UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL – UFFS

CAMPUS ERECHIM

CURSO DE ENGENHARIA AMBIENTAL

JÉSSICA GRACIELA SLAVIERO

EFEITOS DA TOXICIDADE CRÔNICA DO INSETICIDA CIPERMETRINA EM GIRINOS DE *Physalaemus gracilis* (AMPHIBIA, ANURA)

ERECHIM

2017

JÉSSICA GRACIELA SLAVIERO

EFEITOS DA TOXICIDADE CRÔNICA DO INSETICIDA CIPERMETRINA EM GIRINOS DE *Physalaemus gracilis* (AMPHIBIA, ANURA)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado na Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS – *Campus* de Erechim, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Ambiental e Sanitária sob a orientação da Profª Dra. Marilia Teresinha Hartmann.

ERECHIM

2017

JÉSSICA GRACIELA SLAVIERO

EFEITOS DA TOXICIDADE CRÔNICA DO INSETICIDA CIPERMETRINA EM GIRINOS DE *Physalaemus gracilis* (AMPHIBIA, ANURA)

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação apresentado como requisito para obtenção de grau de Bacharel em Engenharia Ambiental e Sanitária pela Universidade da Fronteira Sul.

Orientadora: Profª Dra. Marilia Teresinha Hartmann

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em: 07/07/2017.

BANCA EXAMINADORA:

Profª. Dra. Marilia Teresinha Hartmann – UFFS
Orientadora

Profº. Dr. Paulo Afonso Hartmann – UFFS
Professor

Profº. Me. Guilherme Victor Vanzetto - IDEAU
Engenheiro Ambiental

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por conseguir chegar ao fim desta etapa.

À minha orientadora, Professora Marilia T. Hartmann pela oportunidade, pela paciência e dedicação.

Aos colegas do Laboratório de Ecologia e Conservação da UFFS, Camila Rutkoski, Cassiane Kolcenti, Guilherme Vanzetto, Jéssica Herek, Natani Macagnan e Paola Flores pelo auxílio nas atividades e troca de experiências.

Agradeço aos meus pais Orlando e Iracema, por tornar possível a conclusão desta etapa e aos meus irmãos Solano e Eduardo pela ajuda e favores prestados. Amo vocês.

Ás pessoas especiais que me acompanharam nesta trajetória e estiveram presentes em todos os momentos.

Enfim, a todos que fizeram parte da minha formação.

Nada pode impedi-lo quando você estabelece um objetivo. Ninguém pode impedi-lo, a não ser você mesmo. Eu acredito nisso.

Sidney Sheldon

RESUMO

Agrotóxicos, utilizados hoje em grande escala, são necessários para a produção e estoque de alimentos. Com a finalidade de agir contra os insetos, inseticidas piretróides como cipermetrina são cada vez mais aplicados. Apesar dessa crescente necessidade, essas substâncias podem ser responsáveis pela contaminação do ambiente aquático, atingindo espécies não alvo. Um dos grupos atingidos é o dos anfíbios, que por formar pele altamente permeável e suas desovas serem sem casca, estão suscetíveis a contaminação. Neste contexto, este estudo teve o objetivo de avaliar, sob condições laboratoriais, os efeitos crônicos que o inseticida cipermetrina pode causar em girinos de *Physalaemus gracilis*. Girinos no estágio 20 (Gosner, 1960) foram expostos a concentrações crônicas de 0,05; 0,10; 0,50; 1,0; 1,5 e 2,0 mg/L de cipermetrina. Houve influência significativa da mortalidade em relação ao aumento das concentrações e do tempo. O valor da concentração de efeito não observado (CENO) e da concentração de efeito observado (CEO) para a mortalidade foi 1,5 e 2,0 mg/L, respectivamente. O Valor Crônico (VC) ou máxima concentração aceitável de toxicante para *Physalaemus gracilis* expostos a cipermetrina foi 1,75 mg/L. Constatou-se que o inseticida causou mortalidade, alterações na atividade natatória, malformação na morfologia oral, na cauda e intestino dos girinos expostos. As características do comportamento da espécie em teste neste estudo são sinais típicos de intoxicação por piretróides. A crescente utilização do inseticida cipermetrina no meio ambiente é motivo de preocupação, visto que pode ser seriamente perigoso para a sobrevivência e desenvolvimento da espécie de anfíbios.

Palavras-chave: Agrotóxicos. Ecotoxicologia. Alterações morfológicas. Anfíbios.

ABSTRACT

Agrochemicals, used today on a large scale, are necessary for the production and stocking of food. In order to act against insects, pyrethroid insecticides such as cypermethrin are increasingly being applied. Despite this growing need, these substances may be responsible for contamination of aquatic environment, reaching non-target species. One of the groups affected is the amphibians, which are susceptible to contamination due to forming its permeable skin and barren spawning. In this context, this study aims to evaluate, under laboratory conditions, the chronic effects that the insecticide cypermethrin can cause in tadpoles of *Physalaemus gracilis*. Stage tadpoles at stage 20 (Gosner, 1960) were exposed to chronic concentrations of 0.05; 0.10; 0.50; 1.0; 1.5 and 2.0 mg/L cypermethrin. There was a significant influence of mortality in relation to concentrations and time increase. The value of non observed effect concentration (CENO) and observed effect concentration (CEO) for mortality was 1.5 and 2.0 mg/L, respectively. The Chronic Value (CV) or maximum acceptable concentration of toxicant for *Physalaemus gracilis* exposed to cypermethrin was 1.75 mg/L. It was observed that the insecticide caused mortality, changes in swimming activity, malformation in oral morphology, tail and intestine of exposed tadpoles. The behavioral characteristics of the species tested in this study are typical signs of pyrethroid intoxication. The increasing use of the cypermethrin insecticide in the environment is of concern since it can be seriously dangerous for the survival and development of the amphibian species.

