todas as concentrações avaliadas causaram diminuição do peso corporal nos animais expostos. Não foram observadas alterações morfológicas significativas na boca e no intestino dos animais. Também, não foram observadas alterações na atividade natatória dos animais ao longo do experimento de exposição. Contudo, a formulação testada foi citotóxica a partir da concentração de 13 µg/L e apresentou risco ecológico crônico aos animais. Embora não tenha ocorrido aumento significativo na frequência de micronúcleos, houve aumento significativo na ocorrência de eritrócitos com núcleo entalhado e lobado. Com isso, os efeitos observados indicam que as concentrações ambientalmente realísticas testadas podem ser citotóxicas, afetar a saúde de *P. cuvieri* e prejudicar o seu desenvolvimento.

1. Introdução

O crescimento populacional impulsiona a expansão de terras e o uso de recursos naturais para a produção de alimentos (Viriato et al., 2021). Com isso, as práticas agrícolas também são intensificadas e conseqüentemente há um aumento no uso de agrotóxicos (Mesak et al., 2018). Porém, através da deriva, percolação ou escoamento (Pérez-Iglesias et al. 2020) os agrotóxicos utilizados na agricultura podem contaminar diferentes compartimentos ambientes como o solo e a água, podendo atingir organismos não-alvo (Monticelli Barizon et al., 2023). Além disso, a rápida expansão das práticas agrícolas e a contaminação do meio ambiente com agrotóxicos, fertilizantes e outros compostos químicos estão associados a perda de biodiversidade global, principalmente devido a degradação e destruição de habitats naturais (Curi et al., 2019; Freitas et al., 2022).

O imazetapir é um herbicida empregado mundialmente no controle de plantas daninhas em culturas de soja, trigo, cevada, alfafa, dentre outras, para o controle de plantas daninhas de folhas largas, principalmente para aquelas resistentes ao glifosato (Soloneski et al., 2017). Devido a sua toxicidade, alguns países da União Europeia, como Turquia e Ucrânia proibiram a sua utilização (PAN, 2022), no entanto, no Brasil o uso é permitido. Além disso, a nível federal não há legislação especificação o limite deste composto na água potável (Brasil, 2021), enquanto que o estado do Rio Grande do Sul permite até 1500 µg/L (Brasil, 2014).

Apesar dos anfíbios não serem alvo dos herbicidas, podem sofrer efeitos deletérios em função da exposição a estes compostos (Pavan et al., 2021; Herek et al., 2021). Isso é preocupante porque atualmente metade de todas as espécies de anfíbios correm risco de extinção e prevê-se um drástico declínio para esses animais, principalmente devido a poluição, destruição de habitats, doenças patogênicas, introdução de espécies invasoras e mudanças climáticas (Karlsson et al. 2021). Além disso, os anfíbios têm características diferenciadas que os tornam mais sensíveis aos contaminantes, como pele permeável e ciclo de vida aquático e terrestre (Pérez-Iglesias et al. 2020). *Physalaemus cuvieri* (Leptodactylidae) é uma espécie com distribuição na Argentina, Bolívia, Brasil, Guiana, Paraguai, Uruguai e Venezuela (Frost, 2024), cuja reprodução ocorre dos meses de setembro a março (Bastos et al., 2003), sendo que os indivíduos depositam seus ovos diretamente na água, podendo

ocorrer em ambientes aquáticos temporários em áreas antropizadas ou não antropizadas (Mijares et al., 2010). Nos últimos anos esta espécie vem se mostrando ser um bom organismo-modelo em estudos de ecotoxicologia para avaliar os efeitos de agrotóxicos (Wrubleswski et al., 2018; Herek et al., 2020; Herek et al., 2021; Samojeden et al., 2022).

Para avaliar a toxicidade de agrotóxicos em anfíbios podem ser utilizadas diferentes ferramentas como os marcadores de genotoxicidade (Carvalho et al., 2019). O teste de micronúcleo é uma dessas ferramentas e vem sendo utilizado para avaliar danos no DNA de anfíbios oriundos de impactos ambientais (Benvindo-Souza et al., 2020). Muitos agrotóxicos podem causar danos ao DNA de girinos (Lajmanovich et al., 2014; Herek et al., 2020, 2021; Macagnan et al., 2023), no entanto, especialmente para o herbicida imazetapir são escassos os estudos avaliando os efeitos que o agrotóxico causa em animais não alvo (Soloneski et al., 2017), sobretudo em girinos de anfíbios. Até o momento os estudos que avaliaram a cito-genotoxicidade deste composto em girinos são recentes. Pérez-Iglesias et al (2015) demonstraram que uma formulação comercial a base de Imazetapir causou aumento de mortalidade e de ANEs e micronúcleo em girinos de *Hypsiboas pulchellus*. Além disso, efeitos similares de genotoxicidade foram observados em girinos de *Rhinella arenarum* (Carvalho et al., 2019) e em *Leptodactylus latinasus* (Pérez-Iglesias et al., 2020).

Diante do exposto, faz-se necessária a realização de estudos com espécies que podem estar expostas a este herbicida em seu habitat. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de uma formulação comercial de imazetapir na sobrevivência, no crescimento e na genotoxicidade em girinos de *P. cuvieri*.

