



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL – *CAMPUS* ERECHIM
CURSO DE ENGENHARIA AMBIENTAL**

SUÉLEN ANDRESSA RINAS TRINDADE

**EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS DO HERBICIDA GLIFOSATO EM EMBRIÕES
DE *Physalaemus gracilis* (ANURA: LEPTODACTYLIDAE)**

ERECHIM, 2017

SUÉLEN ANDRESSA RINAS TRINDADE

EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS DO HERBICIDA GLIFOSATO EM EMBRIÕES DE
Physalaemus gracilis (ANURA: LEPTODACTYLIDAE)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado na Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia Ambiental e Sanitária sob a orientação da Prof^ª. Dra. Marília Teresinha Hartmann.

ERECHIM, 2017.

SUÉLEN ANDRESSA RINAS TRINDADE

**EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS DO HERBICIDA GLIFOSATO EM EMBRIÕES
DE *Physalaemus gracilis* (ANURA: LEPTODACTYLIDAE)**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção de grau de Bacharel em Engenharia Ambiental e Sanitária da Universidade Federal da Fronteira Sul.

Orientadora: Marília Teresinha Hartmann.

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

BANCA EXAMINADORA:

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

Prof^o. Dr. Paulo Afonso Hartmann – UFFS.
Professor.

Prof^o. Me. Guilherme Victor Vanzetto – IDEAU
Engenheiro Ambiental

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho foi possível graças à colaboração de várias pessoas, às quais gostaria de agradecer:

A minha orientadora Professora Dr^a. Marília T. Hartmann pelo empenho e dedicação durante o estudo e colaboração para meu crescimento profissional e pessoal.

A minha família, por todo apoio e incentivo prestados.

A equipe do Laboratório de Ecologia e Conservação: Jéssica Herek, Luana Vargas, Jéssica G. Slaviero, Camila F. Rutkoski e Natani Macagnan por terem contribuído com a realização e monitoramento dos testes. Em especial para Jéssica Herek e Luana Vargas, pelos longos dias de trabalho e empenho para que esta pesquisa pudesse ser concluída com sucesso.

As amigadas, inclusive de outros cursos, que a graduação me proporcionou, agradeço pelos conselhos, pelo apoio, pelas horas de distração, pelos conhecimentos compartilhados e principalmente pelo respeito e amizade construídos neste tempo.

As amigadas antigas, um agradecimento especial pelo incentivo, pelas horas de diversão, pelas longas conversas, pelos risos, pelos abraços e pelo carinho. Vocês me deram força para chegar até aqui.

E também aos colegas do curso de Engenharia Ambiental e Sanitária pela troca de conhecimentos no decorrer do curso.

Ao professor Dr. Paulo Afonso Hartmann, pelo empenho na condução das disciplinas de Trabalho de Conclusão de Curso. E a todos os professores com quem tive a oportunidade de ter aulas, por sua dedicação e ensinamentos que foram essenciais para minha formação.

RESUMO

A presença de agrotóxicos em ambientes aquáticos, geralmente é elevada, especialmente para o herbicida glifosato, devido ao seu intenso uso na agricultura, setor que vem se expandindo de maneira acelerada. Testes com embriões e indivíduos no início da fase larval são realizados para verificar como agentes xenobióticos podem afetar o desenvolvimento embrionário, proporcionando avaliações eficientes quanto aos efeitos subletais. Neste contexto, objetivou-se neste estudo avaliar a toxicidade aguda e crônica do Roundup Original® DI, que tem como princípio ativo o herbicida glifosato, na fase embrionária e larval de *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae). Os ensaios de toxicidade aguda foram realizados com 96 horas de duração, e de toxicidade crônica com duração de 168 horas. Para obtenção dos embriões, foram coletadas desovas com menos de 24 horas de oviposição em um charco em área rural, com certificação do Comitê de Ética para Uso de Animais e licença do ICMBIO para atividades com finalidade científica. O teste agudo foi realizado em triplicata e o crônico em sextuplicata, com um controle negativo equivalente. A CL₅₀ do Roundup Original® DI para embriões de *Physalaemus gracilis* foi de 10600 µg/L. Através do ensaio de toxicidade crônica, constatou-se que houve diferença significativa na atividade natatória dos indivíduos expostos em relação ao controle, onde 23,36% dos embriões expostos apresentaram alteração no movimento. Foram detectadas malformações, no entanto elas não foram significativas em relação ao controle. Esses resultados demonstram a importância da avaliação dos efeitos subletais em embriões, uma vez que os mesmos proporcionam o monitoramento dos efeitos tóxicos de determinadas substâncias no decorrer do desenvolvimento do organismo. Contudo, são necessários mais estudos na área com intuito de extrapolar os resultados a nível ambiental e biológico.

Palavras-chave: Agrotóxicos. Anfíbios. Toxicidade aguda. Toxicidade crônica.

ABSTRACT

The presence of agrochemicals in aquatic environments is generally high, especially for the herbicide glyphosate, due to its intense use in agriculture, an area that has been expanding rapidly. Tests with embryos and individuals at the beginning of the larval stage are performed to verify how xenobiotic agents can affect embryonic development, providing efficient assessments for sublethal effects. In this context, the objective of this study was to evaluate the acute and chronic toxicity of Roundup Original® DI, which has the herbicide glyphosate as an active ingredient in the embryonic and larval phase of *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae). Acute toxicity tests were performed at 96 hours and chronic toxicity lasting 168 hours. In order to obtain embryos, spawnings with less than 24 hours of oviposition were collected in a rural lake, certified by the Ethics Committee for the Use of Animals and licensed by ICMBIO for scientific activities. The acute test was performed in triplicate and the chronic one in six times, with an equivalent negative control. The LC_{50} of Roundup Original® DI for *Physalaemus gracilis* embryos was 10600 $\mu\text{g} / \text{L}$. Chronic toxicity testing showed that there was a significant difference in swimming activity of the exposed individuals in relation to the control, where 23.36% of the exposed embryos presented alterations in movement. Malformations were detected, however they were not significant in relation to the control. These results demonstrate the importance of evaluating sublethal effects in embryos, since they provide monitoring of the toxic effects of certain substances during the development of the organism. However, further studies are needed in the area to extrapolate results at the environmental and biological levels.

Keywords: Pesticides. Amphibians. Acute toxicity. Chronic toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Indivíduo adulto de <i>Physalaemus gracilis</i> (Anura: Leptodactylidae).	14
Figura 2: Desova de <i>Physalaemus gracilis</i> (Anura: Leptodactylidae), coletada em novembro de 2016.	15
Figura 3: Coleta de <i>Physalaemus gracilis</i> realizada fevereiro de 2017 no charco em área rural localizado no interior do município de Paulo Bento.	15
Figura 4: Charco em área rural com grande quantidade de vegetação e lama, onde eram realizadas as coletas de <i>Physalaemus gracilis</i>	16
Figura 5: Desovas de <i>Physalaemus gracilis</i> dispostas nos aquários após coleta em novembro de 2016.	16
Figura 6: Placas de cultura celular contendo embriões de <i>Physalaemus gracilis</i> expostos a formulação comercial de glifosato.	17
Figura 7: Teste agudo e crônico de <i>Physalaemus gracilis</i> , em placas de cultura celular, expostos a formulação comercial de glifosato, sendo realizados concomitantemente.....	18
Figura 8: Malformações na boca das larvas de <i>Physalaemus gracilis</i> no estágio 25. “A” boca de um indivíduo do controle, “B e C” após a exposição à concentração de 65 µg/L, “D” após a exposição à concentração de 144 µg/L e “E” após a exposição à concentração de 280 µg/L, fotografados com esteromicroscópio de imagem com aumento de 5 vezes.....	25
Figura 9: Intestino normal em formato de espiral do controle (A) e intestino malformado de larva de <i>Physalaemus gracilis</i> no estágio 25, após exposição às concentrações de 65 µg/L (D) e de 144 µg/L (B e C) de formulação comercial de glifosato, fotografadas com estereomicroscópio de imagem com aumento de 3 vezes.	25
Figura 10: Caudas malformadas presente em larvas de <i>Physalaemus gracilis</i> no estágio 25 do controle (A), e após exposição à concentração de 65 µg/L (B e C) da formulação comercial de glifosato, fotografadas com estereomicroscópio de imagem com aumento de 2 vezes.	26
Figura 11: Larvas de <i>Physalaemus gracilis</i> no estágio 25 com corpo no formato normal do controle (A) e com malformação de corpo inchado após exposição às concentrações de 65 (B) e 144 µg/L (C), fotografadas com estereomicroscópio de imagem com aumento de 2 vezes.	27
Figura 12: Malformação no olho (A) ou lente turva (B) em larvas de <i>Physalaemus gracilis</i> no estágio 25, após a exposição às concentrações de 280 e 65 µg/L da formulação comercial de glifosato, fotografadas com estereomicroscópio de imagem com aumento de 4 vezes.	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultados do teste de toxicidade aguda para embriões/larvas de <i>Physalaemus gracilis</i> expostos ao glifosato.	20
Tabela 2: Resultados do teste de toxicidade crônica para embriões/larvas de <i>Physalaemus gracilis</i> expostos ao glifosato.	21
Tabela 3: Desenvolvimento dos embriões/larvas de <i>Physalaemus gracilis</i> expostos a formulação comercial de glifosato e do controle no período de ensaio.	21
Tabela 4: Alterações na atividade natatória apresentadas pelos embriões/larvas de <i>Physalaemus gracilis</i> expostos a concentrações crônicas da formulação comercial de glifosato.	22
Tabela 5: Atividade natatória de <i>Physalaemus gracilis</i> exposto a formulação comercial de glifosato, de acordo com os endpoints analisados.	22
Tabela 6: Atividade natatória de <i>Physalaemus gracilis</i> exposto a formulação comercial de glifosato, de acordo com os endpoints analisados: [0] Controle como padrão; [1] Atividade natatória igual ao controle; [2] Atividade natatória menor que o controle; [3] Atividade natatória maior que o controle; [4] Somente espasmos. Os valores apresentados se referem a moda (valores mais freqüentes) nas observações a cada 24 horas.	23
Tabela 7: Malformações apresentadas pelas larvas de <i>Physalaemus gracilis</i> expostos a concentrações crônicas da formulação comercial de glifosato.	24
Tabela 8: Tipos de malformações observadas em <i>Physalaemus gracilis</i> expostos a formulação comercial de glifosato e controle.	24