Keywords: Agrochemicals. Ecotoxicology. Morphological changes. Amphibians.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Exemplar de *Physalaemus gracilis*. Fonte: BORGES MARTINS (2007)..14
Figura 2 - Em A, desova de *Physalaemus gracilis*. Em B, desovas sendo coletadas no lago da Universidade Federal da Fronteira Sul – Campus Erechim. Fonte: a autora 15
Figura 3 - Laboratório de Ecologia e Conservação da Universidade Federal da Fronteira Sul – Campus Erechim, onde os anfíbios foram aclimatados e criados. Fonte: a autora. 15
Figura 4 - Mortalidade do teste crônico de *Physalaemus gracilis* expostos a diferentes concentrações de cipermetrina. Fonte: a autora. 19
Figura 5 - Mortalidade do teste crônico de *Physalaemus gracilis* relacionado ao tempo de exposição, em horas. Fonte: a autora. 19
Figura 6 - Padrão de atividade natatória dos girinos de *Physalaemus gracilis* expostas a concentrações crônicas de cipermetrina. Padrão: 0 – para atividade natatória igual ao controle, considerado normal, 1 – parado, mas com atividade natatória com estímulo, 2 – atividade natatória errática, 3 – atividade natatória errática, com espasmos, 4 – sem atividade natatória e movimentos retorcidos e 5 – sem atividade natatória. Fonte: a autora. 21
Figura 7 - Em A, exemplar do controle sem alterações. Em B, C e D ausência de dentículos. Fonte: a autora. 23
Figura 8 - Amostras de girinos com alterações (curvatura) na cauda. Fonte: a autora 24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados da mortalidade do teste de toxicidade crônica para girinos de *Physalaemus gracilis* expostos a cipermetrina. 18
Tabela 2 - Desenvolvimento dos girinos do controle e expostos no período de ensaio. 20
Tabela 3 - Alterações na atividade natatória apresentadas por *Physalaemus gracilis* expostos a concentrações crônicas da formulação comercial de cipermetrina. 20
Tabela 4 - Alterações morfológicas (malformações) verificadas nas respectivas concentrações da formulação comercial de cipermetrina. 21
Tabela 5 - Alterações na morfologia oral apresentadas por *Physalaemus gracilis* expostas a cipermetrina. 22
Tabela 6 - Malformação na cauda causada pela cipermetrina em *Physalaemus gracilis*. 23
Tabela 7 – Malformação no intestino causada pela cipermetrina em *Physalaemus gracilis.* 24

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 11
2 METODOLOGIA 14
2.1 AGROTÓXICO 14
2.2 ESPÉCIE TESTE 14
2.3 DESIGN EXPERIMENTAL 14
2.4 TESTE CRÔNICO 16
2.4.1 Atividade natatória 16
2.4.2 Malformação 17
2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS 17
3 RESULTADOS 18
3.1 ATIVIDADE NATATÓRIA 20
3.2 MALFORMAÇÃO 21
3.2.1 Morfologia oral 22
3.2.2 Malformação na cauda 23
3.2.3 Malforação no intestino 24
4 DISCUSSÃO 25
5 CONCLUSÃO 27
REFERÊNCIAS 28

1 INTRODUÇÃO

Dentro do padrão econômico em que vivemos há a necessidade da utilização de agrotóxicos na produção e estoque de alimentos. O crescimento das atividades agrícolas tornou o Brasil, desde 2008, líder de maior mercado mundial de agrotóxicos, com produção de aproximadamente 1 bilhão de litros por ano (ABRASCO, 2015). Ao mesmo tempo, aumenta a preocupação de que essas substâncias possam provocar grandes prejuízos ao meio ambiente e efeitos nocivos à saúde humana (SILVA, 2005).

Os produtos químicos utilizados nas atividades agrícolas, entre eles os inseticidas, podem contaminar os ambientes aquáticos, através da lixiviação (KNUTSON et al., 2004). O grupo dos inseticidas está em terceiro lugar entre os agrotóxicos mais utilizados no Brasil, correspondendo a 12% do mercado nacional (ANVISA; UFPR, 2012). Este grupo se divide entre os organofosforados, organoclorados, carbamatos e piretróides (RODRIGUES, 2012; SAVOY, 2011). Os agrotóxicos do grupo piretróide, originados da piretrina, são os mais utilizados atualmente (IBAMA, 2014).

Piretrina é o nome dado à substância química responsável pela atividade inseticida e é encontrada em flores do gênero *Chrysanthemum cinerariaefolium* (BRAIBANTE; ZAPPE, 2012). As piretrinas foram muito utilizadas no século XIX, porém, por apresentar baixa estabilidade a luz não são mais utilizadas na agricultura. Em razão disto, criou-se um produto com maior fotoestabilidade e eficácia no controle de insetos, similares aos produtos naturais, denominados de piretróides sintéticos (BRAIBANTE; ZAPPE, 2012).

O grupo dos piretróides sintéticos é um dos inseticidas mais utilizados, pois apresenta boa eficiência contra um grande número de insetos e necessita de baixas doses para desempenhar a sua função, provocando nos insetos um efeito de choque denominado “knockdown”, que causa paralisia imediata e mortalidade (SANTOS; AREAS; REYES, 2007). Ainda, alguns estudos demonstram que esse inseticida é pouco tóxico para mamíferos e pássaros (BEGUM, 2005).

Cipermetrina, é um inseticida do grupo químico piretróide com classificação toxicológica II (altamente tóxico) (ANVISA, 2016). A cipermetrina está entre os inseticidas mais utilizados em atividades agrícolas, com taxas de aplicação que podem variar entre 60 e 280g de ingrediente ativo (ia) por hectare (CASAFE, 2010).

Com uma ampla escala de aplicação, é denominado como essencial no controle de pragas e insetos e é utilizado em quase todas as culturas agrícolas como o feijão, batata, arroz, soja, milho, amendoim, algodão, entre outras, bem como em casas e jardins (ANVISA 2016; Yang, 2015).

A legislação nacional brasileira não estabelece um limite sobre a quantidade de cipermetrina que pode ser encontrada em água para consumo humano, enquanto na União Europeia este limite é de 0,5 µg/L (UNIÃO EUROPEIA,1998). No Rio Grande do Sul, o valor máximo é de 300 µg/L (BRASIL, 2014).

Alguns estudos têm mostrado que a cipermetrina é excessivamente tóxica, podendo causar alterações fisiológicas, anomalias morfológicas e desenvolvimento retardado em anfíbios (AGOSTINI et al., 2010; DAVID et al., 2012; YU et al., 2013). São encontrados casos de indução de micronúcleos em girinos de *Odontophrynus americanus* (CABAGNA et al., 2006), anormalidades no comportamento, crescimento e letalidade em girinos de *Hypsiboas pulchellus* (AGOSTINI et al., 2010), anomalias comportamentais e morfológicas em *Duttaphrynus melanostictus* (DAVID et al., 2012), síndrome de hiperatividade, cérebro afetado, cauda curvada e atividade natatória alterada em *Bufo arenarum* e *Physalaemus biligonigerus* (IZAGUIRRE et al., 2006), alterações comportamentais e efeitos neurotóxicos como contrações espasmódicas, natação errática e movimentos reduzidos em *Rhinella arenarum* (SVARTZ et al., 2015).

Neste sentido, a ecotoxicologia aquática é uma ferramenta essencial para avaliar, quantificar e definir limites para a emissão dessas substâncias no ambiente, a fim de se analisar o nível de periculosidade e controlar a poluição hídrica (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008). Estes testes são realizados com o intuito de avaliar os efeitos que substâncias químicas podem causar aos organismos expostos a elas, relacionando a quantidade dos compostos químicos e o grau de seu efeito nocivo (WALKER et al., 2012). Os resultados da exposição aguda exibem os efeitos mais rápidos e severos e tem duração de 48 ou 96 horas, enquanto o de exposição crônica a duração pode variar de 7 a 21 dias e permite avaliar, principalmente, efeitos subletais (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008), tais como alterações no crescimento, alterações fisiológicas, morfológicas e comportamentais, insucesso na reprodução e eliminação da resposta imunológica dos girinos (ONGLEY, 1996; RELYEA; HOVERMAN, 2006).

