



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ – UESC
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA



Toxicidade do Herbicida Roundup Original DI® em girinos de *Physalaemus erikae* e
Physalaemus cicada (Anura: Leptodactylidae)

Mário Barbosa da Silva Júnior

ILHÉUS - BA
2020

MÁRIO BARBOSA DA SILVA JÚNIOR

**Toxicidade do herbicida Roundup Original DI® em girinos de *Physalaemus erikae* e
Physalaemus cicada (Anura: Leptodactylidae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zoologia da Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Zoologia
Orientador: Victor Goyannes Dill Orrico
Coorientador: Renan Nunes Costa

**ILHÉUS - BA
2020**

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus por de várias formas ter me ajudado a concluir este trabalho, e não só isso, também ter feito eu uma pessoa melhor. Em seguida agradeço meus familiares que sempre me apoiaram, principalmente meus pais, Maria Ivanilde da Silva e Mário Barbosa da Silva, e minha irmã Márcia Letícia.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, portanto agradeço a fundação pela concessão da bolsa. Agradeço também UESC e ao programa de Pós-graduação em Zoologia pela oportunidade de fazer o mestrado. Ao Laboratório de Zoologia de Vertebrados por oferecer suporte e estrutura para a realização dos experimentos que compõem este trabalho.

Quero agradecer também meus professores de graduação que possibilitaram que eu chegasse até aqui. Um agradecimento ao Prof. Mauro Sérgio, que teve uma grande contribuição na formação da pessoa que sou hoje. Agradeço também aos meus amigos Vinícius Lima, Luciano Neto, Mauro Aparecido, Teresa Beatriz, Francejane Machado, Milena Paraguai e Crisllaynes Lima, estes que sempre estiveram do meu lado quando precisei.

Agradeço também a todos os meus colegas de laboratório que diretamente e indiretamente contribuíram com a realização deste trabalho. Destaco, Omar Padilla, Iuri Dias, Marcelo Sena e Caio Vinicius. O meu imenso obrigado aos meus orientadores Victor Goyannes Dill Orrico e Renan Nunes Costa, que me guiaram na construção deste trabalho.

Por fim, agradeço a todos que direta e indiretamente contribuíram para formar a pessoa que sou hoje. Meu muito obrigado.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	12
2.1. Objetivos Específicos	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1. Agrotóxico	13
3.2. Espécies alvo do experimento.....	13
3.3. Coleta e manuseio das desovas	15
3.4. Procedimento experimental	16
3.4.1. Experimento agudo.....	16
3.4.2. Experimento crônico (<i>Physalaemus erikae</i>).....	16
3.4.2.1. Morfometria geométrica	17
3.4.2.2. Morfometria linear (<i>Physalaemus erikae</i>)	19
3.5. Análise de dados	19
4. RESULTADOS	20
4.1. Experimento agudo	20
4.1.1. <i>Physalaemus cicada</i>	20
4.1.2. <i>Physalaemus erikae</i>	22
4.2. Experimento crônico (<i>Physalaemus erikae</i>)	24
4.2.1. Desenvolvimento	24
4.2.2. Morfologia	24
5. DISCUSSÃO	26
5.1. Exposição aguda	26
5.2. Experimento crônico.....	35
6. CONCLUSÃO	38
7. REFERÊNCIAS	39

Lista de Figuras

- Figura 1: (A) Adulto de *Physalaemus cicada* (não-coletado); (B) Área de distribuição da espécie (em amarelo) com destaque para o ponto de coleta das desovas; (C) Forma larval de *Physalaemus cicada* no estágio 36 (Gosner, 1960), em vista lateral, dorsal e ventral..... 14
- Figura 2: (A) Adulto de *Physalaemus erikae* (não-coletado); (B) Área de distribuição da espécie (em amarelo) com ponto de coleta das desovas; (C) Forma larval de *Physalaemus erikae* no estágio 31 (Gosner, 1960), em vista lateral, dorsal e ventral..... 15
- Figura 3: Ilustrações e descrições da localização dos pontos de referência da morfologia do girino em vista dorsal. 18
- Figura 4: Ilustrações e descrições da localização dos pontos de referência da morfologia do girino em vista dorsal. 19
- Figura 5: Medidas lineares obtidas em vista lateral (1); CT (Comprimento total); CC (comprimento do corpo); CCA (comprimento da cauda); AMC (altura da musculatura caudal); AMC (Altura máxima da cauda); AND (altura da nadadeira dorsal); ANV (altura da nadadeira ventral), vista dorsal (2); DIO (distância interocular); LMC (largura da musculatura caudal); LC (largura do corpo), exemplificada em um girino de *Physalaemus erikae*. 20
- Figura 6: Gráfico representando a taxa de sobrevivência dos girinos de *Physalaemus cicada* em cada tratamento durante o experimento agudo. Os quadrados representam as médias em cada tratamento e as barras o intervalo de confiança $\pm 95\%$. As diferenças estatísticas em relação ao controle são marcadas com asterisco (*), com base no teste de Mann-Whitney. ... 22
- Figura 7: Gráfico representando a taxa de sobrevivência dos girinos de *Physalaemus erikae* em cada tratamento durante o experimento agudo. Os quadrados representam as médias em cada tratamento e as barras o intervalo de confiança $\pm 95\%$. As diferenças estatísticas do controle são marcadas com (*), com base no teste de Mann-Whitney..... 24
- Figura 8: LC50 para as espécies *P. cicada* e *P. erikae* em relação ao tempo de exposição. ... 26
- Figura 9: Resultados de DFA entre controle e tratamento. (A) Reconstruções gráficas do corpo dos girinos em vista dorsal (B) em vista lateral, derivadas das deformações obtidas com a DFA resultante da comparação entre controle e tratamento. (C) Gráfico de pontuação