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	13
2.1. OBJETIVO GERAL:	13
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	13
3. METODOLOGIA	14
3.1 ANÁLISE DE DADOS	19
4. RESULTADOS	20
4.1 TESTE AGUDO	20
4.2 SOBREVIVÊNCIA E DESENVOLVIMENTO DOS EMBRIÕES NO TESTE CRÔNICO	20
4.3 ALTERAÇÕES NA ATIVIDADE NATATÓRIA	22
4.4 MALFORMAÇÕES	23
5. DISCUSSÃO	29
6. CONCLUSÕES	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
ANEXO A	37
ANEXO B	39

1. INTRODUÇÃO

O uso de agroquímicos no Brasil vem crescendo a cada ano, devido aos processos produtivos agrícolas (EMBRAPA, 2017). As vendas anuais de agrotóxicos e afins no Brasil entre os anos de 2000 e 2014 tiveram um crescimento de 194,09%, chegando a atingir 508.556,84 toneladas de ingredientes ativos comercializados entre 2000 e 2014, com crescimento mais acentuado na Região Centro-Sul do país, com destaque para os Estados de São Paulo, Paraná, Mato Grosso, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul e Goiás (IBAMA, 2016).

Os produtos agrotóxicos e afins estão sujeitos às disposições da Lei Federal nº 7.802/89, que se encontra regulamentada pelo Decreto nº 4074/02. Segundo o artigo 2º dessa Lei, o agrotóxico é definido como “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; e substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento” (BRASIL, 1989).

De acordo com Langiano (2006), com relação aos grupos químicos, os agrotóxicos são classificados em herbicidas, fungicidas e inseticidas, sendo que o glifosato pertence ao primeiro grupo, e estes por sua vez são utilizados para controlar plantas indesejáveis na agricultura e também para o controle de algumas plantas aquáticas que possam intervir nas atividades humanas. Os dez ingredientes ativos mais comercializados no País em 2014 revelam que o herbicida glifosato aparece sempre na primeira colocação e que representou mais de 30% das vendas nacionais em cada um desses anos (IBAMA, 2016).

O Roundup Original® DI é um produto que dispõe como princípio ativo o glifosato, porém sua formulação comercial possui uma substância surfactante que detêm efeitos tóxicos mais significantes que o glifosato puro (LANGIANO, 2006). Segundo o IBAMA (2015), o Roundup Original® DI é classificado como altamente tóxico (perigoso ao meio ambiente) e suas indicações de uso são fora de ambientes urbanos, industriais, domésticos e agrícolas, sendo sua prática por meio de pulverização terrestre com emprego de equipamentos costais manuais ou motorizados, e de equipamentos tratorizados, em prol da eliminação em pós-emergência das plantas infestantes, em aceiros de estradas de ferro, estradas de rodagem, oleodutos, cercas e linhas de alta tensão. O Roundup Original® DI é um herbicida não

seletivo de ação sistêmica do grupo químico glicina substituída, composto por 445 g/L de sal de di-amônio de Glifosato (370 g/L de ácido equivalente), e que não deve ser aplicado em áreas situadas a uma distância inferior a 500 metros de povoação e de mananciais de captação de água para abastecimento público e de 250 metros de mananciais de água, moradias isoladas, agrupamentos de animais e vegetação suscetível a danos (MONSANTO, 2017).

Esses produtos químicos podem alcançar as águas através de diversas maneiras como pela aplicação intencional realizada para controle de pragas, pela deriva, pelo escoamento superficial e também através da percolação no solo até atingir os lençóis freáticos o que provoca a contaminação das águas (SILVA; SANTOS, 2007). Uma vez na água, os resíduos de pesticidas podem se ligar a partículas em suspensão, depositar-se nos sedimentos do fundo, ou serem absorvidos pelos organismos aquáticos, onde são detoxificados ou acumulados, além de poderem ser transportados pelo ecossistema aquático através das correntes de águas ou dos corpos dos organismos aquáticos (LANGIANO, 2006).

A presença de agrotóxicos na água gera um enorme impacto na biodiversidade aquática, fazendo com que ocorra uma redução das formas de vida deste meio, sendo que a contaminação das águas tem efeito direto na fauna e flora aquática (BERTI et al., 2009; VASCONCELOS, 2014). Os animais aquáticos são expostos aos agrotóxicos através da pele ao nadar em águas contaminadas, por meio da respiração, pois absorvem o herbicida pelas brânquias (NAKAGOME; NOLDIN; RESGALLA JUNIOR, 2006) e também devido à ingestão de matéria orgânica contaminada (LANGIANO, 2006).

Para realização de estudos ecotoxicológicos em ambientes aquáticos, utilizam-se como organismos os moluscos, vermes bentônicos, esponjas, anfíbios e peixes (SILVA, 2005). Os anfíbios são um dos grupos que mais sofrem diante da presença de produtos tóxicos no ambiente (BERTI et al., 2009; VASCONCELOS, 2014). As características que tornam os anfíbios bons indicadores ambientais são ciclo bifásico, pois podem entrar em contato com o agrotóxico de duas formas, através do ambiente aquático (enquanto embriões e larvas) e também do terrestre (enquanto jovens e adultos) (BRANDÃO et al., 2011). Os anfíbios possuem pele e ovos permeáveis, apresentando sensibilidade às alterações ambientais (GONÇALVES et al., 2014).

Na ordem Anura estão inseridos os sapos, as rãs e as pererecas, animais caracterizados pela ausência de cauda e presença de membros posteriores alongados, para auxiliar na locomoção e saltos, além disso, são os mais notáveis entre os anfíbios devido a sua vocalização, ou canto dos machos, que tem como intuito atrair as fêmeas para a reprodução

(ZANK et al., 2014). Para a reprodução e o desenvolvimento seguro dos embriões os anuros são dependentes da água ou umidade atmosférica, pois seus ovos desidratam com facilidade (KOPPI; SIGNORELLI; BASTOS, 2010). Além disso, os anfíbios colocam os ovos envolvidos em substâncias gelatinosas produzidas por seu próprio organismo que serve como camada protetora dos embriões (WOEHL JR; WOEHL, 2008).

O gênero *Physalaemus* pertence à família *Leptodactylidae*, com 41 espécies reconhecidas (SEGALLA et al., 2014), distribuídas de norte a sul da América do Sul e a leste dos Andes (TOLLEDO et al., 2009). *Physalaemus gracilis*, popularmente conhecido como rã-chorona, mede de 2,7 a 3,2 cm (ZANK et al., 2014; BORGES-MARTINS et al., 2007), com incidência na Argentina, Uruguai e Brasil e comumente encontrada nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, em campos e banhados (FRAVRETTO, 2011) e também em corpos d'água lânticos, em áreas preservadas ou que tenham sofrido alterações ambientais, podendo ser encontrada até mesmo em cidades (IUCN, 2017). Nos meses de setembro a março, época de acasalamento da espécie, macho e fêmea constroem ninhos de espuma onde os ovos são depositados (LINGNAU, 2009). A espécie costuma ser muito conhecida no Rio Grande do Sul, pois a vocalização dos machos assemelha-se ao choro de uma criança ou o miado de um gato (ZANK et al., 2014). *Physalaemus gracilis* tem ampla distribuição no território nacional e possui tolerância a diferentes habitats fortemente perturbados e até a áreas poluídas (IUCN, 2017).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL:

Avaliar a toxicidade da formulação comercial de glifosato em embriões de *Physalaemus gracilis*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Verificar a ocorrência de malformações congênitas após período de exposição à formulação comercial de glifosato;
- Avaliar se a formulação comercial de glifosato provoca alterações na atividade natatória de *Physalaemus gracilis* em diferentes concentrações.

3. METODOLOGIA

O agrotóxico testado foi o herbicida glifosato na formulação comercial Roundap Original® DI de nome químico N-(phosphonomethyl) glycine que apresenta concentração de 445 g/L de sal de Di-amônio de Glifosato (370 g/L de ácido equivalente) e 751 g/L de outros ingredientes, classificado como altamente tóxico (MONSANTO, 2017).