Um dos grupos que podem ser utilizados em testes ecotoxicológicos é o dos anfíbios. Anfíbios são considerados excelentes bioindicadores pois sua pele é altamente permeável, suas desovas são sem casca e são expostos a ambientes aquáticos em dois períodos de vida, enquanto embriões e enquanto girinos (BABINI et al., 2015; WANG et al., 2015), podendo assim, entrar em contato com os contaminantes em algum momento.

No Brasil ocorrem 1080 espécies de anfíbios, destas, 1039 são anuros (SBH, 2016). Porém, desde a década de 1980, a classe de animais vertebrados dos anfíbios vem sofrendo um declínio em grandes proporções em suas populações, sendo uma das espécies mais ameaçadas de extinção em todo o mundo, totalizando cerca de 30% de espécies ameaçadas e 38 espécies já extintas da natureza (IUCN, 2013). Entre as causas deste declínio está a poluição ambiental por agrotóxicos utilizados na agricultura (BEEBEE; GRIFFTHS, 2005, MANN et al., 2009; RELYEA, 2009).

Physalaemus gracilis, é conhecida popularmente como rã-chorona, uma espécie de anfíbios que ocorre na região sul do Brasil (Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná) e no estado de São Paulo, na Argentina e Uruguai (LANGONE, 1994). As desovas desta espécie, depositadas sobre a água, são encontradas entre os meses de setembro a março e sua aparência é como um ninho de espuma branca (ACHAVAL; OLMOS, 2003).

Ainda que não exista muita metodologia aplicada a esse grupo, atualmente é crescente o interesse pelas pesquisas com esses animais, visto o importante papel ecológico que representam e pelo alerta que o desequilíbrio dessas populações pode declarar (VASCONCELOS, 2014).

Sendo assim, este estudo teve o objetivo de avaliar, sob condições laboratoriais, os efeitos toxicológicos crônicos da formulação comercial do inseticida Cipermetrina em girinos de rãs-choronas (*Physalaemus gracilis*). Pretendeu-se identificar possíveis alterações na atividade natatória, malformação, mortalidade e também produzir informações sobre os efeitos que essa substância pode causar neste organismo não alvo.

.

2 METODOLOGIA

2.1 AGROTÓXICO

Utilizou-se nos testes ecotoxicológicos a formulação comercial do princípio ativo cipermetrina, Cipertrin® 250 g/L. Este inseticida é classificado como inseticida de contato, do grupo químico piretroide e é registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) sob nº 6195. É formulado por Prentiss Química LTDA, considerado como Concentrado Emulsionável (EC) e contém 25% (250g/L) de cipermetrina e 72,3% (723g/L) de ingredientes inertes.

2.2 ESPÉCIE TESTE

O organismo selecionado para o teste foi uma espécie de anfíbio anuro: *Physalaemus gracilis,* conhecida no Brasil como rã-chorona.

Figura 1 – Exemplar de *Physalaemus gracilis*. Fonte: BORGES MARTINS (2007).

2.3 DESIGN EXPERIMENTAL

As desovas da espécie teste foram coletadas na natureza, em um lago da Universidade Federal da Fronteira Sul - *campus* Erechim RS (latitude: -27.728681°; longitude: -52.285852°) e levadas em sacos plásticos para o laboratório de Ecologia e Conservação da Universidade Federal da Fronteira Sul. Posteriormente, foram

colocadas em aquários com dez litros de água de poço artesiano previamente analisada e dentro dos padrões de potabilidade estabelecidos.

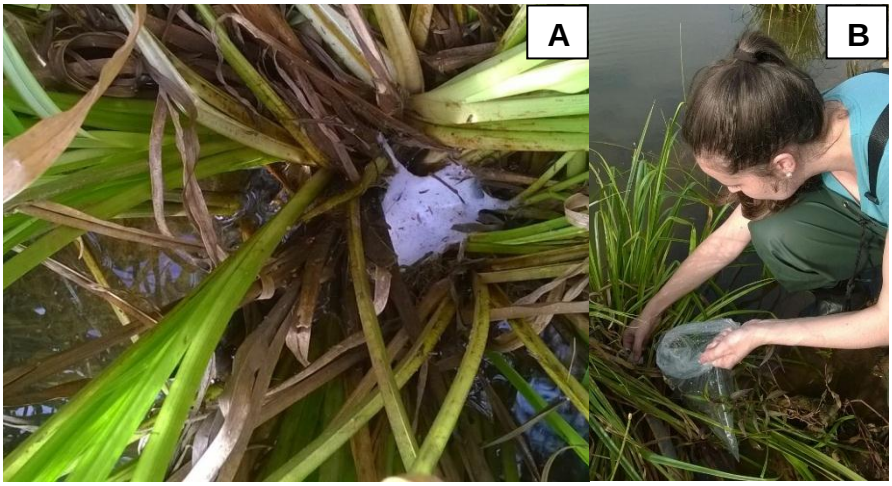

Figura 2 - Em A, desova de *Physalaemus gracilis*. Em B, desovas sendo coletadas no lago da Universidade Federal da Fronteira Sul – Campus Erechim. Fonte: a autora

A temperatura do local foi controlada e monitorada todos os dias permanecendo em torno de 22-24ºC. Os aquários foram constantemente aerados e tiveram controle de claro/escuro.

Figura 3 - Laboratório de Ecologia e Conservação da Universidade Federal da Fronteira Sul – *Campus* Erechim, onde os anfíbios foram aclimatados e criados. Fonte: a autora.

2.4 TESTE CRÔNICO

Para o teste crônico, foram colocados embriões no estágio de desenvolvimento 20, onde ao final do teste, estavam no estágio 25, girinos (desenvolvimento de acordo com tabela geral de desenvolvimento de Gosner (1960) e Romero-Carvajal et al., 2009). Os embriões (estágio 20) foram escolhidos aleatoriamente nos aquários de criação e transferidas para o local de teste, em placas de petri. Foram testadas seis concentrações, com seis réplicas cada e cinco girinos por placa, totalizando 30 expostos para cada concentração. Para o controle, foram colocadas 12 placas, num total de 60 girinos. Em cada placa foram adicionados 25 ml da solução com o agrotóxico e para o controle 25 ml de água de poço artesiano, sem adição de nenhum produto químico. As placas foram deixadas entreabertas para evitar evaporação demasiada e possibilitar a oxigenação da água. Durante a condução dos testes, os girinos foram alimentados com ração para peixes, alimento básico em flotos com 45% de proteína bruta, *ad libitum*.