discriminante da diferença de forma em vista dorsal, (D) Gráfico de pontuação discriminante da diferença de forma em vista lateral.....27

Figura 10: Média e intervalo de confiança de (A) Distância interocular, (B) largura do músculo da cauda, (C) Altura da nadadeira dorsal, dos girinos de *Physalaemus erikae* dos grupos controle e tratamento ao final do período experimental do teste de toxicidade subletal.28

Figura 11: Gráfico com valores de LC50-96 h do glifosato para espécies do gênero *Physalaemus*.29

Lista de Tabelas

Tabela 1: Sobrevivencia de girinos de <i>Physalaemus cicada</i> submetidos a concentrações aguda da formulação comercial de Glifosato (Roundup Original DI®).....	23
Tabela 2: Resposta a toxicidade aguda de girinos de <i>Physalaemus cicada</i> expostos à formulação comercial de glifosato (Roundup Original DI®).	23
Tabela 3: Sobrevivencia de girinos de <i>Physalaemus erikae</i> submetidos a concentrações aguda da formulação comercial de Glifosato (Roundup Original DI®).....	25
Tabela 4: Resposta a toxicidade aguda de girinos de <i>Physalaemus erikae</i> expostos à formulação comercial de glifosato (Roundup Original DI®).	25
Tabela 5: Dados de toxicidade de pesticidas para espécies do gênero <i>Physalaemus</i> (LC50-96 h, mg a.i./L). (*) LC50 -24 h.	31
Tabela 6: Diferenças metodológicas entre estudos com espécies congêneres que conduziram um teste de toxicidade de LC50. N = número; e.u. = unidade experimental; d.s. = fase de desenvolvimento.....	34

Resumo

O Brasil é um dos maiores consumidores de herbicidas do mundo, e os herbicidas à base de glifosato (e.g. Roundup®) são altamente utilizados em áreas de cultivo. Entre os vertebrados, os anfíbios são especialmente suscetíveis à contaminação devido à sua forte associação com ambientes de água doce. No entanto, o nosso conhecimento sobre como esses herbicidas afetam os anfíbios, ainda é escasso. Neste estudo, avaliamos experimentalmente os efeitos do herbicida à base de glifosato Roundup Original DI® em girinos de *Physalaemus cicada* e *P. erikae*. Desovas foram coletadas no sul e sudoeste da Bahia, transportadas para o laboratório e mantidas até os girinos atingirem o estágio de desenvolvimento 25. Os girinos foram aclimatados por 24h e posteriormente expostos a concentrações crescentes do herbicida em níveis agudos e crônicos para avaliarmos a taxa de sobrevivência, a concentração letal (LC50) e respostas morfológicas e ontogenéticas. A contaminação diminuiu significativamente a sobrevivência dos girinos de ambas as espécies, além de afetar no desenvolvimento dos girinos de *P. erikae*. A concentração letal estimada (LC50) após 96 h para *Physalaemus cicada* foi de 5,52 mg a.i./L, e *P. erikae* de 3,40 mg a.i./L. Também em concentrações crônicas foram observadas mudanças morfológicas nos girinos de *P. erikae*, sendo mudanças principalmente na cauda e na forma do corpo dos girinos. Sendo assim, o Roundup Original DI® é considerado moderadamente tóxico para ambas as espécies. *Physalaemus cicada* e *P. erikae* têm uma tolerância intermediária a esse pesticida quando comparados à todas as espécies já testadas. Nossos resultados ampliam os conhecimentos acerca da ação dos pesticidas, principalmente nas espécies do gênero *Physalaemus*, que é o gênero mais conhecido no Brasil quanto à toxicidade com glifosato.

Palavras-chave: Sobrevivência · LC50 · Experiência de exposição aguda · Glifosato · Experiência de exposição crônica · Comparação de espécies congênicas.