Utilizou-se como organismo teste, a espécie de anfíbio *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae) (Figura 1). Para obtenção dos embriões foram coletadas desovas com menos de 24 horas de oviposição (Figura 2 e 3) em um charco em área rural que é ocupado por grande quantidade de vegetação e lama, considerada área de referência, localizado no interior do município de Paulo Bento – RS (latitude: -27.7016, longitude: -52.426) (Figura 4).

Figura 1: Indivíduo adulto de *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae).



Fonte: Acervo pessoal.

Figura 2: Desova de *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae), coletada em novembro de 2016.



Fonte: Acervo pessoal.

Figura 3: Coleta de *Physalaemus gracilis* realizada fevereiro de 2017 no charco em área rural localizado no interior do município de Paulo Bento.



Fonte: Acervo pessoal.

Figura 4: Charco em área rural com grande quantidade de vegetação e lama, onde eram realizadas as coletas de *Physalaemus gracilis*.



Fonte: Acervo pessoal.

Após a coleta, as desovas foram colocadas em aquários com capacidade para 15 litros. Os aquários recebiam aeração constante, e foram mantidos a uma temperatura entre 22 e 23°C com oxigênio dissolvido de aproximadamente 7000 µg/L em condições controladas de laboratório (Figura 5). Foi utilizada água de poço artesiano, atendendo os padrões de potabilidade.

Figura 5: Desovas de *Physalaemus gracilis* dispostas nos aquários após coleta em novembro de 2016.



Fonte: Acervo pessoal.

Os testes de toxicidade aguda foram iniciados quando os embriões encontravam-se nos estágios de desenvolvimento 18-19 (de acordo com a tabela de Gosner - 1960) (Anexo A). No estágio 18-19, o embrião inicia o alongamento do corpo, o desenvolvimento da cauda, tem resposta muscular e começa a diferenciação das brânquias (DUELLMAN; TRUEB, 1994). Para a determinação da concentração letal média (CL50) foi realizado o teste de toxicidade aguda por 96 horas (teste estático). Foram utilizadas placas de cultura celular (Figura 6 e 7) compostas por 24 poços com capacidade para 3 ml cada um. Em cada placa, 20 poços receberam 2 ml da concentração testada, e quatro poços receberam água desclorada sem agrotóxico. Todos os testes foram realizados em triplicata, totalizando 60 embriões expostos e 12 controles para cada concentração. Também foram colocadas três placas somente de controle, totalizando 72 embriões no controle.

Manteve-se a temperatura do laboratório na faixa de 20 a 24°C. Todas as observações feitas foram comparadas ao controle. Durante o ensaio agudo os embriões não foram alimentados.

Figura 6: Placas de cultura celular contendo embriões de *Physalaemus gracilis* expostos a formulação comercial de glifosato.



Fonte: Acervo pessoal.

Para a determinação da concentração letal média os embriões foram expostos a nove concentrações da formulação comercial de glifosato: 2500; 3500; 5000; 6000; 9000; 11000; 20000; 35000 e 50000 µg/L. A cada 24 horas, realizou-se o monitoramento da mortalidade dos embriões, para isso, cada poço da placa celular foi observado individualmente em estereomicroscópio com aumento de até 45 vezes.

O teste de toxicidade crônica seguiu o mesmo método experimental do teste agudo em relação as placas de cultura celular, porém o teste foi realizado em sextuplicata, totalizando 120 embriões expostos e 24 controles por concentração, e período de exposição de sete dias (168 horas). No controle totalizaram 192 embriões no total. Devido ao tempo necessário para realização do teste crônico, os embriões foram colocados em teste no estágio de embrião (17-18) e atingiram o estágio de larva 25 (Gosner, 1960 – Anexo A) durante o teste. Entre o estágio 17-25, o embrião vira uma larva, ocorrendo a transição de um embrião imóvel sustentado pelo ovo para uma larva livre-natante que se alimenta, com partes da boca completas, respiração branquial, inicialmente com brânquias externas (19-23/24) e depois com brânquias cobertas por um opérculo (estágio 25) (DUELLMAN; TRUEB, 1994). Essa metodologia permitiu o acompanhamento de todas as fases embrionárias até a formação da larva de forma completa.

No teste crônico foram testadas três concentrações de glifosato citadas na literatura: 65 e 280 $\mu\text{g/L}$ baseadas na CONAMA 357/2005 que dispõe sobre a classificação dos corpos de água (Classe I); e 144 $\mu\text{g/L}$ baseadas na literatura (DORNELLES, 2013; PERUZZO et al.,2008; RISSOLI et al.,2016). Além das concentrações já citadas também foi realizado um novo teste com concentrações de 500 $\mu\text{g/L}$ e 700 $\mu\text{g/L}$. Os embriões-larvas foram observados diariamente, a cada 24 horas, através de um estereomicroscópio, quanto á mortalidade, desenvolvimento, atividade natatória e malformação.

Figura 7: Teste agudo e crônico de *Physalaemus gracilis*, em placas de cultura celular, expostos a formulação comercial de glifosato, sendo realizados concomitantemente.



Fonte: Acervo pessoal.

As malformações foram observadas a partir do quinto dia de teste (120 horas). Neste período as larvas encontravam-se no estágio 25. Para identificação dessas anomalias, foram comparados os organismos expostos com as larvas do controle, tomando como base o estudo de Hu et al (2015). Foram analisadas e fotografadas com estereomicroscópio com sistema de imagem.

A atividade natatória começou a ser observada em 48 horas de teste, quando *Physalaemus gracilis* encontravam-se no estágio 22-23 (de acordo com Gosner, 1960; detalhes do desenvolvimento por tempo de observação na Tabela 3). Neste estágio de desenvolvimento começa a atividade natatória.

A atividade natatória foi analisada a partir das 48 horas de teste até as 168 horas, último dia de teste, através dos seguintes endpoints:

- [0]- Controle como padrão;
- [1]- Atividade natatória igual ao controle;
- [2]- Atividade natatória menor que o controle;
- [3]- Atividade natatória maior que o controle (mais agitados);
- [4]- Somente espasmos.

Qualquer embrião/larva que apresentou atividade natatória diferente do controle foi considerada com movimentação alterada. Considerou-se como embrião até o estágio 22 de Gosner (1960), a partir do estágio 23 era considerado como larva.

3.1 ANÁLISE DE DADOS

Para determinação da CL_{50} , se utilizou o método Trimmed spearman-karber, com nível de confiança de 95%. Para avaliação dos dados utilizou-se os testes Anova one way, com teste post-hoc (Tuckey ou Dunnet). Também foi calculada a concentração de efeito não observado (CENO), maior concentração nominal, e a concentração de efeito observado (CEO), menor concentração nominal, do agente tóxico, no programa Statistic a fim de verificar se o herbicida causou efeito em *Physalaemus gracilis*.

Para a realização deste estudo, obteve-se autorização do Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA n° 23205.003252/2016-65) e licença do ICMBIO para atividades com finalidade científica n° 54939-1 (Anexo B).

4. RESULTADOS

4.1 TESTE AGUDO

A CL_{50} de glifosato para embriões de *Physalaemus gracilis* foi de 10600 $\mu\text{g/L}$, (+95% =11530 $\mu\text{g/L}$, -95 % = 9740 $\mu\text{g/L}$). A taxa de mortalidade dos embriões/larvas do controle foi de 0,90%. Em 24 horas de teste, somente em duas concentrações a mortalidade foi alta: 25% de embriões/larvas mortos na concentração de 35000 $\mu\text{g/L}$ e 97% na de 50000 $\mu\text{g/L}$ (Tabela 1). A maior taxa de mortalidade ocorreu em 48 horas de teste, sendo 90% dos embriões/larvas mortos na concentração de 20000 $\mu\text{g/L}$ e 75% na concentração de 35000 $\mu\text{g/L}$. Apenas para as concentrações de 35000 e 50000 $\mu\text{g/L}$ ocorreu mortalidade total dos embriões/larvas, ao final do teste. A concentração influenciou na mortalidade dos embriões/larvas ($F_{8,18} = 73,82$; $p = 0,00$; significativo a partir de 900 $\mu\text{g/L}$, tukey, $p < 0,05$) ao contrário do tempo de exposição ($F_{3,32} = 0,73$; $p = 0,54$).

Tabela 1: Resultados do teste de toxicidade aguda para embriões/larvas de *Physalaemus gracilis* expostos ao glifosato.

Concentração ($\mu\text{g/L}$)	Mortalidade					CL ₅₀ ($\mu\text{g/L}$)
	24h	48h	72h	96h	Total	
Controle	0	0	0	1	1	
2500	0	0	0	2	2	
3500	0	0	0	3	3	
5000	1	0	0	4	5	10600
6000	1	2	4	8	15	-95 % CL = 9740
9000	0	0	0	22	22	+95% CL =
11000	0	0	0	25	25	11530
20000	0	54	5	0	59	
35000	15	45	0	0	60	
50000	58	2	0	0	60	

4.2 SOBREVIVÊNCIA E DESENVOLVIMENTO DOS EMBRIÕES NO TESTE CRÔNICO

No teste crônico (Tabela 2), a mortalidade dos embriões iniciou ainda nas primeiras 24 horas de teste. Neste período, ocorreu a mortalidade de 1,56% dos embriões do controle, 0,83% dos embriões na concentração de 65 $\mu\text{g/L}$, 4,17% na concentração de 280 $\mu\text{g/L}$ e de 1,67% na concentração de 144 $\mu\text{g/L}$. Na maioria das concentrações, foi registrada mortalidade

acentuada das larvas (estágio 25) a partir de 96 horas de exposição. Não houve mortalidade total das larvas em nenhuma das concentrações. No final das 168 horas de teste, ocorreu mortalidade elevada de larvas em todas as concentrações, variando entre, aproximadamente, 53,3% a 67,5%.