As concentrações de cipermetrina testadas foram baseadas na concentração letal média ($CL_{50\ 96h}$) de 5,4 mg/L para girinos de *Physalaemus gracilis*, de acordo com VANZETTO (2016). Foram adotadas as proporções1/100; 1/50; 1/10; 1/5; 1/3,5 e 1/2,7 da $CL_{50\ 96h}$ sendo, 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg/L.

O experimento teve a duração de sete dias e foram observados efeitos quanto a mortalidade, atividade natatória e malformação. A análise do teste foi efetuada diariamente, através de estereomicroscópio. A mortalidade dos girinos foi quantificada após não ser detectada nenhuma atividade natatória depois de leve insistência.

Neste estudo foi utilizada a palavra girino para se referir aos embriões e larvas de *Physalaemus gracilis*, como forma de caracterizar toda a fase de desenvolvimento testada.

2.4.1 Atividade natatória

As observações da atividade natatória foram realizadas por placa de petri. Assim, foi quantificado o comportamento dos 5 girinos de cada placa como sendo um só, analisando o que a maioria apresentava. A atividade natatória foi analisada

em todas as concentrações do experimento. Para essa análise utilizou-se como parâmetro valores numéricos: 0 – para atividade natatória igual ao controle, considerado normal, 1 – parado, mas com atividade natatória com estímulo, 2 – atividade natatória errática, 3 – atividade natatória errática, com espasmos, 4 – sem atividade natatória e movimentos retorcidos e 5 – sem atividade natatória.

2.4.2 Malformação

A análise de malformação foi realizada nas concentrações de 1,0; 1,5 e 2,0 mg/L. As análises foram voltadas para detecção de malformação oral, na cauda e intestino. As anomalias na cauda foram observadas ao longo dos sete dias de teste. Ao final deste período, os girinos sobreviventes foram avaliados quanto a malformações na boca e intestino. Todas as análises foram comparadas ao controle negativo.

2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para avaliar o efeito da cipermetrina nos girinos de *Physalaemus gracilis* utilizou-se Análise de Variância Unidirecional (ANOVA) seguida pelo teste post-hoc Tukey ou Dunnet, quando $p<0,05$. A Concentração de Efeito Não Observado (CENO), a Concentração de Efeito Observado (CEO) e o Valor Crônico (VC) foram calculados para a mortalidade. O software utilizado foi o Statistica 8.0.

3 RESULTADOS

Os efeitos subletais causados pelo inseticida cipermetrina foram analisados em 180 girinos. Neste teste crônico de sete dias 60 girinos foram submetidos à um controle negativo e 180 girinos às concentrações escolhidas para análise. Destes, 6 girinos morreram no controle (10%) e 48 (26,67%) na exposição ao agrotóxico (Tabela 1).

Tabela 1 - Resultados da mortalidade do teste de toxicidade crônica para girinos de *Physalaemus gracilis* expostos a cipermetrina.

Concentração (mg/L)	**Mortalidade**							
	24h	**48h**	**72h**	**96h**	**120h**	**144h**	**168h**	**Total**
Controle	0	0	0	1	2	3	0	6
0,05	0	0	0	1	2	0	1	4
0,1	0	0	0	0	0	2	0	2
0,5	0	0	0	0	0	1	2	3
1,0	0	0	0	0	0	2	1	3
1,5	0	0	0	0	0	6	10	16
2,0	0	0	0	1	2	4	13	20

A mortalidade dos girinos iniciou em 96 horas de exposição em duas concentrações e no controle. Em 144 horas de teste todas as concentrações apresentaram números de mortalidade. A maior taxa ocorreu no último dia (168h), com 33,3% de girinos mortos na concentração de 1,5 mg/L e 43,3% na concentração de 2,0 mg/L. Ao final do teste as taxas de mortalidade das concentrações mais baixas variaram de 6,67% a 13,3% e a variação das concentrações 1,5 e 2,0 mg/L foram 53,3% e 66,67%, respectivamente.

Cipermetrina afetou a mortalidade conforme o aumento das concentrações (Figura 4) ($F_{(5,30)}$ = 8,08, $p<0,01$), sendo significativo nas concentrações 1,5 e 2,0 mg/L (Tukey, $p<0,05$). O tempo de exposição também influenciou na mortalidade dos girinos (Figura 5) ($F_{(6,35)}$ = 40,018, $p<0,01$), sendo significativo em 144 e 168 horas de exposição (Tukey, $p<0,05$).

O valor de CENO para a mortalidade foi 1,5 mg/L e de CEO foi 2,0 mg/L. Logo, o Valor Crônico (VC) ou máxima concentração aceitável de toxicante para *Physalaemus gracilis* expostos a cipermetrina foi 1,75 mg/L.

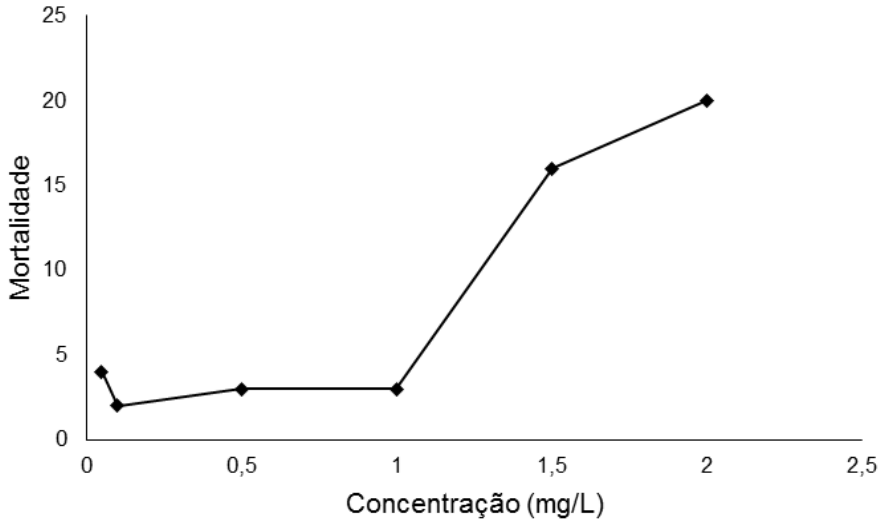

Figura 4 - Mortalidade do teste crônico de *Physalaemus gracilis* expostos a diferentes concentrações de cipermetrina. Fonte: a autora.