Metodologia

2.1 Organismo modelo

As desovas de *Physalaemus cuvieri* foram coletadas em uma lagoa em área preserva por mata ciliar e longe de áreas agricultáveis, localizada no município de Erechim, estado do Rio Grande do sul – Brasil (Latitude: 27°43' 46,11" Sul; Longitude: 52°16' 54,40" Oeste). As desovas foram transportadas, em sacos plásticos até o laboratório e dispostas em água reconstituída (ASTM E1439-12), em aquários de vidro (15 L), até atingirem o estágio de desenvolvimento adequado. O estágio de

desenvolvimento estabelecido para teste foi o estágio 25 (Gosner, 1960). A cada 24 horas os animais foram alimentados com ração comercial completa para peixes em flocos (Alcon Basic®) e alface orgânica.

2.2 Agrotóxico

Foi utilizada uma formulação comercial do herbicida imazetapir denominada Imazetapir Nortox, registrada no Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) sob. n° 16620. De acordo com as informações do fabricante, a formulação contém 212 g/L de Imazetapir Sal de amônio, 200 g/L de equivalente ácido de imazetapir e 874 g/L de ingredientes inertes. Uma solução estoque foi feita utilizando-se água destilada, na concentração de 500 mg/L, e posteriormente, calculou-se o volume necessário a ser pipetado nos aquários para a obtenção das concentrações de 1, 13, 57, 100, 200, 300 e 400 µg/L. As concentrações testadas podem ser encontradas no ambiente e foram baseadas em dados da literatura (Brasil, 2014; Almeida et al., 2019; EPA, 2002).

1.3 Design experimental

A água utilizada para aclimação e no ensaio de toxicidade foi preparada seguindo as orientações descritas na ASTM E1439-12/2012, denominada solução FETAX. A solução foi composta por 625 mg de NaCl, 96 mg de NaHCO₃, 30 mg de KCl, 15 mg de CaCl₂, 60 mg de CaSO₄ · 2H₂O e 75 mg de MgSO₄ por litro de água destilada, com pH de 7,0 a 7,5. Os parâmetros de qualidade da água (físicos e químicos) foram monitorados a cada cinco dias, para garantir os níveis de qualidade. A temperatura e oxigênio foram medidos diariamente, a oxigenação foi feita artificialmente com compressores de aeração de aquários para peixes. O ensaio de toxicidade crônica foi realizado na temperatura de 23°C e teve duração de 14 dias. Foram utilizados três aquários de vidro por tratamento (n=3), sendo que cada aquário continha 10 girinos em estágio de desenvolvimento 25 (Gosner, 1960), 500 ml de água (solução FETAX) e a respectiva concentração do herbicida definida ou somente água no caso do grupo controle. No total, foram expostos 30 girinos por tratamento. Os parâmetros de pH e a amônia foram monitorados diariamente, e a cada 120 horas foi realizada a substituição da água dos aquários e a reuplicação das concentrações do

agrotóxico. Durante o ensaio, os girinos foram alimentados diariamente com a mesma alimentação da criação (ração comercial para peixes e alface orgânica).

2.4 Sobrevivência, morfologia e crescimento

A mortalidade foi avaliada a cada 24 horas, sendo que os girinos mortos foram contabilizados e retirados do aquário. Para avaliar o crescimento os girinos foram medidos e pesados no início e no final do experimento. Um paquímetro Universal Analógico Mitutoyo 530-140BR e uma balança digital SHIMADZU modelo UX620H foram utilizados para realizar a medição e a pesagem, respectivamente. Após, foi calculada a variação de peso e comprimento dos animais. A ocorrência de malformações na boca, intestino e cauda, bem como a presença de edemas foi verificada no final do ensaio (14 dias). Todos os animais foram observados em estereomicroscópio binocular (Nikon SMZ 745T) e fotografados com uma câmara acoplada ao mesmo. As estruturas corporais analisadas foram: (a) boca (ausência de queratodontes), (b) morfologia do intestino, (c) curvatura da cauda (e) presença de edema no corpo.

2.5 Atividade natatória

A atividade natatória foi observada e registrada em vídeo no 1º (primeiro), 7º (sétimo) e 14º (décimo quarto) dia do ensaio e analisada visualmente posteriormente. Foi feito um estímulo com bastão de vidro em cada unidade experimental, mexendo devagar a água três vezes. Após, foi realizada uma gravação em vídeo da movimentação dos girinos, por 30 segundos. Essas gravações foram avaliadas em relação a três parâmetros comportamentais: (1) atividade normal, considerada a atividade do controle; (2) atividade igual a do controle; (3) letargia, ou atividade natatória menor que o controle; (4) hiperatividade, ou atividade natatória maior do controle; e (5) espasmos. Cada um desses parâmetros foi analisado separadamente, contando o número de girinos em cada unidade experimental que apresentou o comportamento no momento da avaliação. Para definir quantos girinos apresentaram alterações na atividade natatória, realizou-se a soma da quantidade de girinos que apresentaram letargia, hiperatividade, espasmos ou imobilidade, e classificou-se como atividade natatória irregular.