Nas concentrações de 500 e 700 µg/L, houve alta mortalidade do controle ainda nas 120 horas de teste, impossibilitando que o mesmo completasse as 168 horas de exposição, tornando-o irrelevante para qualquer tipo de análise. Por isso não consta nos resultados.

Tabela 2: Resultados do teste de toxicidade crônica para embriões/larvas de *Physalaemus gracilis* expostos ao glifosato.

Concentração (µg/L)	Mortalidade							Total
	24h	48h	72h	96h	120h	144h	168h	
Controle	3	1	1	4	7	0	1	17
65	1	1	2	16	13	13	35	81
144	5	0	4	11	28	6	10	64
280	2	0	7	6	18	21	19	73

O tempo de exposição influenciou na mortalidade dos embriões/larvas ($F_{6,14}=4,64$; $p \leq 0,01$; significativo em 120 e 168 horas de exposição, tukey, $p < 0,05$) ao contrário das concentrações ($F_{2,6}=0,58$; $p=0,59$).

O desenvolvimento dos embriões/larvas teve diferença em relação ao controle nas 96 horas de teste, com relação ao estágio de desenvolvimento durante o período de ensaio (Tabela 3). Mas na maioria do tempo foi semelhante.

Tabela 3: Desenvolvimento dos embriões/larvas de *Physalaemus gracilis* expostos a formulação comercial de glifosato e do controle no período de ensaio.

Tempo (h)	Estágio de Gosner (1960)	
	Controle	Expostos
0	18-19	18-19
24	20-21	20-21
48	22-23	22-23
72	23-24	23-24
96	25	24-25
120	25	25
144	25	25
168	25	25

4.3 ALTERAÇÕES NA ATIVIDADE NATATÓRIA

A maioria dos embriões/larvas de *Physalaemus gracilis* expostos apresentou alteração na atividade natatória em todas as concentrações quando comparados ao controle (Tabela 4). Foi considerado movimento alterado quando os embriões/larvas em teste crônico apresentavam movimento reduzido, movimentação aumentada (embriões/larvas mais agitados que o controle) e natação com contrações espasmódicas.

A atividade natatória reduzida teve o maior índice de ocorrência em 48 horas de teste. A partir das 72 horas de teste (estágio 23-24) a atividade natatória aumentada começou a ser observada, e nas 96 horas de teste (estágio 24-25) a atividade natatória espasmódica foi constatada. Nas 168 horas de teste verificou-se que 16,24% das larvas em teste crônico apresentaram movimento reduzido, 4,56% movimentação aumentada e 2,28% natação com contrações espasmódicas (Tabela 5 e 6).

Tabela 4: Alterações na atividade natatória apresentadas pelos embriões/larvas de *Physalaemus gracilis* expostos a concentrações crônicas da formulação comercial de glifosato.

Concentração (µg/L)	Número de expostos	Número de analisados	Embriões/larvas sem alterações na atividade natatória						Embriões/larvas com alterações na atividade natatória					
			48h	72h	96h	120h	144h	168h	48h	72h	96h	120h	144h	168h
			Controle	216	212	212	211	207	200	200	199	0	0	0
65	120	118	85	69	58	58	51	14	33	24	14	6	8	16
144	120	115	75	52	60	39	45	33	40	23	3	16	14	8
280	120	118	89	75	66	49	37	12	29	16	16	21	11	15

Tabela 5: Atividade natatória de *Physalaemus gracilis* exposto a formulação comercial de glifosato, de acordo com os endpoints analisados.

Concentração µg/L	Número de larvas com atividade natatória			
	[1]- Igual ao controle	[2]- Menor que o controle	[3]- Maior que o controle	[4]- Somente espasmos
Controle	0	0	0	0
65	15	20	2	3
144	33	18	1	2
280	12	19	13	3

Tabela 6: Atividade natatória de *Physalaemus gracilis* exposto a formulação comercial de glifosato, de acordo com os endpoints analisados: [0] Controle como padrão; [1] Atividade natatória igual ao controle; [2] Atividade natatória menor que o controle; [3] Atividade natatória maior que o controle; [4] Somente espasmos. Os valores apresentados se referem a moda (valores mais freqüentes) nas observações a cada 24 horas.

Concentração µg/L	Atividade natatória					
	48h	72h	96h	120h	144h	168h
Controle	0	0	0	0	0	0
65	1	1	1	1	1	2
144	1	2	1	1	1	1
280	1	1	1	1	1	2

Constatou-se que 23,36% dos embriões/larvas expostos apresentaram alteração na atividade natatória. Além disso, foi possível observar que alguns embriões/larvas conseguiram recuperar a atividade natatória, contudo muitos deles apresentavam novamente alterações ou morriam. O tempo de exposição ao herbicida não foi significativo ($F_{5,18}=1,59$; $p=0,21$), mas a concentração afetou significativamente a atividade natatória dos embriões/larvas de *Physalaemus gracilis* expostos ($F_{3,20}=5,82$, $p\leq 0,01$, onde todas as concentrações foram significativas em relação ao controle, Dunnet, $p<0,05$). Na concentração de 65 µg/L 21,67% dos embriões/larvas apresentaram alteração na atividade natatória, na concentração de 144 µg/L 17,5% e na concentração de 280 µg/L, 29,17%.

Para atividade natatória, o CENO em *Physalaemus gracilis* foi a concentração 144 µg/L e o CEO 280 µg/L da formulação comercial de glifosato. O valor crônico ou a máxima concentração de toxicante aceitável para atividade natatória foi 212 µg/L.

4.4 MALFORMAÇÕES

Foi detectada a presença de malformação em todas as concentrações testadas, inclusive em larvas do controle (Tabela 7). As malformações observadas não foram significativas em relação ao controle ($F_{3,8}=0,49$; $p=0,70$). No entanto, quando analisados os tipos de malformação separadamente (Tabela 8), a diferença foi significativa em relação ao controle ($F_{9,26}=10,595$; $p<0,05$), sendo significativa a malformação na boca (Dunnet, $p<0,05$).

Tabela 7: Malformações apresentadas pelas larvas de *Physalaemus gracilis* expostos a concentrações crônicas da formulação comercial de glifosato.

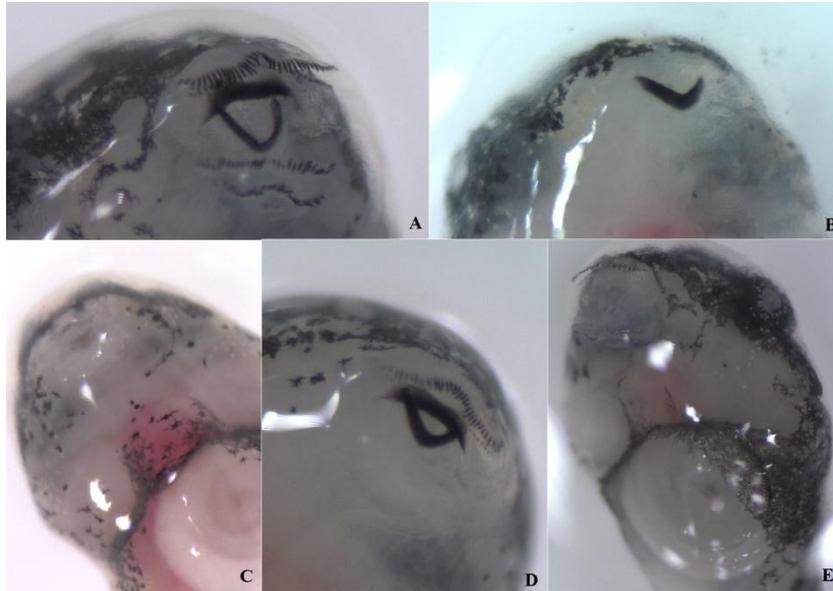
Concentração ($\mu\text{g/L}$)	Número de expostos	Número de analizados	Sem malformação			Com malformação		
			120h	144h	168h	120h	144h	168h
Controle	216	200	191	182	176	9	5	3
65	120	87	78	58	22	9	7	9
144	120	72	68	60	28	4	4	26
280	120	87	81	57	15	7	7	28

As malformações encontradas consistiram em: alterações na boca, no formato do intestino, lente turva, corpo inchado, abdômen alongado, cauda curvada ou tortuosidade na cauda e corcunda (Tabela 8). A malformação na boca foi ausência de keratodonts e partes do lábio superior e inferior (Figura 8B, C, D e E), que ocorreu em 40,74% das larvas em teste.

Tabela 8: Tipos de malformações observadas em *Physalaemus gracilis* expostos a formulação comercial de glifosato e controle.