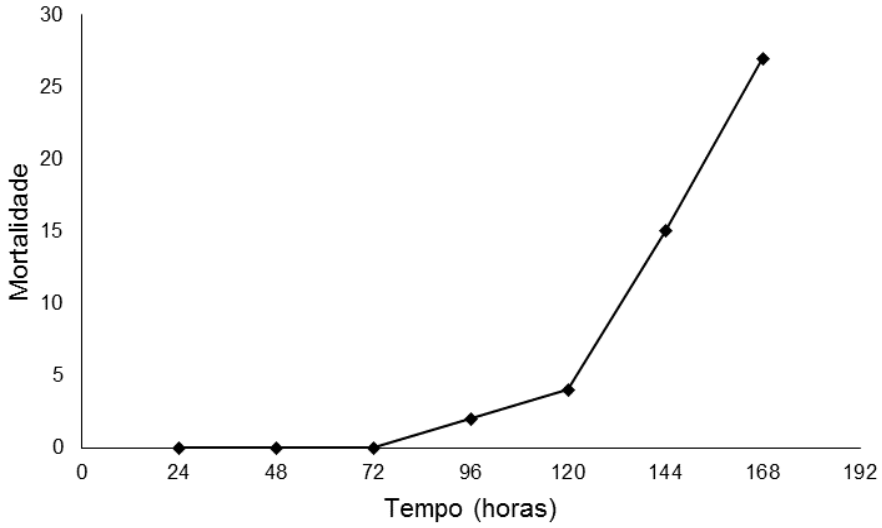

Figura 5 - Mortalidade do teste crônico de *Physalaemus gracilis* relacionado ao tempo de exposição, em horas. Fonte: a autora.

O desenvolvimento dos girinos (estágios de Gosner), não foi afetado pelo inseticida, visto que apresentaram o mesmo desenvolvimento do controle. Ao final do teste todos os girinos encontravam-se no estágio 25.

Tabela 2 - Desenvolvimento dos girinos do controle e expostos no período de ensaio.

Tempo (h)	Estágio de Gosner (1960)	
	Girinos do controle	Girinos expostos
0	20	20
24	22	22
48	25	24-25
72	25	25
96	25	25
120	25	25
144	25	25
168	25	25

3.1 ATIVIDADE NATATÓRIA

Todos os girinos expostos ao agrotóxico apresentaram atividade natatória alterada, quando comparados ao controle (Tabela 3).

Tabela 3 - Alterações na atividade natatória apresentadas por *Physalaemus gracilis* expostos a cipermetrina.

Concentração (mg/L)	Girinos expostos	Girinos analisados	Girinos com atividade natatória sem alteração	Girinos com atividade natatória com alteração
Controle	60	60	60	0
0,05	30	30	0	30
0,1	30	30	0	30
0,5	30	30	0	30
1,0	30	30	0	30
1,5	30	30	0	30
2,0	30	30	0	30

Nas primeiras 24 horas de exposição os girinos já exibiram alterações na atividade natatória em todas as concentrações (Figura 6). Já no segundo dia de

ensaio, a atividade natatória dos girinos foi errática, com contrações espasmódicas, permanecendo com este comportamento até 120 horas. Em 168 horas de exposição, os girinos não exibiram mais qualquer atividade natatória. Os girinos do controle permaneceram sem alteração (parâmetro 0) até o final do teste.

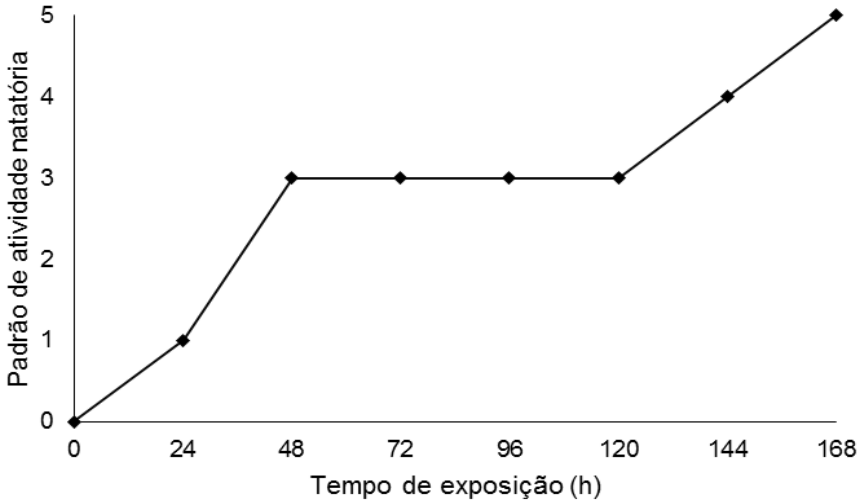

Figura 6 - Padrão de atividade natatória dos girinos de *Physalaemus gracilis* expostas a concentrações crônicas de cipermetrina. Padrão: 0 – para atividade natatória igual ao controle, considerado normal, 1 – parado, mas com atividade natatória com estímulo, 2 – atividade natatória errática, 3 – atividade natatória errática, com espasmos, 4 – sem atividade natatória e movimentos retorcidos e 5 – sem atividade natatória. Fonte: a autora.

3.2 MALFORMAÇÃO

Foram encontradas malformações em girinos de todas as concentrações de cipermetrina em análise (1,0; 1,5 e 2,0 mg/L) (Tabela 4).

Tabela 4 - Alterações morfológicas (malformações) verificadas nas respectivas concentrações da formulação comercial de cipermetrina.

Concentrações	**Malformação oral**	**Malformação na cauda**	**Malformação no intestino**
Controle	0	0	0
1,0 mg/L	16	5	2
1,5 mg/L	14	9	3
2,0 mg/L	10	12	1

A anomalia que os girinos mais apresentaram foi na boca, com ocorrência de 78,43% dos girinos analisados. Na cauda, o agrotóxico causou deformação em 28,89 % dos girinos e no intestino 11,76%. No controle não houve alteração.

A diferença entre os tipos de malformações foi significativa ($F_{(2, 6)}$ = 12,88 p<0,01). Quando comparados com o controle, todos os girinos dessas três concentrações apresentaram alguma malformação ($F_{(3, 8)}$ = 19,92, p<0,01), sendo significativo para malformações na boca e na cauda dos girinos (Dunnett, p<0,01).

3.2.1 Morfologia oral

Avaliou-se 105 exemplares (que sobreviveram até o final do teste crônico) de *Physalaemus gracilis* a fim de se verificar a presença de malformação na morfologia oral, dos quais, 54 eram do controle. As alterações detectadas foram ausência de fileiras de dentículos labiais superiores e inferiores e na mandíbula superior e inferior (Figura 7). As deformações ocorreram em 59,26% dos girinos na concentração de 1,0 mg/L e em 100% dos girinos nas concentrações de 1,5 e 2,0 mg/L. Nos girinos do controle não foram detectados casos dessa malformação (Tabela 5).

Tabela 5 - Alterações na morfologia oral apresentadas por *Physalaemus gracilis* expostas a cipermetrina.

Concentração (mg/L)	Girinos expostos	Girinos analisados	Girinos com alteração	Girinos sem alteração
Controle	60	54	0	54
1,0	30	27	16	11
1,5	30	14	14	0
2,0	30	10	10	0

A ocorrência de alterações na morfologia oral foi significativa em relação ao controle ($F_{(3, 20)}$ = 5,27, p<0,01), significativa nas três concentrações testadas (Dunnet, p<0,05).