2.6 Anormalidades nucleares

Ao final do experimento, os animais foram eutanasiados com lidocaína a 5% (50 mg/g), de acordo com o CONCEA (2018). Uma gota de sangue foi retirada diretamente do coração, utilizando-se agulhas e seringas de insulina previamente heparinizadas. O sangue foi depositado em lâminas de vidro e foi feito o esfregaço. As lâminas permaneceram secando por 12 h, e posteriormente foram coradas utilizando o kit Panótico rápido (Laborclin Ltda, Brasil), segundo as instruções do fabricante.

A presença de anormalidades nucleares nos eritrócitos (ANEs) foi verificada em 1000 eritrócitos por lâmina, incluindo micronúcleos, utilizando-se um microscópio óptico (resolução de 100x). As ANEs avaliadas foram micronúcleo, apoptose, célula binucleada, núcleo com bolha, cariólise, núcleo lobado, núcleo entalhado, núcleo vacuolizado e célula anucleada, de acordo com Lajmanovich et al (2015).

2.7 Análise estatística e Análise de Risco Ecológico

Os testes de *Shapiro-Wilk* e *Bartlett* foram utilizados para avaliar a normalidade e homogeneidade dos dados, respectivamente. A *Anova One-Way* e teste de *Tukey* foram utilizados para dados paramétricos. Para dados não paramétricos foi usado o teste de *Kruskal-Wallis*, seguido do teste de *Dunn*. O nível de confiança utilizado foi de 95% ($p < 0,05$). As análises foram feitas no software *GraphPad Prism* 6.01. Com base nos resultados estatísticos definiu-se a concentração de efeito adverso não observado (em inglês - No observed adverse effect concentration; NOEC) e o nível mais baixo de efeito adverso observado (em inglês - lowest observed adverse effect level; LOEL) para os *endpoints* que apresentaram diferença significativa em relação ao controle. A concentração tóxica máxima aceitável (em inglês: maximum acceptable toxicant concentration - MATC) foi determinada matematicamente como a média geométrica de NOEC e LOEL. Os dados de NOEC, LOEL e MATC foram utilizados para análise de risco ecológico. O risco ecológico foi calculado pelo quociente de risco crônico (CHQ), de acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, 1998). O CHQ é baseado na concentração ambiental estimada (CAE) e na NOEC, calculado como CAE/NOEC. Como CAE foi utilizada a máxima concentração de imazetapir permitida

na água potável pelo estado do Rio Grande do Sul, 1500 µg/L (Brasil, 2014) e como NOEC para a máxima concentração utilizada neste estudo, 400 µg/L. Os resultados de CHQ foram comparados com os níveis de preocupação adotados pela USEPA (1998). O valor estabelecido para o risco crônico é 1, isto é, se o resultado do risco foi maior que 1 (>1) existe risco crônico.

2. Resultados

3.1 Efeitos na sobrevivência, morfologia e tamanho do corpo

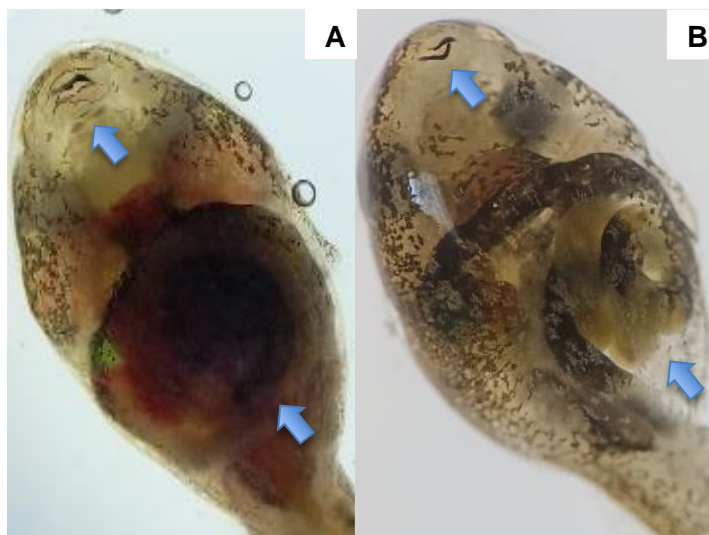
A sobrevivência dos girinos de *P. cuvieri* (Tabela 1) não foi afetada significativamente ($K_{8,24}=13,69$; $p=0,0569$) em relação ao controle após 14 dias de exposição a formulação comercial do herbicida imazetapir. A maior mortalidade foi observada na concentração de 400 µg/L, havendo 83,3% de animais sobreviventes. Alterações na boca e no intestino (Tabela 1) como redução na quantidade e/ou ausência de queratodontes e intestino com formato não-espiral foram observadas em quase todas as concentrações, exceto em 100 e 400 µg/L no caso da boca e em 300 e 400 µg/L para o intestino. Porém, não houve diferença significativa em relação ao controle tanto para as alterações na boca ($K_{8,24}=12,24$; $p=0,0929$) quanto no intestino ($K_{8,24}=9,262$; $p=0,2344$). Em todas as concentrações os girinos apresentaram diminuição significativa ($F_{7,16}=26,71$; $p<0,0001$) do peso corporal (Tabela 1) em relação ao controle, porém, não houve diferença significativa ($F_{7,16} = 0,4019$; $p=0,8874$) no comprimento do corpo em relação ao controle (Tabela 1).