Tipos de Malformação	Controle	65 $\mu\text{g/L}$	144 $\mu\text{g/L}$	280 $\mu\text{g/L}$
Formato da cabeça	0	4	5	5
Olho	2	3	0	7
Boca	10	20	27	31
Corpo inchado	0	1	4	8
Abdômen alongado	0	0	1	1
Intestino	3	3	9	13
Cauda curvada	2	19	1	4
Tortuosidade na cauda	0	4	2	2
Corcunda	0	0	1	1

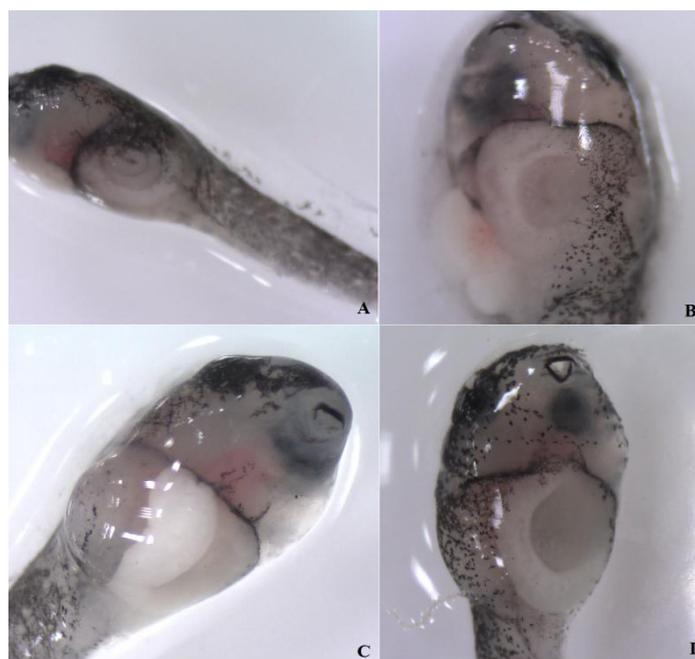
Figura 8: Malformações na boca das larvas de *Physalaemus gracilis* no estágio 25. “A” boca de um indivíduo do controle, “B e C” após a exposição à concentração de 65 µg/L, “D” após a exposição à concentração de 144 µg/L e “E” após a exposição à concentração de 280 µg/L, fotografados com estereomicroscópio de imagem com aumento de 5 vezes.



Fonte: Acervo pessoal.

Quanto as alterações no formato do intestino, 12,96% das larvas expostas apresentaram intestino inchado ou com um formato nada semelhante ao formato normal (Figura 9) que é em espiral.

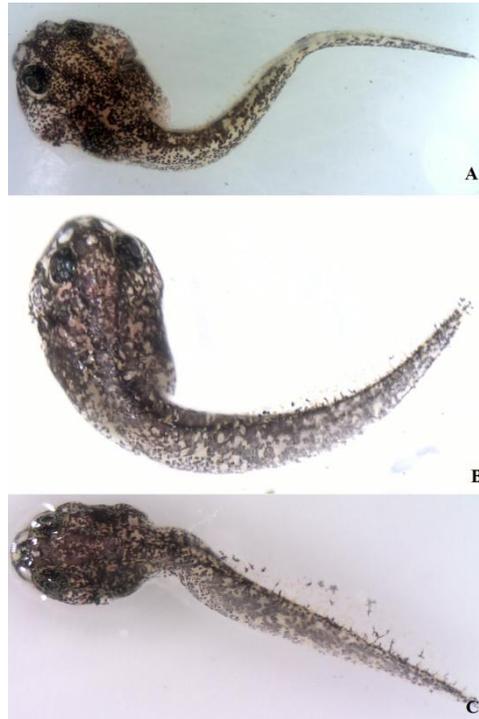
Figura 9: Intestino normal em formato de espiral do controle (A) e intestino malformado de larva de *Physalaemus gracilis* no estágio 25, após exposição às concentrações de 65 µg/L (D) e de 144 µg/L (B e C) de formulação comercial de glifosato, fotografadas com estereomicroscópio de imagem com aumento de 3 vezes.



Fonte: Acervo pessoal.

No que se refere às alterações na cauda, 12,04% das larvas expostas apresentaram cauda curvada (Figura 10). Essa alteração foi constatada até em dois embriões do controle, aumentando significativamente na concentração de 65 µg/L.

Figura 10: Caudas malformadas presente em larvas de *Physalaemus gracilis* no estágio 25 do controle (A), e após exposição à concentração de 65 µg/L (B e C) da formulação comercial de glifosato, fotografadas com estereomicroscópio de imagem com aumento de 2 vezes.



Fonte: Acervo pessoal.

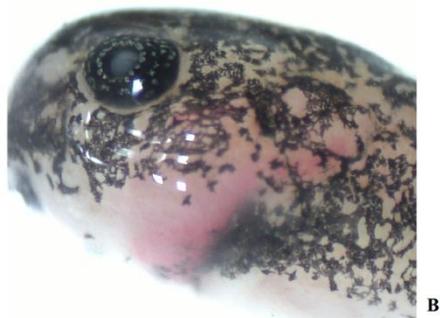
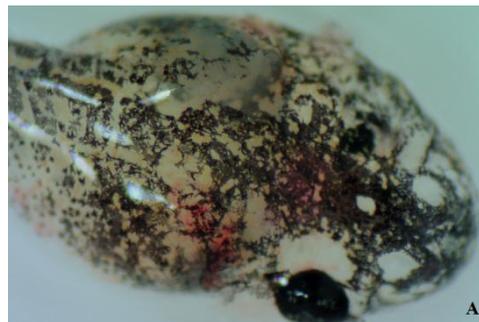
As menores alterações diagnosticadas foram de formato da cabeça 6,48%, corpo inchado (Figura 11) 6,02%, tortuosidade na cauda 3,70% em todas as concentrações com exceção do controle, e lente turva ou malformação do olho (Figura 12) em 5,5% dos embriões do controle e das concentrações de 65 e 280 µg/L.

Figura 11: Larvas de *Physalaemus gracilis* no estágio 25 com corpo no formato normal do controle (A) e com malformação de corpo inchado após exposição às concentrações de 65 (B) e 144 $\mu\text{g/L}$ (C), fotografadas com estereomicroscópio de imagem com aumento de 2 vezes.



Fonte: Acervo pessoal.

Figura 12: Malformação no olho (A) ou lente turva (B) em larvas de *Physalaemus gracilis* no estágio 25, após a exposição às concentrações de 280 e 65 $\mu\text{g/L}$ da formulação comercial de glifosato, fotografadas com estereomicroscópio de imagem com aumento de 4 vezes.



Fonte: Acervo pessoal.

Foram constatadas, ainda, malformações como corcunda e abdômen alongado, mas estas foram em apenas 0,93% das larvas.

5. DISCUSSÃO

O glifosato foi um herbicida com baixa toxicidade aguda para embriões/larvas de *Physalaemus gracilis*. A CL_{50} de 10600 $\mu\text{g/L}$ para embriões/larvas é maior do que para larvas de *Physalaemus cuvieri* (ALMEIDA, 2014; COSTA, 2014), *Rana pipiens* (HOWE et al., 2004) e *Rana clamitans* (HOWE et al., 2004), que apresentaram CL_{50} de 7120 (ALMEIDA, 2014), 1600 (COSTA, 2014), 9200 (HOWE et al., 2004) e 6500 (HOWE et al., 2004) $\mu\text{g/L}$. A formulação comercial de glifosato apresentou baixa toxicidade para os embriões/larvas, uma vez que, as maiores taxas de mortalidade foram registradas nas concentrações mais elevadas.

Na fase embrionária, anfíbios estão envoltos em substâncias gelatinosas que servem como camada protetora (WOEHL JR; WOEHL, 2008), tornando-os mais resistentes ao efeito do tóxico. Costa (2014) verificou alta toxicidade de Roundup Original® para *Physalaemus cuvieri* expostos a partir do estágio 25 de desenvolvimento.

No presente estudo as concentrações utilizadas para exposição dos girinos de *Physalaemus gracilis* foram preparadas mediante dissolução da formulação comercial do glifosato, enquanto o autor Howe et al. (2004), utilizou em um de seus experimentos concentrações partindo do princípio ativo e obteve uma CL_{50} de 28600 $\mu\text{g/L}$ para *Rana clamitans*. Essa diferença de toxicidade pode ser em virtude da presença de ingredientes inertes sugerindo que a formulação comercial seja mais tóxica que o princípio ativo (SILVA e al., 2013), lembrando que a toxicidade também irá depender muito do surfactante empregado na formulação do glifosato (BRODEUR et al., 2014).

No teste crônico, foram testadas concentrações subletais, onde são esperadas alterações na estrutura e fisiologia dos organismos aquáticos, no lugar da mortalidade em massa (LANGIANO, 2006). O glifosato pertence á classe dos organofosforados, é caracterizado por apresentar implicações a saúde ambiental devido aos efeitos desses agentes ao logo do tempo (ABRASCO, 2015).

Em testes com o organofosforado Folisuper 600BR em *Physalaemus cuvieri* Silva et al. (2013), constatou alto potencial para redução da população deste anfíbio, e até mesmo para a dizimação da espécie presentes em agrossistemas aquáticos causando um desequilíbrio ao longo do tempo. Anfíbios ligados a esses ambientes exercem um importante papel no transporte de energia e de nutrientes entre água e solo, além de transportar os poluentes por bioacumulação impactando diversas cadeias tróficas, podendo inclusive ocasionar efeitos adversos à fauna, adicionais ao estresse natural do sistema (SILVA et al., 2013).