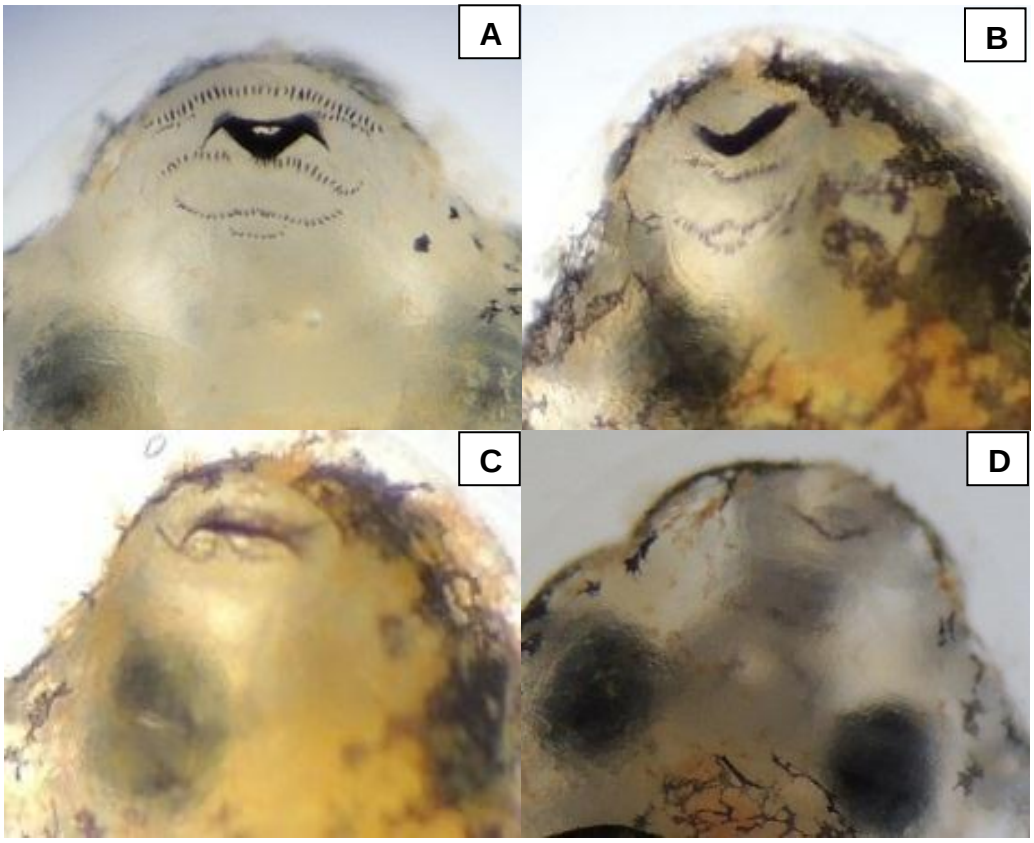

Figura 7 - Em A, exemplar do controle sem alterações. Em B, C e D ausência de dentículos. Fonte: a autora.

3.2.2 Malformação na cauda

A malformação na cauda foi analisada ao longo dos sete dias de teste e (Tabela 6). Essa malformação apresentou as maiores taxas na concentração de 2,0 mg/L, totalizando 40% (12 girinos) seguida da concentração de 1,5 mg/L, com 30% (09 girinos) e por último a de 1,0 mg/L: 16,67% (05 girinos).

Tabela 6 - Malformação na cauda causada pela cipermetrina em *Physalaemus gracilis*.

Concentração (mg/L)	Girinos expostos	Girinos analisados	Girinos com alteração	Girinos sem alteração
Controle	60	60	0	60
1,0	30	30	5	25
1,5	30	30	9	21
2,0	30	30	12	18

Em relação ao controle, essa malformação foi significativa em todas as concentrações testadas ($F_{(3, 20)}$ = 10,80, p<0,01, Dunnett p<0,01). As análises foram voltadas para detecção de curvaturas na cauda (Figura 8).

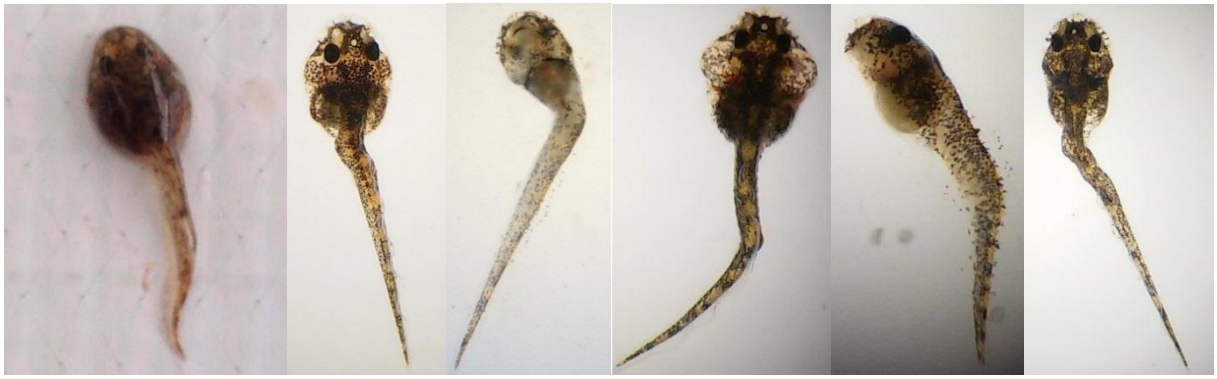

Figura 8 – Amostras de girinos com alterações (curvatura) na cauda. A primeira imagem ilustra um girino do controle, sem alterações. Fonte: a autora

3.2.3 Malformação no intestino

As deformidades no intestino foram menos frequentes em relação ás malformações observadas na morfologia oral e na cauda. Observou-se enrolamento anormal do intestino em 6 girinos, dos 51 expostos ao agrotóxico (Tabela 7), que não foi significativo em relação ao controle ($F_{(3, 20)}$ =0,98, p=0,42).

Tabela 7 – Malformação no intestino causada pela cipermetrina em *Physalaemus gracilis.*

Concentração (mg/L)	Girinos expostos	Girinos analisados	Girinos com alteração	Girinos sem alteração
Controle	60	54	0	54
1,0	30	27	2	25
1,5	30	14	3	11
2,0	30	10	1	9

4 DISCUSSÃO

Desde mais de duas décadas a relação entre atividade agrícola e populações de anfíbios são relatadas como negativa (BERGER, 1998). Os resultados deste estudo mostram que concentrações crônicas da formulação comercial do inseticida Cipermetrina foi tóxica para girinos de anfíbios de *Physalaemus gracilis.* As doses subletais testadas causaram mortalidade, atividade natatória alterada e malformações na morfologia oral, na cauda e no intestino desses organismos. As características no comportamento da espécie em teste e as anomalias encontradas são sinais típicos de intoxicação por piretróides (GREULICH; PFLUGMACHER, 2004).