Tabela 1 – Sobrevivência, parâmetros morfológicos e de crescimento em girinos *P. cuvieri* expostos a formulação comercial de Imazetapir. A porcentagem de malformações é calculada sob a quantidade de girinos vivos. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de *Tukey/Dunn*.

Concentração (µg/L)	Sobrevivência (%)	N° de girinos analisados	N° de girinos com alteração na boca	N° de girinos com alteração no intestino	Peso corporal (g)	Comprimento (mm)
0	93,3 ^a	28	0 ^a	1 (3,57%) ^a	0,22 ± 0,04 ^a	17,82 ± 1,83 ^a
1	90,0 ^a	27	5 (18,51%) ^a	4 (14,81%) ^a	0,06 ± 0,02^b	17,97 ± 2,12 ^a
13	90,0 ^a	27	3 (11,11%) ^a	3 (11,11%) ^a	0,05 ± 0,01^b	16,96 ± 2,08 ^a
57	96,7 ^a	29	5 (18,51%) ^a	3 (10,34%) ^a	0,05 ± 0,01^b	17,96 ± 2,12 ^a
100	96,7 ^a	29	0 ^a	1 (3,44%) ^a	0,06 ± 0,01^b	17,98 ± 1,73 ^a
200	90,0 ^a	27	1 (3,70%) ^a	2 (7,40%) ^a	0,06 ± 0,01^b	16,76 ± 5,05 ^a
300	93,3 ^a	28	1 (3,70%) ^a	0 ^a	0,07 ± 0,003^b	16,81 ± 4,67 ^a
400	83,3 ^a	25	0 ^a	0 ^a	0,06 ± 0,02^b	17,74 ± 2,02 ^a

Fonte: Autor, 2023.

Figura 2 – Alterações observadas na boca e no intestino de girinos de *Physalaemus cuvieri*. A: Controle; B: Boca parcialmente sem queratodontes e intestino em formato não-espiral.



Fonte: Autor, 2023.

3.2 Atividade natatória

Os girinos expostos ao imazetapir não apresentaram alterações significativas ($p > 0,05$) na atividade natatória (Tabela 2), como letargia e hiperatividade, ao longo do experimento de exposição, ou seja, no início (0 dias), meio (7 dias) e final (14 dias) do experimento. Não foi observada a ocorrência de espasmos nos animais ao longo do experimento.

Tabela 2 - Atividade natatória de girinos de *Physalaemus cuvieri* expostos a Imazetapir.

Concentração ($\mu\text{g/L}$)	Número de girinos com Letargia			Número de girinos com Hiperatividade		
	0 (Dias)	7 (Dias)	14 (Dias)	0 (Dias)	7 (Dias)	14 (Dias)
Controle	1 ^a	1 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	0 ^a
1	1 ^a	0 ^a	1 ^a	4 ^a	1 ^a	1 ^a
13	0 ^a	1 ^a	0 ^a	2 ^a	0 ^a	0 ^a
57	1 ^a	1 ^a	2 ^a	4 ^a	1 ^a	1 ^a
100	1 ^a	3 ^a	2 ^a	2 ^a	2 ^a	2 ^a
200	1 ^a	1 ^a	0 ^a	6 ^a	2 ^a	2 ^a
300	2 ^a	0 ^a	0 ^a	3 ^a	3 ^a	3 ^a
400	0 ^a	0 ^a	1 ^a	4 ^a	4 ^a	4 ^a

Fonte: Autor, 2023.

2.3 Análise de anormalidades eritrocitárias (ANEs) e micronúcleo

As anormalidades nucleares eritrocitárias observadas nos tratamentos foram célula binucleada, anucleada, entalhada, vacuolizada, lobada, núcleo com broto, cariólise, apoptose e micronúcleo (Tabela 3). A partir da concentração de 13 µg/L houve aumento significativo ($F_{7, 16} = 4,737$; $p=0,0048$) em relação ao controle na frequência eritrócitos com núcleo entalhado (Tabela 3). Também ocorreu aumento significativo ($F_{7,16}=8,756$; $p = 0,0002$) no núcleo lobado nas três maiores concentrações avaliadas (Tabela 3). Para as demais ANEs e micronúcleo não ocorreram alterações significativas em relação ao controle ($p>0.05$).

Tabela 3 - Anormalidades nucleares de eritrócitos (ANE's) encontradas em girinos de *P. Cuvieri* expostos as concentrações de 0 (Controle), 1, 13, 57, 100, 200, 300 e 400 µg/L do herbicida imazetapir. Os dados representam média ± erro padrão, valor mínimo-máximo. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de *Tukey/Dunn* ($p < 0,05$).