Abstract

Brazil is one of the largest consumers of herbicides in the world, and glyphosate-based herbicides (e.g. Roundup®) are commonly applied in cropland. Among vertebrates, amphibians are especially susceptible to contamination due to their strong association with freshwater environments. However, our knowledge of how these herbicides affect amphibians is still scarce. In this study we experimentally evaluated the effects of Roundup Original DI® glyphosate-based herbicide on tadpoles of *Physalaemus cicada* and *Physalaemus erikae*. Spawnings were collected in south and southern Bahia, transported to the laboratory and kept until the tadpoles reached the developmental stage 25. Tadpoles were acclimated for 24 h and subsequently exposed to increasing herbicide concentrations at acute and chronic levels to assess survival rate, lethal concentration (LC50) and morphological and ontogenetic responses. Contamination significantly decreased the survival of tadpoles of both species and affected the development of tadpoles of *P. erikae*. The estimated lethal concentration (LC50) after 96 h for *Physalaemus cicada* was 5.52 mg a.i./L, and *Physalaemus cf erikae*. 3.40 mg a.i./L. Also, at chronic concentrations, morphological changes were observed in the tadpoles of *P. erikae*, being changes mainly in the tadpole's tail and body shape. Therefore, Roundup Original DI® is considered moderately toxic to both species. *Physalaemus cicada* and *P. erikae* have an intermediate tolerance to this pesticide when compared to all species tested. Our results extend the knowledge about the action of pesticides mainly in the species of the genus *Physalaemus*, which is the best-known genus for glyphosate toxicity.

Keywords: Survival · LC50 · Acute Exposure Experience · Glyphosate · Chronic Exposure Experience · Congeneric Species Comparison

1. INTRODUÇÃO

Os biomas brasileiros têm sido substituídos por monoculturas extensivas para garantir a produção e exportação de *commodities*, como soja e cana-de-açúcar (Bombardi, 2017). Uma grande produção de produtos de alta qualidade sem os efeitos negativos das pragas agrícolas é necessária para manter este sistema econômico de exportação. Para este propósito, os agricultores aplicam toneladas de pesticidas produzidos por grandes empresas, contribuindo assim para a contaminação ambiental e problemas de saúde (Bombardi, 2017; Carneiro, 2015; Pedlowski et al. 2012; Wilson e Tisdell, 2001).

Desde 2008, o Brasil é o maior consumidor de pesticidas no mundo (Pignati et al. 2014). Além do crescimento da agricultura, as isenções fiscais e tributárias concedidas ao comércio destes produtos, e a outros fatores como, a importação de matéria-prima mais barata, foram responsáveis pela redução do seu preço, contribuindo com uma maior popularização dos pesticidas no país (Londres, 2011). Além disso, o Brasil também tem sido o principal destino de pesticidas banidos em muitos outros países (Bombardi, 2017; Londres, 2011).

O uso intensivo de pesticidas na agricultura vem sendo discutido pela sociedade em geral, seja por problemas de saúde pública ou pelos impactos ao meio ambiente decorrentes da contaminação das comunidades biológicas e ecossistemas. Um dos efeitos ambientais mais discutido e estudado é a possível ação destes pesticidas sobre espécies não-alvo, pois, vários dos pesticidas são não-seletivos (Davidson, 2004; Moreira, 2007; Peres et al. 2003; Rodrigues e Prado, 2004; Veiga et al. 2007). Herbicidas à base de glifosato (por exemplo, Roundup) são pesticidas não-seletivos altamente aplicados em lavouras brasileiras, com volume comercializado significativamente maior do que o de outros princípios ativos (IBAMA, 2018). Sua venda para o ano de 2018, por exemplo, (195.056.02 toneladas) foi duas vezes maior que o segundo princípio ativo mais vendido no país, sendo aplicado na maioria dos tipos de terras agrícolas (Bombardi, 2017; Carneiro, 2015; IBAMA, 2018).

A quantidade e a frequência de aplicação, adicionadas à alta proximidade entre corpos de água e terras agrícolas (Baker et al. 2013), podem levar à contaminação de ambientes de água doce (Armas et al. 2007; Bombardi, 2017; Gomes e Barizon, 2014). O glifosato já foi detectado em águas superficiais em concentrações de 144 µg/L; 700 µg/L; 1000 µg/L (Mattos et al. 2002; Rodrigues e Almeida, 2005), superando o limite estabelecido pela legislação brasileira (i.e. Resolução CONAMA 357/2005 que determina a quantidade máxima permitida

de 280µg/L de glifosato para águas superficiais de classe III). Águas de classe III representam corpos d'água destinadas ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional ou avançado, a irrigação de culturas arbóreas, cerealíferas e forrageiras, à pesca amadora, à recreação de contato secundário, e à dessedentação de animais.