O número da mortalidade dos girinos de *Physalaemus gracilis* submetidos a concentrações crônicas de cipermetrina neste estudo é considerado alto (26,67%). Isto pode significar, em ambiente natural, diminuição de população dos anfíbios e a longo prazo, declínio da espécie, visto que esse grupo já tem sido bastante considerado em relatórios sobre declínios populacionais e extinções de espécies de várias partes do mundo (JAYAWARDENA, 2010). Este declínio, de acordo com alguns estudos norte-americanos, está associado ao uso de agrotóxicos na agricultura (DAVIDSON, 2004; SPARLING et al., 2001).

Verificou-se neste estudo que a atividade natatória também foi afetada pela cipermetrina. Os girinos de todas as doses subletais aplicadas apresentaram alterações, como contrações espasmódicas, movimentos retorcidos, chegando a apresentar nenhuma atividade natatória, mesmo com estímulo. Em ambiente natural, este efeito é preocupante, visto que significa menor capacidade de fuga. Em larvas de anfíbios de *Duttaphrynus melanostictus,* anomalias na natação também foram observadas em exposição a cipermetrina (DAVID et al., 2012). Os efeitos subletais neurotóxicos causados pelo inseticida cipermetrina, como natação errática, contrações espasmódicas e movimentos reduzidos vistos neste estudo, também já foram observados em girinos de *Rhinella arenarum* (SVARTZ, 2015).

A ocorrência de malformações nos girinos expostos foi alta, sendo a deformação na boca a mais encontrada. A falta dos dentículos da boca pode comprometer a sobrevivência da espécie, pois prejudica a alimentação dos girinos, aumenta a vulnerabilidade a predadores e também afeta a função dos anfíbios como predadores na cadeia alimentar (PÉREZ-IGLESIAS et al., 2015). Resultados

semelhantes com o inseticida cipermetrina sobre as alterações na morfologia oral de *P. gracilis* foram também encontrados em Vanzetto (2016).

O estudo de Vanzetto (2016) realizado com *Physalaemus gracilis* em um estágio mais avançado de desenvolvimento (estágio 25, GOSNER, 1960), demonstra a sensibilidade desta espécie frente a doses subletais de cipermetrina e mostra a alta toxicidade da cipermetrina para larvas neste estágio. Já a pesquisa desenvolvida por Macagnan (2016), realizada com embriões entre os estágios 17 e 19 e larvas no estágio 24-25 de Gosner (1960) em exposição aguda, demonstra que a cipermetrina é pouco tóxica para embriões de *P. gracilis,* sendo mais resistentes do que as larvas. Ainda, neste mesmo estudo os resultados mostram que a Cipermetrina é mais tóxica que a deltametrina, outro inseticida piretróide. Em comparação com o estudo de Vanzetto (2016) e Macagnan (2016), pode-se dizer que para larvas no estágio 20 de desenvolvimento (GOSNER, 1960), o inseticida cipermetrina foi medianamente tóxico.

A fase larval dos anfíbios tem maior probabilidade de ser exposta a contaminantes em ecossistemas aquáticos do que a fase embrionária, visto que os girinos são mais sensíveis e sua fase de desenvolvimento é mais longa (YU et al., 2013). O que também as torna mais suscetíveis a contaminações do que a fase embrionária é devido a presença de brânquias e ausência da membrana gelatinosa, que envolve os embriões, estando a pele totalmente exposta (BRIDGES, 2000; ORTIZ-SANTALIESTRA et al., 2006). A maior sensibilidade a toxicidade da cipermetrina na fase larval do que na embrionária também já foi comprovada para *Rhinella arenarum* (SVARTZ et al., 2015).

Outro efeito que pôde ser observado neste estudo foi em relação ao crescimento dos girinos. Os girinos expostos se desenvolveram de acordo com os estágios de Gosner (1960), como no controle, porém, ao final do teste se pode perceber que o tamanho deles era menor que os girinos do controle. Este efeito também foi observado em girinos de *Xenopus laevis* expostos ao princípio ativo cipermetrina (YU et al., 2013). Porém, não foram feitas medidas para confirmar o efeito no crescimento neste experimento.

A legislação estadual do Rio Grande do Sul permite 0,3 mg/L de cipermetrina na água (BRASIL, 2014). Essa concentração na água causaria baixa mortalidade nos girinos de *P. gracilis*, porém afetaria a atividade natatória, visto que em concentrações ainda mais baixas, vistas nesta pesquisa, ela foi alterada.

5 CONCLUSÃO

Este estudo mostrou que a exposição da espécie *Physalaemus gracilis* a determinadas concentrações crônicas de cipermetrina podem causar mortalidade, alteração na atividade natatória e malformação desses organismos. Isto indica que mesmo em doses baixas, essa formulação é tóxica para a espécie.

A avaliação de alterações crônicas que substâncias, como os agrotóxicos, podem causar em organismos expostos a esses poluentes é de extrema importância, pois servem como referência no entendimento sobre mudanças na biodiversidade e suas causas.

A crescente utilização do inseticida cipermetrina no meio ambiente é motivo de preocupação, visto que pode ser seriamente perigoso para a sobrevivência e desenvolvimento da espécie de anfíbios.

É notória a necessidade de mais estudos nessa área, utilizando outros agrotóxicos e também outras espécies, visando-se uma melhor avaliação sobre a toxicidade dos agrotóxicos utilizados na agricultura em espécies não-alvo, especialmente as aquáticas.

REFERÊNCIAS

ABRASCO. Associação brasileira de saúde coletiva. **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. 2015. Disponível em: <http://www.abrasco.org.br/dossieagrotoxicos/wp-content/uploads/2013/10/DossieAbrasco_2015_web.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2017.

ACHAVAL, F.; OLMOS, A. **Anfibios y reptiles del Uruguay**. 2. ed. Montevideo: Graphis, p. 136, 2003.

AGOSTINI, G. M.; NATALE, G. S.; RONCO, A. E. Lethal and sublethal effects of cypermethrin to *Hypsiboas pulchellus* tadpoles. **Ecotoxicology**, n. 19, p. 1545-1550, 2010.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária; UFPR. **Seminário mercado de agrotóxico e regulação**, 2012. Brasília. Acesso em: 16 mar. 2017.

ANVISA. **C10 – Cipermetrina**, 2016. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/C10%2B%2BCipermetrina.pdf/37400888-3f11-44ed-b53f-dea1abacb865>. Acesso em: maio de 2016.

BABINI, M. S.; BIONDA, C. L.; SALAS, N. E.; MARTINO, A. L. Health status of tadpoles and metamorphs of Rhinella arenarum (Anura, Bufonidae) that inhabit agroecosystems and its implications for land use. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Argentina, v. 118, p. 118-125, 2015.