Anomalia	Concentração µg/L							
	0	1	13	57	100	200	300	400
Anucleada	0.2 ± 0.3 ^a 0-1	0 ^a	0 ^a	0.1 ± 0.2 ^a 0-1	0 ^a	0 ^a	0.2 ± 0.2 ^a 0-1	0.1 ± 0.2 ^a 0-1
Apoptose	0 ^a	0.3 ± 0.6 ^a 0-1	0.2 ± 0.3 ^a 0-1	0.5 ± 0.2 ^a 0-1	0.6 ± 0.4 ^a 0-1	1.5 ± 0.8 ^a 0-4	0.9 ± 0.7 ^a 0-4	0.8 ± 1.4 ^a 0-3
Binucleada	0 ± 0 ^a	0.8 ± 0.3 ^a 0-2	0 ^a	0.1 ± 0.1 ^a 0-1	0.2 ± 0.3 ^a 0-1	0.5 ± 0.2 ^a 0-1	0.7 ± 0.3 ^a 0-2	0.6 ± 0.4 ^a 0-2
Broto	0.6 ± 0.3 ^a 0-1	6.8 ± 5.1 ^a 9-13	7.2 ± 1.9 ^a 4-24	3.8 ± 0.8 ^a 2-7	3.8 ± 0.7 ^a 2-5	3.0 ± 0.9 ^a 1-5	4.8 ± 2.4 ^a 0-7	5.5 ± 3.3 ^a 0-12
Cariólise	0 ^a	0.3 ± 0.6 ^a 0-1	0 ^a	0.1 ± 0.2 ^a 0-1	0 ^a	0.1 ± 0.2 ^a 0-1	0.1 ± 0.2 ^a 0-1	0 ^a
Entalhada	1.5 ± 0.5 ^a 1-3	9.1 ± 4.6 ^a 1-14	12.5 ± 3.9^b 5-26	12.5 ± 3.9^b 3-28	10.1 ± 1.8^b 6-18	11.0 ± 1.5^b 5-17	11.7 ± 2.1^b 5-16	12.9 ± 2.9^b 3-21
Lobada	1.2 ± 0.3 ^a 1-2	14.5 ± 3.5 ^{a,b} 6-23	10.1 ± 3.4 ^{a,b} 5-17	7.9 ± 0.7 ^{a,b} 2-12	22.4 ± 3.5 ^{a,b} 9-27	24.2 ± 7.7^{b,c} 10-30	35.8 ± 19.2^c 2-100	38.8 ± 5.0^c 7-55
Micronúcleo	0.2 ± 0.3 ^a 0-1	1.7 ± 1.4 ^a 1-3	2.1 ± 1.1 ^a 1-5	1.2 ± 0.7 ^a 0-2	1.1 ± 0.7 ^a 0-2	1.3 ± 0.3 ^a 0-3	0.9 ± 0.7 ^a 0-2	1.8 ± 1.4 ^a 1-3
Vacuolizada	0 ^a	0.4 ± 0.5 ^a 1-3	0.5 ± 0.5 ^a 0-2	0 ^a	0.6 ± 0.5 ^a 0-3	0.3 ± 0.3 ^a 0-2	0.4 ± 0.4 ^a 0-2	0.2 ± 0.3 ^a 0-2
Nº células analisadas	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000
Total de ANEs (%)	0.12	1.02	0.96	0.80	1.15	1.26	1.66	1.82

Fonte: Autor, 2023.

3.4 Risco ecológico

O NOEC variou de 1 a 100 µg/L, o LOEC de 1 a 200 µg/L e a MATC de 3,60 a 141,42 µg/L (Tabela 4). O quociente de risco crônico variou de 15 a 1500 (Tabela 4), sendo maior para o *endpoint* entalhado.

Tabela 4 - Valores de concentração de efeito não observado (NOEC), concentração de efeito observado (LOEC), máxima concentração aceitável de toxicante (MATC) e quociente de risco crônico (CHQ) para os *endpoints* peso, anormalidades eritrocitárias (ANEs) e micronúcleo

Endpoint	NOEC (µg/L)	LOEC (µg/L)	MATC (µg/L)	CHQ [] Ambiente	CHQ [] Estudo
Peso corporal	*	1	*	*	
Entalhada	1	13	3,60	1500	400
Lobada	100	200	141,42	15	4

Fonte: Autor, 2023.

*: Espaços em branco pelo fato de não haver NOEC e não ser possível calcular o MATC e CHQ.

3. Discussão

A exposição de girinos de *P. cuvieri* ao imazetapir causou alterações no crescimento e genotoxicidade, embora a sobrevivência, a morfologia da boca e do intestino e a atividade natatória não tenham sido comprometidas. Em condições de estresse, como exposição a contaminantes, o metabolismo e o crescimento dos animais podem ser alterados devido aos esforços realizados pelos animais para sobreviver no ambiente contaminado (DiGiacopo; Hua, 2020). Além disso, alterações no metabolismo lipídico afetam o metabolismo energético dos girinos e podem comprometer o seu desenvolvimento (Bender et al., 2018). A perda de peso corporal observada em todas as concentrações pode sugerir que os animais gastaram recursos para tolerar o ambiente contaminado pelo herbicida, havendo redução de recursos para o crescimento, como sugerido por DiGiacopo e Hua (2020). Já a ausência de alterações morfológicas na boca e no intestino podem estar relacionadas com a sensibilidade da espécie estudada e com a toxicidade da formulação comercial utilizada no ensaio de toxicidade. Pérez-Iglesias et al. (2015) observaram que girinos

de *Hypsiboas pulchellus* (Anura, Hylidae) expostos a 410 µg/L de outra formulação comercial de imazetapir apresentaram redução de queratodontes na boca.