Apesar da baixa toxicidade no teste agudo para embriões/larvas, o teste crônico demonstrou que a formulação comercial de glifosato pode causar efeitos graves, como a

alterações na atividade natatória em *Physalaemus gracilis* na fase inicial da vida. Alterações como contrações espasmódicas ou natação anormal na atividade natatória de *Physalaemus gracilis*, também foram constatadas em *Physalaemus cuvieri* estudada por Almeida (2014), ao contrário da espécie estudada pelo mesmo autor, *Rhinella ictérica* que não apresentou diferença significativa entre o comportamento afetado e as concentrações ($p=0,22$ e $F=1,55$).

A fase inicial da vida de um organismo é onde ocorre a formação dos tecidos e órgãos tornando os efeitos xenobióticos mais acentuados (BROEG et al, 2005). Neste estudo vários tipos de malformação foram verificados, sendo o mais significativo em relação às estruturas bucais. A malformação na boca pode comprometer a sobrevivência da espécie, em razão dos girinos se alimentarem raspando, com a boca, materiais aderidos ao substrato além de filtrar alimentos liberados na água (BAHIA, 2007). Seguida das malformações no intestino que pode comprometer o desenvolvimento adequado dos animais; e na cauda, que pode alterar a atividade natatória do animal deixando-o vulnerável no ambiente em que está inserido (ALMEIDA, 2014).

Almeida (2014), também obteve maior incidência de alteração morfológica na boca em suas avaliações de malformações, porém para um tempo amostral de 96 horas e para as espécies de *Physalaemus cuvieri* e *Rhinella ictérica*. Não foram encontrados resultados semelhantes com a formulação comercial de glifosato para *Physalaemus gracilis*.

Amarante Junior et al. (2002), afirma que o glifosato pode causar defeitos crônicos de nascimento em determinadas espécies de animais, quando administrado em doses elevadas e por um período prolongado. Contudo, as concentrações utilizadas neste estudo foram administradas em 168 horas de teste, equivalente a sete dias, não são elevadas, além disso são permitidas pela legislação vigente no Brasil, e comumente encontradas em águas doces, todavia causaram malformações e alterações na atividade natatória nos embriões/larvas de *Physalaemus gracilis*.

Segundo Resolução CONAMA n°357/05 (2005), o limite padrão de glifosato em águas doces é de 65 µg/L. Este valor também é adotado no Canadá e é o menor limite de glifosato estabelecido para águas no mundo (SINDAG, 2006). Contudo, para o teste crônico realizado neste estudo, essa concentração apresentou a maior variedade quanto aos tipos de malformações como alterações na boca, no intestino, cauda curvada, lente turva e corpo inchado, mesmo não sendo a concentração com maior número de indivíduos malformados. Além disso, 21,67% dos embriões/larvas de *Physalaemus gracilis* expostos a essa concentração apresentaram alterações na atividade natatória e um alto índice de mortalidade.

O limite padrão de glifosato permitido em água potável pela FUNASA é de 500 µg/L (SINDAG, 2006). O valor crônico para atividade natatória foi de 212 µg/L. Houve malformação em valores abaixo disso. Isso significa que o valor permitido por lei para água de consumo humano está muito acima do que causa efeitos ecotoxicológicos crônicos em anfíbios.

Embora a legislação brasileira contemple importantes agrotóxicos, sua amplitude ainda é muito deficiente, pois dispõe de poucas informações sistematizadas quanto à identificação de contaminantes químicos em ambientes aquáticos e quanto às relações entre esses contaminantes e os efeitos adversos que podem causar, obtidos através de estudos toxicológicos (FERNANDES NETO; SARCINELLI, 2009). Os peixes e os invertebrados aquáticos são os mais sensíveis ao herbicida glifosato e aos outros componentes de seus produtos comerciais (AMARANTE JUNIOR et al., 2002), devido à sua pele muito permeável e da dependência do ambiente aquático para reprodução e desenvolvimento dos estágios larvais, o que pode ocasionar efeitos significativos nos indivíduos bem como nas populações de anfíbios.

Essa deficiência no que se refere à informação sobre os efeitos tóxicos em espécies de anfíbios, se deve a falta de especificação quanto a alguns princípios ativos de relevância, como as classes dos organofosforados e carbamatos, largamente utilizados no país e de grande toxicidade (FERNANDES NETO; SARCINELLI, 2009). Por isso, é importante reforçar a realização de estudos ecotoxicológicos baseados não só nos ingredientes ativos dos agrotóxicos, mas também em suas diferentes formulações que são as mais utilizadas na agricultura.

6. CONCLUSÕES

A CL_{50} da formulação comercial de glifosato para embriões/larvas de *Physalaemus gracilis* foi de 10600 $\mu\text{g/L}$. A menor incidência de alteração na atividade natatória e morfologia foi registrada nas concentrações de 144 e 65 $\mu\text{g/L}$, respectivamente. No entanto, mais da metade dos indivíduos expostos foi afetada ainda na concentração de 65 $\mu\text{g/L}$, diferente do ocorrido para as malformações, em que nem metade dos indivíduos expostos chegaram a ser afetados. Apesar da taxa de mortalidade dos embriões/larvas expostos ao herbicida ter sido baixa no teste agudo, nas concentrações subletais demonstrou potencial para causar alterações no movimento e morfológicas, esse último com menos significância.

Os efeitos morfológicos identificados foram malformações na boca, no intestino, na cauda, no olho, no formato do corpo ou da cabeça, além de malformações como corcunda e abdômen alongado, sendo apenas as três primeiras com maior incidência. As alterações no movimento foram com contrações espasmódicas com algum tipo de estímulo, movimento reduzido e movimento aumentado (indivíduos agitados). Com isso, conclui-se que as doses subletais testadas da formulação comercial do glifosato afetaram a morfologia e a mobilidade de *Physalaemus gracilis*, na fase inicial do desenvolvimento larval, o que provoca danos para a sobrevivência da espécie.

Quanto ao uso da espécie de *Physalaemus gracilis*, também chamada de rã-chorona, como organismo teste para ensaios de toxicidade constitui um bom modelo para avaliação da suscetibilidade das espécies nativas ao efeito da formulação comercial do glifosato, por se tratar de uma espécie em ampla distribuição geográfica no Brasil, principalmente em áreas rurais onde utilizam corpos d'água lânticos para sua reprodução e desenvolvimento de suas larvas, muitas vezes em áreas de agricultura podendo ser expostas a possíveis contaminações por agrotóxicos.

A avaliação ecotoxicológica é uma importante ferramenta para análise dos efeitos prejudiciais dos agrotóxicos particularmente em espécies nativas. Os anfíbios refletem um grupo de risco, ameaçado principalmente pela perda e degradação de habitat. Além disso, a exposição aos agrotóxicos desempenha papel fundamental no declínio das populações de anfíbios.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRASCO. Dossiê: **Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. 2015. Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio. Rio de Janeiro, RJ.
- ALMEIDA, P. R. **Toxicidade aguda (LC50) e efeitos comportamentais e morfológicos do formulado comercial roundup original® em girinos de *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leptodactylidae) E *Rhinella icterica* (Anura, Bufonidae)**. 2014. Universidade Federal de Alfenas. Poços de Caldas, MG.
- AMARANTE JUNIOR, O. P. de et al. Glifosato: Propriedades, Toxicidade, Usos e Legislação. **Quim. Nova**, v. 25, n. 4, p.589-593. 2002.
- BAHIA, V. R. L. de O. **Morfologia e enzimologia do sistema digestório dos girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*) durante o desenvolvimento e metamorfose**. 2007.164 f. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista, UNESP, Jaboticabal, 2007.
- BORGES-MARTINS, M. et al. **Anfíbios**. 2007. Disponível em: <http://www.researchgate.net/profile/Fernando_Becker2/publication/255992592_Anfbios/links/00b49521505c2c6599000000.pdf>. Acesso em: 03 set. 2016.
- BRANDÃO, F. P. et al. Influência da temperatura na toxicidade de cobre em girinos de rã verde *Pelophylax perezii*. **Revista Captar: Ciência e Ambiente para Todos**, v. 3, n. 1, 2011.
- BRASIL. **Lei nº 7802, de 11 de julho de 1989**. 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, e dá outras providências. Brasília, 11 jul. 1989. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/L7802.htm>. Acesso em: 16 out. 2016.
- BRODEUR, J. C. et al. Synergy between glyphosate- and cypermethrin-based pesticides during acute exposures in tadpoles of the common South American Toad *Rhinella arenarum*. **Chemosphere**, [s.l.], v. 112, p.70-76, out. 2014. Elsevier BV.
- BROEG, K. et al. The “bioeffect assessment index” (BAI): a concept for the quantification of effects of marine pollution by an integrated biomarker approach. **Marine Pollution Bulletin**, v. 50, n. 5, p.495 - 503, 2005.
- CHEUNG, Y. K.; KLOTZ, J. H.; The Mann-Whitney Wilcoxon distribution using linked lists. **Statistical Sinica**, v. 7, p. 805-813, 1997.
- CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução nº357/05**. Estabelece a classificação das águas doces, salobras e salinas do Território Nacional. Brasília, SEMA, 2005.
- COSTA, R. Nunes. **Medindo os Impactos do Glifosato e do Estresse Ambiental com uma Régua: Assimetria Flutuante e Mortalidade em Girinos (Amphibia: Anura) de *Physalaemus cuvieri* (Leptodactylidae) e *Scinax fuscomarginatus* (Hylidae)**. 2014. Universidade Federal de Goiás. Goiânia, GO.
- DORNELLES, M.F. **Efeito dos herbicidas atrazina, glifosato e quinclorac sobre a composição bioquímica, a peroxidação lipídica e a sobrevivência de girinos de *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802)**. 2013.155f. Dissertação (Mestrado em Zoologia)- Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

- DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L.; **Biology of Amphibians**. New York: McGraw-Hill, 1986.
- EMBRAPA. **Uso de agrotóxicos no Brasil é compatível com a área cultivada**. Paraná, 2017. Disponível em: <<http://blogs.canalrural.com.br/embrapasoja/2017/03/30/uso-de-agrotoxicos-no-brasil-e-compativel-com-area-cultivada/#sthash.IraHb46w.dpuf>>. Acesso em: 21, jun. 2017.
- FAVRETTO, M. A.. **Parque natural municipal Rio do Peixe, Joaçaba, SC: Fauna de Vertebrados**. 2011.
- FERNANDES NETO, M. de L.; SARCINELLI, P. de N. Agrotóxicos em água para consumo humano: uma abordagem de avaliação de risco e contribuição ao processo de atualização da legislação brasileira. **Eng Sanit Ambient**, v. 14, n. 1, p.69-78, jan/mar. 2009.
- GONÇALVES, M. W. et al. Avaliação de danos genômicos em anfíbios anuros do cerrado goiano. **Estudos**, Goiânia, v. 41, p.89-104, nov. 2014.
- HOWE, C. M.; BERRILL, M.; PAULI, B. D.; HELBING, C. C.; WERRY, K.; VELDHOEN, N. **Toxicity of glyphosate-based pesticides to four north American frog species**. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.23, n.8, p.1928–1938, 2004.
- HU, L.; ZHU, J.; ROTCHELL, J. M.; WU, L.; GAO, J.; SHI, H. Use of the enhanced frog embryo teratogenesis assay-Xenopus (FETAX) to determine chemically-induced phenotypic effects. **Science of the Total Environment**, v. 508, p. 258-265, 2015.
- IBAMA. **Boletim de comercialização de agrotóxicos e afins**. Histórico de vendas 2000 a 2012. Brasília, DF. 2016. Disponível em: <https://www.icict.fiocruz.br/sites/www.icict.fiocruz.br/files/IBAMA_boletim%20de%20comercializacao_2000_2012.pdf>. Acesso em: 15 set. 2016.
- IBAMA. **Agrotóxicos e afins registrados no IBAMA**. 2015. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/phocadownload/Qualidade_Ambiental/produtos_na_ibama_2015.pdf>. Acesso em: 15, set. 2016.
- IUCN. **Red List of Threatened Species**. 2017. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em: 22 jun. 2017.
- KOPP, K.; SIGNORELLI, L.; BASTOS, R. P. Distribuição temporal e diversidade de modos reprodutivos de anfíbios anuros no Parque Nacional das Emas e entorno, Estado de Goiás, Brasil. **Iheringia, Série Zoologia**, Porto Alegre, v. 100, n. 3, p.192-200, set. 2010.
- LAJMANOVICH, R. C.; SANDOVAL, M. T.; PELTZER, P. M. Induction of mortality in *Scinax nasicus* tadpoles exposed to glyphosate formulations. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 70, p. 612-618, 2003.
- LANGIANO, V. C. **Toxicidade do Roundup® e seus efeitos para o peixe neotropical Prochilodus lineatus**. 2006. 72 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006. Disponível em: <<http://www.uel.br/laboratorios/lefa/dissertacaovivian.pdf>>. Acesso em: 26 jun. 2017.
- LINGNAU, R. **Distribuição temporal, atividade reprodutiva e vocalizações em uma assembleia de anfíbios anuros de uma floresta ombrófila mista em Santa Catarina, sul do Brasil**. 2009. 103 f. Tese de Doutorado – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2009.
- MAGALHÃES, D.P.; FERRÃO FILHO, A.S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia brasiliensis**, v. 12, p. 355–381, 2008.

MONSANTO. **Bula Roundup Original**, 2017. Disponível em:

<<http://www.monsantoglobal.com/global/br/produtos/Documents/roundup-original-dibula.pdf>>. Acesso em: 21, jun. 2017.

MONTANHA, F. P.; PIMPÃO, C. T.. Efeitos toxicológicos de piretróides (cipermetrina e deltametrina) em peixes - Revisão. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. n. 18, p.1-58, Semestral. Ano IX. jan. 2012.

NAKAGOME, F.; NOLDIN, J. A.; RESGALLA JUNIOR, C.. Toxicidade aguda e análise de risco de herbicidas e inseticidas utilizados na lavoura do arroz irrigado sobre o cladóceros *Daphnia magna*. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 16, p.93-100, jan./dez. 2006.

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

RISSOLI, R. Z.; ABDALLA, F. C.; COSTA, M. J.; RANTIN, F. T.; McKENZIE, D. J.; KALININ, M. J. Effects of glyphosate and the glyphosate based herbicides Roundup Original and Roundup Transorb on respiratory morphophysiology of bullfrog tadpoles. **Chemosphere**, v. 156, p. 37-44, 2016.

SEGALLA, M. V. et al. Brazilian Amphibians: List of Species. **Herpetologia Brasileira: Mudanças Taxonômicas**, v. 3, n. 2, p.37-47, jul. 2014.

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, Criciúm.

SILVA, Hamanda S. V. P. et al. **Toxicidade aguda e genotoxicidade do agrotóxico comercial Folisuper 600br a girinos DE *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leiuperidae)**. 2013. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 23, p. 1-10. Curitiba, PR.

SILVA, J. M.; SANTOS, J. R. Toxicologia de agrotóxicos em ambientes aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v.11, p.565-573, 2007.

SILVA, M. R.; CAMPOS, A.C. E.; BOHM, F. Z.. Agrotóxicos e seus impactos sobre ecossistemas aquáticos continentais. **Sabios - Revista de Saúde e Biologia**, Paraná, v. 8, n. 2, p.46-58, maio/ago 2013.

SINDAG. **Parecer Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola (SINDAG) sobre o limite padrão de glifosato na água**. São Paulo. 2006.

TOLLEDO, J. et al. Amphibia, Anura, Leiuperidae, *Physalaemus jordanensis* Bokermann, 1967: Distribution extension and geographic distribution map. **Check List: Notes on geographic distribution**, v. 3, n. 5, p.422-424, 2009.

VANCONCELOS, 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.

VIRGINIA HERPETOLOGICAL SOCIETY. **The Gosner(1960) staging system for Anurans**. 2016. Disponível em:

<<http://www.virginiaherpetologicalsociety.com/amphibians/amphibian-development/amphibian-development.htm>>. Acesso em: 28 nov. 2016.

WOEHL JR., G.; WOEHL, E.N. **Anfibios da Mata Atlântica**. Instituto Rã-bugio para Conservação da Biodiversidade, Jaraguá do Sul, 2008, 61p.

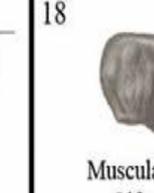
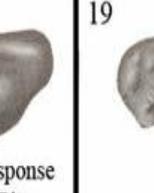
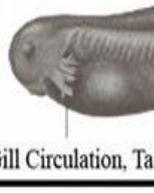
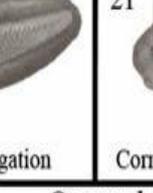
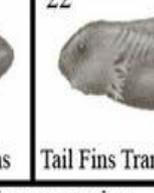
ZANK, C. et al. **Anfibios**. 2014. Disponível em:

<https://www.researchgate.net/publication/269697878_Anfibios>. Acesso em: 25 nov. 2016.