BEEBEE, T.J.C; GRIFFITHS, R. A. The amphibian decline crisis: a watershed for conservation biology? **Biological Conservation**, v. 125, p. 271-285, 2005.

BEGUM, G. In vivo biochemical changes in liver and gill of *Clarias batrachus* during cypermethrin exposure and following cessation of exposure. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 82, p. 185-196, 2005.

BERGER, L. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rainforests of Australia and Central America. **Proc Natl Acad Sci**, v. 95, p. 9031-9036, 1998.

BORGES-MARTINS, M.; COLOMBO, P.; ZANK, C.; BECKER, F. G.; MELO, M. T. Q. *In*: BECKER, F. G.; RAMOS, R. A.; MOURA, L. A. (orgs.) **Biodiversidade: Regiões da Lagoa do Casamento e dos Butiazais de Tapes, Planície Costeira do Rio Grande do Sul**. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, 2007. p. 385.

BRIDGES, C. M. Long-term effects of pesticide exposure at various life stages of the southern leopard frog (Ranasphenocephala). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 39, p. 91-96, 2000.

BRAIBANTE, M.E.F.; ZAPPE, J. A. A química dos agrotóxicos**. Revista Química Nova na Escola,** v. 34, N° 1, p. 10-15, 2012. Disponível em: <http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc34_1/03-QS-02-11.pdf>. Acesso em: 30 mar. 2017.

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

CABAGNA, M. C.; LAJMANOVICH R. C.; PELTZER P. M.; ATTADEMO A. M.; ALE E. Induction of micronucleus in tadpoles of *Odontophrynus americanus* (Amphibia: Leptodactylidae) by the pyrethroid insecticide cypermethrin. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 88, p. 729-737, 2006.

CASAFE. Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes. **Guía de produtos fitossanitários**. Buenos Aires. 2010.

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

DAVIDSON C. Declining downwind: amphibian population declines in California and historical pesticide use. **Ecological Applications**, v. 14, p. 1892-1902, 2004.

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

GREULICH, K.; PFLUGMACHER, S. Uptake and effects on detoxication enzymes of cypermethrin in embryos and tadpoles of amphibians. **Archives Environmental Contamination Toxicology,** v. 47, n. 4, p.489-495, out. 2004.

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

IUCN - **International Union for Conservation of Nature Red List of Threatened Species.** Versão 2013. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org>. Acesso em: 16 mar. 2017.

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

JAYAWARDENA, U. A.; RAJAKARUNA, R.S.; NAVARATNE, A.N.; AMERASINGHE, P.H.Toxicity of agrochemicals to common hourglass tree frog (*Polypedatescruciger*) in acute and chronic exposure**. International Journal of Agricultural and Biological Engineering**, v. 12, n. 5, 2010.

KNUTSON, M.G.; RICHARDSON, W.B.; REINEKE, D.M.; GRAY, B. R.; PARMELEE, J. R.; WEICK, S. E. Agricultural ponds support amphibian populations. **Ecologial Applications**, v.14, p. 669-684, 2004.

LANGONE, J. A. Ranas y sapos del Uruguay (reconocimiento y aspectos biológicos). **Museo Dámaso Antonio Larrañaga.** Intendencia Municipal de Montevideo, p.123, 1994.

MACAGNAN, N. **Toxicidade dos inseticidas deltametrina e cipermetrina em embriões e larvas de *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae)**. (Graduação em Engenharia Ambiental) 2016. Universidade Federal da Fronteira Sul. Erechim, 2016.

MANN, R. M.; HYNE, R.V.; CHOUNG, C. B.; WILSON, S. P. Amphibians and agricultural chemicals: Review of the risks in a complex environment. **Environmental Pollution**, v. 157, p. 2903-2927, 2009.

ONGLEY, E. D. FAO - Food and Agricultural Organization. Control of water pollution from agriculture. **Global Bioenergy Partnership**, Burlington, Canada, 1996.

ORTIZ-SANTALIESTRA, M. E.; MARCO, A.; FERNÁNDEZ, M. J.; LIZANA, M. Influence of developmental stage on sensitivity to ammonium nitrate of aquatics tages of amphibians. **EnvironmentalToxicology and Chemistry**, v. 25, p. 105-111, 2006.

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

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

RELYEA, R. A.; HOVERMAN, J. Assessing the ecology in ecotoxicology: a review and synthesis in freshwater systems. **Ecology Letters**, v. 9, p. 1157-1171, 2006.

RODRIGUES, L. **Estudo de agrotóxicos usados em agricultura através da técnica de difração de raio x.** 2012. 75 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Nuclear) – Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

SANTOS, M. A. T.; AREAS, M. A.; REYES, F. G. R. Piretróides – Uma visão geral. **Alimentos e Nutrição**, n. 3, p. 339-349, 2007.

SAVOY, V. L. T. Classificação dos agrotóxicos. **Biológico,** São Paulo, v. 73, n. 1, p. 91-92, 2011.

SBH. Sociedade Brasileira de Herpetologia. 2016. **Lista de espécies de anfíbios do Brasil**. Disponível em: <http://www.sbherpetologia.org.br/images/LISTAS/Lista_Anfibios 2016.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2017.

SILVA, D. C. **Efeitos tóxicos e genéticos ocasionados por agrotóxicos**. 2005. Pós-graduação. Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2005.

SVARTZ, G.; ARONZON, C.; COLL, C. P. Comparative sensitivity among early life stages of the South American toad to cypermethrin-based pesticide. **Environmental Science and Pollution Research International**, n. 3. p. 2096-13, 2015.

SPARLING, D.W.; FELLERS, G. M.; MCCONELL, L. L. Pesticides and amphibian population declines in California, USA. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, p. 1591-1595, 2001.

UNIÃO EUROPEIA. **Diretiva 98/83/CE do Conselho da União Europeia de 5/12/1998 Relativa à Qualidade da Água Para Consumo Humano**. Bruxelas: União Europeia; 1998. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:1998:330:0032:0054:PT:PDF>. Acesso em: 18 abr. 2017.

VANZETTO, G. V. **Efeitos letais e subletais de cipermetrina e deltametrina em larvas de *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae)**. 2016. 45 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental. Universidade Federal da Fronteira Sul, Erechim, 2016.

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

WALKER, C. H.; SIBLY, R. M.; HOPKIN, S.P.; PEAKALL, D. B. **Principles of Ecotoxicology**. Taylor & Francis Group, 4 ed, p. 386, 2012.

WANG, M; CHAI, L; ZHAO, H; WU, M.; WANG, H. Effects of nitrate on metamorphosis, thyroid and iodothyronine deiodinases expression in *Bufo gargarizans* larvae. **Chemosphere**, v. 139, p. 402-409, 2015.

YANG, Y.; SUH, S. Changes in environmental impacts of major crops in the US. **Environmental Research Letters**, v. 10, nº 9, 2015.

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

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática:** princípios e alterações. São Carlos: Rima editora, 2. ed, p. 486, 2008.