O herbicida estudado também demonstrou potencial citotóxico aos girinos de *P. cuvieri*, devido ao aumento da frequência de eritrócitos com núcleo entalhado e lobado. O mecanismo exato da formação de eritrócitos com núcleo entalhado e lobado ainda é desconhecido (Pollo et al., 2015; Braham et al., 2017), porém, as presenças destas anormalidades podem servir como precursoras para a formação de micronúcleo (Amaral et al. 2019), embora não observado de forma significativa neste estudo. A ocorrência de ANEs e MNs pode ser ocasionada pelo excesso de espécies reativas ao oxigênio gerado após a exposição a contaminantes, que pode resultar em estresse oxidativo e danificar moléculas como o DNA (Svartz et al., 2020). Apesar de neste estudo não terem sido avaliados estes marcadores, sugere-se que o herbicida testado possa ter alterado parâmetros de estresse oxidativo, o que resultou nas ANEs observadas, no entanto, mais estudos são necessários para verificar se isso ocorre de fato.

O potencial cito-genotóxico do imazetapir foi demonstrado em poucos estudos até o momento. Girinos de *Hypsiboas pulchellus* expostos por 48 horas a 390 e 780 µg/L de outra formulação comercial de imazetapir não apresentaram aumento significativo na frequência de micronúcleos, porém, em 96 horas de exposição sim, inclusive apresentaram aumento na frequência de eritrócitos entalhados e lobados (Pérez-Iglesias et al., 2015). A ocorrência destas mesmas anormalidades eritrocitárias foi observada em girinos de *Leptodactylus latinasus* expostos a outra formulação comercial de imazetapir a partir da concentração de 220 µg/L e em 48 horas de exposição (Pérez-Iglesias et al., 2020). Danos no DNA detectados pelo ensaio cometa também foram relatados em girinos de *Rhinella arenarum* expostos a uma formulação comercial de imazetapir (Carvalho et al., 2019). Imazetapir não foi potencialmente genotóxico para *P. cuvieri*, pois ocorreu um baixo número de micronúcleos e não houve diferença entre os girinos expostos as diferentes concentrações. No entanto, núcleos lobados poderiam ser precursores de micronúcleos, e representam um processo para eliminar genes amplificados dos núcleos (Strunjak-Perovic et al., 2009). A formação de núcleos lobados ocorre na fase S do ciclo celular durante o processo de eliminação do material genético extra do núcleo (Canedo et al., 2021). O aparecimento significativo de núcleos lobados e entalhados demonstra que houve

ruptura na maquinaria celular dos girinos de *P. cuvieri* expostos a Imazetapir, portanto, esse herbicida foi citotóxico para esse anfíbio. Os danos no material genético podem ter consequências biológicas, resultando na diminuição da capacidade do organismo de sobreviver sob condições estressantes (Zhelev et al., 2022). Sugere-se, portanto, que essas duas anormalidades nucleares são biomarcadores sensíveis para avaliar a citotoxicidade na exposição crônica de anfíbios a imazetapir.

O agrotóxico Imazetapir apresentou risco crônico, pois os valores foram maiores que 1 (>1), conforme estabelecido pela USEPA (1998). Isso é preocupante, visto que as concentrações estudadas podem ser encontradas no ambiente e a legislação do Rio Grande do Sul permite 1500 µg/L de imazetapir na água de consumo humano (Brasil, 2014). A nível federal, a legislação brasileira não define nível máximo aceitável na água (Brasil, 2021). Além disso, são escassos os estudos monitorando concentrações deste agrotóxico na água. No Brasil foram detectadas por exemplo concentrações de 0,025 µg/L (Caldas et al., 2018), 0,58 µg/L (Perin et al., 2021) e 6,54 µg/L em águas superficiais (Almeida et al., 2019). Porém, a EPA estimou a ocorrência de imazetapir em águas superficiais na concentração de 93,18 µg/L (EPA, 2002). Com isso, os efeitos tóxicos causados pela formulação estudada foram observados em concentrações menores das encontradas no ambiente (exemplo: a redução de peso corporal dos girinos a partir de 1 µg/L) e da prevista na legislação do Rio Grande do Sul, indicando a necessidade de estudos com vários organismos não alvo e uma indicação de limites para esse herbicida em leis federais, baseados em concentrações seguras para a vida silvestre.

4. Conclusão

A formulação comercial estudada afetou negativamente o peso dos girinos de *P. cuvieri*, foi citotóxica e apresentou risco crônico. Além disso, as concentrações estudadas podem ocorrer na natureza, porém, seus efeitos são poucos estudados em anfíbios. Com isso, os resultados deste estudo mostram os potenciais riscos do imazetapir a uma espécie de anfíbio nativa, que pode ser exposta a esse contaminante principalmente na fase larval, podendo ter sua saúde e desenvolvimento comprometidos.