ANEXO A

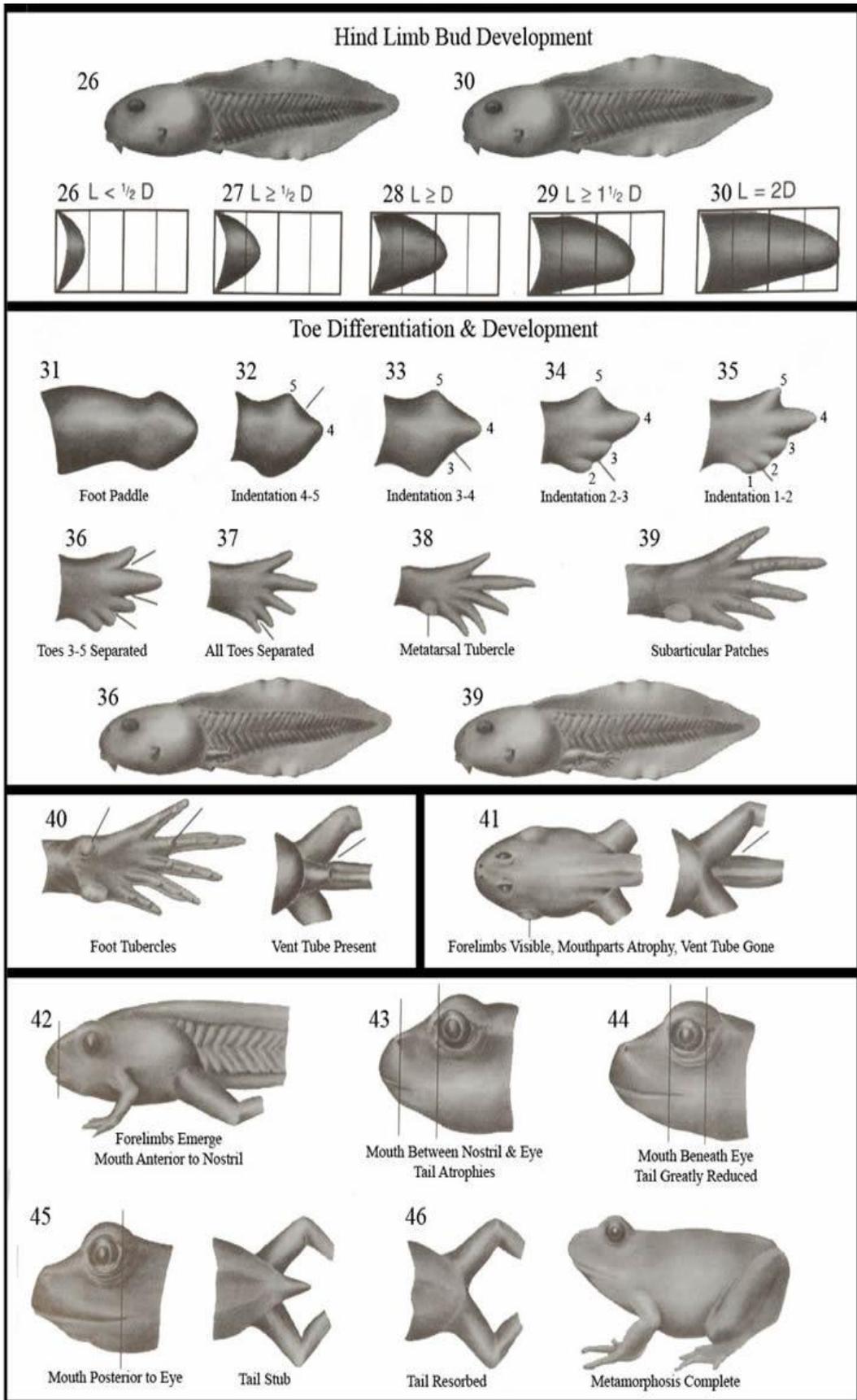
Tabela de Gosner (1960), utilizada para classificar os indivíduos em estágios de desenvolvimento de 1 a 25.

E
M
B
R
Y
O
S

1  Fertilization	2  Gray Crescent	3  2-Cell	4  4-Cell	5  8-Cell
6  16-Cell	7  32-Cell	8  Midcleavage	9  Late Cleavage	10  Dorsal Lip
11  Yolk Plug	12  Late Gastrula	13  Neural Plate	14  Neural Folds	15  Elongation, Rotation
16  Neural Tube, Gill Plates	17  Tail Bud Adhesive Gland	18  Muscular Response Olfactory Pits	19  Heart Beat Gill Buds	
20  Gill Circulation, Tail Elongation	21  Cornea Transparent, Mouth Opens	22  Tail Fins Transparent, Fin Circulation		
Operculum, Oral Disc, and Pigmentation				
23  Labia and Teeth Differentiate Operculum Covers Gill Bases	24  External Gills Atrophy Operculum Closes on Right	25  Mouthparts Obvious Spiracle Forms on Left		

H
A
T
C
H
L
I
N
G
S

L
A
R
V
A
E



Fonte: Virginia Herpetological Society, 2016.

ANEXO B

Certificação do CEUA, nº 23205.003252/2016-65 e autorização do ICMBIO para atividades com finalidade científica nº 54939-1



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Universidade Federal da Fronteira Sul
Campus de Realeza

CR 033/CEUA/UFS/2016

Realeza/PR, 16/11/2016.

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “*Desenvolvimento de protocolo metodológico para utilização de anfíbios como bioindicadores ecotoxicológico da contaminação por agrotóxicos*”, protocolo nº 23205.003252/2016-65, sob a responsabilidade de MARÍLIA TERESINHA HARTMANN – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** *ad referendum* no dia **07/11/2016**.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência de autorização	Início: 11/2016 Término: 31/07/2017.
Espécie/linhagem/raça	<i>Physalaemus cuvieri</i> ; <i>Physalaemus gracilis</i> .
Nº de animais	Cerca de 300 larvas de cada espécie.
Peso/Idade	Não informado. / Larvas.
Sexo	Não informado.
Origem	Coleta das desovas em lagoas temporárias, no Horto florestal de Erechim.

Atenciosamente,

Valfredo Schlemper
Vice-Coordenador da CEUA/UFS

COORDENAÇÃO DA CEUA-COMISSÃO
DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
Universidade Federal da Fronteira Sul-UFS



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 54838-1	Data da Emissão: 13/07/2018 11:18	Data para Revalidação*: 12/08/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Marília Teresinha Hartmann	CPF: 507.015.680-20
Título do Projeto: DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLO METODOLÓGICO PARA UTILIZAÇÃO DE ANFÍBIOS COMO BIONDICADORES ECOTOXICOLÓGICOS DA CONTAMINAÇÃO POR AGROTÓXICOS	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL	CNPJ: 11.234.780/0001-50

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de anfíbios	08/2016	04/2017
2	Testes de toxicidade	08/2016	08/2017
3	Manutenção das amostras	08/2016	08/2017
4	Análise dos dados	01/2017	07/2017
5	Confeção de artigos e relatórios	07/2017	07/2017

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo deverão ser realizadas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes de cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, possuidor ou morador da área dentro dos limites da unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para as fins previstas na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2016, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviço on-line - Licença para Importação ou exportação de fora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros de sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falta de descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/ogam .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Outras ressalvas

1	A pesquisadora deverá apresentar o projeto para comitê de ética (CEUA) de sua instituição ou de instituição parceira e só deverá iniciar os trabalhos após aprovação do mesmo pelo comitê.
---	--

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	PAULO AFRONSO HARTMANN	Pesquisador	073.713.450-53	3047730977 SSP-RS	Brasileira
2	Sustien Andreass Rinas Trindade	Pesquisadora	023.758.590-48	8708877811 SSP-RS	Brasileira
3	Jessica Samara Harsk	Pesquisador	029.453.790-36	1110034488 SSP-RS	Brasileira
4	Luana Vargas	Pesquisadora	008.207.200-54	4020487488 SSP-RS	Brasileira

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 94474112





Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 54888-1	Data da Emissão: 13/07/2016 11:18	Data para Revalidação*: 12/08/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 032014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Marília Teresinha Hartmann	CPF: 507.015.680-20
Título do Projeto: DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLO METODOLÓGICO PARA UTILIZAÇÃO DE ANFÍBIOS COMO BIOINDICADORES ECOTOXICOLÓGICOS DA CONTAMINAÇÃO POR AGROTÓXICOS	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL	CNPJ: 11.234.780/0001-50

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	ERECIM	RS	Universidade Federal de Fronteira Sul	Fora da UC Federal
2	ERECIM	RS	Horto Florestal do Município de Erechim	Fora da UC Federal

Atividades X Taxons

#	Atividade	Taxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Lepidodactylus latrans, Rhinella icterica, Physalaemus cuvieri, Physalaemus gracilis
2	Coleta/transporte de espécimes de fauna silvestre in situ	Lepidodactylus latrans (Cota: 5), Physalaemus cuvieri (Cota: 5), Physalaemus gracilis (Cota: 5), Rhinella icterica (Cota: 5)
3	Manutenção temporária (até 24 meses) de vertebrados silvestres em cativeiro	Lepidodactylus latrans, Rhinella icterica, Physalaemus cuvieri, Physalaemus gracilis

* Quantidade de indivíduos por espécie, por localidade ou unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Anfíbio)	Ovos
2	Método de captura/coleta (Anfíbio)	Captura manual

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA	coleção

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 032014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 94474112



Página 2/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 54938-1	Data da Emissão: 13/07/2018 11:18	Data para Revalidação*: 12/08/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 032014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Marília Teresinha Hartmann	CPF: 507.015.680-20
Título do Projeto: DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLO METODOLÓGICO PARA UTILIZAÇÃO DE ANFÍBIOS COMO BIOINDICADORES ECOTOXICOLÓGICOS DA CONTAMINAÇÃO POR AGROTÓXICOS	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL	CNPJ: 11.234.780/0001-50

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 032014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 94474112



EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS DO HERBICIDA GLIFOSATO EM EMBRIÕES DE
Physalaemus gracilis (ANURA: LEPTODACTYLIDAE)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada ao Curso de Engenharia Ambiental e Sanitária da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Ambiental e Sanitária.

Acadêmica: Suélen Andressa Rinas Trindade

Orientadora Prof^ª Dr^ª Marília Teresinha Hartmann