REFERÊNCIAS

Almeida, M., Madeira, T., Watanabe, L., Meletti, P.C., Nixdorf, S.L., 2019. Pesticide Determination in Water Samples from a Rural Area by Multi-Target Method Applying Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J. Braz. Chem. Soc.* <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190066>

Amaral, D.F. do, Montalvão, M.F., De Oliveira Mendes, B., Da Costa Araújo, A.P., De Lima Rodrigues, A.S., Malafaia, G., 2019. Sub-lethal effects induced by a mixture of different pharmaceutical drugs in predicted environmentally relevant concentrations on *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) (Anura, ranidae) tadpoles. *Environ Sci Pollut Res* 26, 600–616. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3656-9>

Bastos, R.P., Motta, J.A.O., Lima, L.P., Guimarães, L.D. 2003. Anfíbios da Floresta Nacional de Silvânia, Estado de Goiás. Goiânia, R.P. Bastos.

Battaglin, W.A., Furlong, E.T., Burkhardt, M.R., Peter, C.J., 2000. Occurrence of sulfonamide, sulfonamide, imidazolinone, and other herbicides in rivers, reservoirs and ground water in the Midwestern United States, 1998. *Science of The Total Environment* 248, 123–133. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00536-7](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00536-7)

Bender, M.C., Hu, C., Pelletier, C., Denver, R.J., 2018. To eat or not to eat: ontogeny of hypothalamic feeding controls and a role for leptin in modulating life-history transition in amphibian tadpoles. *Proc. R. Soc. B.* 285, 20172784. <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.2784>

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., 2020. Micronucleus test in tadpole erythrocytes: Trends in studies and new paths. *Chemosphere* 240, 124910. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124910>

Braham, R.P., Blazer, V.S., Shaw, C.H., Mazik, P.M., 2017. Micronuclei and other erythrocyte nuclear abnormalities in fishes from the Great Lakes Basin, USA. *Environ and Mol Mutagen* 58, 570–581. <https://doi.org/10.1002/em.22123>

Brasil. Portaria GM/MS nº 888, de 4 de maio de 2021. 2021. Ministério da Saúde. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2021/prt0888_07_05_2021.html. Acesso em: 12 nov. 2023

Brasil. Secretaria estadual da saúde RS. Portaria SES RS nº 320, de 28 de abril de 2014. Disponível em: <https://saude.rs.gov.br/upload/arquivos/202009/30100210-portaria-n-320-2014.pdf>. Acesso em: nov. 2023.

Caldas, S., Arias, J., Rombaldi, C., Mello, L., Cerqueira, M., Martins, A., Primel, E., 2018. Occurrence of Pesticides and PPCPs in Surface and Drinking Water in Southern Brazil: Data on 4-Year Monitoring. *J. Braz. Chem. Soc.* <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20180154>

Canedo, A., De Jesus, L.W.O., Bailão, E.F.L.C., Rocha, T.L., 2021. Micronucleus test and nuclear abnormality assay in zebrafish (*Danio rerio*): Past, present, and future trends. *Environmental Pollution* 290, 118019. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118019>

Carvalho, W.F., Ruiz De Arcaute, C., Pérez-Iglesias, J.M., Laborde, M.R.R., Soloneski, S., Larramendy, M.L., 2019. DNA damage exerted by mixtures of commercial formulations of glyphosate and imazethapyr herbicides in *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) tadpoles. *Ecotoxicology* 28, 367–377. <https://doi.org/10.1007/s10646-019-02029-x>

DiGiacopo, D.G., Hua, J., 2020. Evaluating the fitness consequences of plasticity in tolerance to pesticides. *Ecology and Evolution* 10, 4448–4456. <https://doi.org/10.1002/ece3.6211>

EPA. Environmental Protection Agency. Imazethapyr; Pesticide Tolerance. Disponível em: <https://www.federalregister.gov/documents/2002/08/29/02-22093/imazethapyr-pesticide-tolerance>. Acesso em: 20 out. 2022.

Freitas, J. S., Da Silva Pinto, T.J., Cardoso Yoshii, M.P., Conceição Menezes Da Silva, L., De Palma Lopes, L.F., Pretti Ogura, A., Giroto, L., Montagner, C.C., De

Oliveira Gonçalves Alho, L., Castelhana Gebara, R., Schiesari, L., Gaeta Espíndola, E.L., 2022. Realistic exposure to fipronil, 2,4-D, vinasse and their mixtures impair larval amphibian physiology. *Environmental Pollution* 299, 118894. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.118894>

Frost, Darrel R. 1999. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.2 (Date of access). Electronic Database accessible at <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.php>. American Museum of Natural History, New York, USA. doi.org/10.5531/db.vz.0001

Ghisi, N.D.C., Oliveira, E.C.D., Prioli, A.J., 2016. Does exposure to glyphosate lead to an increase in the micronuclei frequency? A systematic and meta-analytic review. *Chemosphere* 145, 42–54. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.11.044>

Herek, J.S., Vargas, L., Rinas Trindade, S.A., Rutkoski, C.F., Macagnan, N., Hartmann, P.A., Hartmann, M.T., 2021. Genotoxic effects of glyphosate on *Physalaemus* tadpoles. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 81, 103516. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103516>

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). *Environ Sci Pollut Res* 27, 22619–22630. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08869-z>

Lajmanovich, R.C., Cabagna-Zenklusen, M.C., Attademo, A.M., Junges, C.M., Peltzer, P.M., Bassó, A., Lorenzatti, E., 2014. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in tadpoles of the common toad (*Rhinella arenarum*) treated with the herbicides Liberty® and glufosinate-ammonium. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, 769, 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2014.04.009>

Macagnan, N., Rutkoski, C.F., Folador, A., Skovronski, V.J., Müller, C., Hartmann, P.A., Hartmann, M., 2023. Mortality and toxicity of a commercial formulation

of cypermethrin in *Physalaemus gracilis* tadpoles. *Sci Rep* 13, 17826. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-45090-7>

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, 15235–15244. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1979-1>

Mijares A, Rodrigues MT, Baldo D (2010) *Physalaemus cuvieri*. IUCN 2023. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2022-2. <<https://www.iucnredlist.org>>

Monticelli Barizon, R.R., Kummrow, F., Fernandes De Albuquerque, A., Assalin, M.R., Rosa, M.A., Cassoli De Souza Dutra, D.R., Almeida Pazianotto, R.A., 2022. Surface water contamination from pesticide mixtures and risks to aquatic life in a high-input agricultural region of Brazil. *Chemosphere* 308, 136400. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136400>

PAN. Pesticide Action Network. International Consolidated List Of Banned Pesticides. 6th Edition, May 2022 .

Pavan, F. A., Samojeden, C. G., Rutkoski, C. F., Folador, A., Da Fré, S. P., Müller, C., Hartmann, P. A., & Hartmann, M. T. (2021). Morphological, behavioral and genotoxic effects of glyphosate and 2,4-D mixture in tadpoles of two native species of South American amphibians. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 85, 103637. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2021.103637>

Pérez-Iglesias, J.M., Brodeur, J.C., Larramendy, M.L., 2020. An imazethapyr-based herbicide formulation induces genotoxic, biochemical, and individual organizational effects in *Leptodactylus latinasus* tadpoles (Anura: Leptodactylidae). *Environ Sci Pollut Res* 27, 2131–2143. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06880-7>

Perin, M., Dallegrave, A., Suchecki Barnet, L., Zanchetti Meneghini, L., De Araújo Gomes, A., Pizzolato, T.M., 2021. Pharmaceuticals, pesticides and metals/metalloids in Lake Guaíba in Southern Brazil: Spatial and temporal evaluation

and a chemometrics approach. *Science of The Total Environment* 793, 148561. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148561>

Pollo, F.E., Bionda, C.L., Salinas, Z.A., Salas, N.E., Martino, A.L., 2015. Common toad *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867) and its importance in assessing environmental health: test of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes. *Environ Monit Assess* 187, 581. <https://doi.org/10.1007/s10661-015-4802-1>

Samojeden, C.G., Pavan, F.A., Rutkoski, C.F., Folador, A., Da Fré, S.P., Müller, C., Hartmann, P.A., Hartmann, M., 2022. Toxicity and genotoxicity of imidacloprid in the tadpoles of *Leptodactylus luctator* and *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leptodactylidae). *Sci Rep* 12, 11926. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-16039-z>

Soloneski, S., Ruiz De Arcaute, C., Nikoloff, N., Larramendy, M.L., 2017. Genotoxicity of the herbicide imazethapyr in mammalian cells by oxidative DNA damage evaluation using the Endo III and FPG alkaline comet assays. *Environ Sci Pollut Res* 24, 10292–10300. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8666-5>

Strunjak-Perovic, I., Topic Popovic, N., Coz-Rakovac, R., Jadan, M., 2009. Nuclear abnormalities of marine fish erythrocytes. *Journal of Fish Biology* 74, 2239–2249. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2009.02232.x>

Svartz, G., Aronzon, C., Pérez Catán, S., Soloneski, S., & Pérez Coll, C. (2020). Oxidative stress and genotoxicity in *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) tadpoles after acute exposure to Ni-Al nanoceramics. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 80, 103508. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103508>

Viriato, C., França, F.M., Santos, D.S., Marcantonio, A.S., Badaró-Pedroso, C., Ferreira, C.M., 2021. Evaluation of the potential teratogenic and toxic effect of the herbicide 2,4-D (DMA® 806) in bullfrog embryos and tadpoles (*Lithobates catesbeianus*). *Chemosphere* 266, 129018. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129018>

Wrubleswski, J., Reichert, F.W., Galon, L., Hartmann, P.A., Hartmann, M.T., 2018. Acute and chronic toxicity of pesticides on tadpoles of *Physalaemus cuvieri*

(Anura, Leptodactylidae). *Ecotoxicology* 27, 360–368. <https://doi.org/10.1007/s10646-018-1900-1>

Zhelev, Z., Arnaudova, D., Tsonev, S. 2022. Genotoxicity and Erythrocyte Nuclear Abnormalities in *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) (Anura: Ranidae) in an Industrial Area in Southern Bulgaria: Evaluation as Biomarkers for Ecological Stress Assessment. *Acta Zoologica Bulgarica* 74, 59-67. <http://www.acta-zoologica-bulgarica.eu/2022/002549>