Anfíbios estão fortemente associados a ambientes de água doce e especialmente suscetíveis à contaminação devido à sua pele permeável (Bishop et al. 1999). Portanto os anfíbios são bons bioindicadores, principalmente da qualidade da água, pois, além de ser encontrados em diversos tipos de corpos de água, possuem uma ampla distribuição geográfica (Boone e James, 2005; Haddad, 2011; Leite et al. 2010; Machado et al. 1999; Marcantonio et al. 2011). Muitas espécies colonizam lagoas temporárias e permanentes em paisagens agrícolas, com ovos aquáticos e girinos se desenvolvendo sob estresse por pesticidas (Bishop et al. 1999; Cothran et al. 2013; Lenhardt et al. 2015; Mann et al. 2009; Schiesari et al. 2007). A forma larval dos anuros é muito utilizada nos testes ecotoxicológicos, já que esta forma possibilita um estudo em condições laboratoriais, permitindo verificar possíveis efeitos dos pesticidas no ambiente natural (Costa e Nomura, 2016; Jones et al. 2010; Relyea, 2012, 2005, 2000a).

Estudos experimentais com girinos descobriram que as formulações de glifosato afetam negativamente diferentes espécies de anfíbios diminuindo sua sobrevivência, por meio de alterações no comportamento, anomalias e más-formações morfológicas (Buck et al. 2015; Costa e Nomura, 2016; Figueiredo e Rodrigues, 2014; Relyea, 2005; Relyea e Jones 2009; Salgado-Costa et al. 2018). Algumas espécies brasileiras foram testadas experimentalmente, mas existe uma lacuna significativa de estudos ecotoxicológicos quando comparada à elevada diversidade de anfíbios existentes, com apenas 0.58% das espécies estudadas (U.S.EPA, 2020). O número de espécies em que os efeitos subletais do glifosato foram avaliados nos anfíbios é bem menor comparado aos estudos de efeitos letais, com poucos estudos que verificaram os efeitos no desenvolvimento dos girinos (Cauble e Wagner 2005; Gahl et al. 2011; Howe et al. 2004; Lanctôt et al. 2013; Relyea 2009; Williams e Semlitsch 2010), e alguns que avaliaram seus efeitos na morfologia e comportamento dos girinos (Costa e Nomura 2016; Figueiredo e Rodrigues 2014; Relyea, 2012, 2009; Salgado-Costa et al. 2018). Também, poucas espécies congêneres foram testadas, reduzindo o potencial de comparação entre elas.

No Brasil, o gênero *Physalaemus* (Fitzinger 1826) é considerado o mais representativo com estudos sobre os efeitos letais das formulações de glifosato em girinos. Das 48 espécies do gênero, há estudos para *Physalaemus cuvieri* (Costa e Nomura, 2016), *Physalaemus centralis* (Figueiredo e Rodrigues, 2014) e *Physalaemus albonotatus* (Simioni et al. 2013). Novos estudos com espécies deste gênero, além de dar mais substância às comparações interespecíficas, como sugerido por alguns autores (e.g. Mann et al. 2009; Relyea e Jones 2009; Simioni et al. 2013), também possibilita o aumento do conhecimento sobre o glifosato e seus efeitos na biodiversidade e conseqüentemente a capacidade de utilizar os resultados como medidas mitigadoras, o que pode desta forma, favorecer outras espécies.

2. OBJETIVOS

Avaliar os efeitos letais e subletais da contaminação por uma formulação de glifosato (Roundup Original DI®) sobre girinos de *Physalaemus cicada* Bokermann 1966 e *Physalaemus erikae* Cruz e Pimenta 2004.

2.1. Objetivos Específicos

Avaliar a taxa de sobrevivência de girinos das duas espécies expostas a concentrações crescentes do contaminante;

- **Hipótese:** A contaminação por glifosato afeta a taxa de sobrevivência de girinos das espécies *P. erikae* e *P. cicada*.
- **Predição:** Esperamos que ocorra uma redução da taxa de sobrevivência dos girinos de *P. erikae* e *P. cicada* expostos a concentrações crescentes de glifosato.

Definir uma concentração letal para metade de uma população de girinos (LC50) de ambas as espécies;

- **Hipótese:** A LC50 das duas espécies está entre alta e moderadamente tóxico para ambas as espécies.
- **Predições:** Esperamos observar a LC50 para ambas as espécies entre 1 e 10 mg/L, sendo a formulação utilizada classificada como moderadamente tóxica para as espécies.

Avaliar quais os efeitos da exposição crônica ao contaminante sobre a metamorfose e a morfologia dos girinos da espécie *P. erikae*.

- **Hipótese:** A exposição a concentrações subletais de glifosato afeta a morfologia e o desenvolvimento ontogenético de girinos.
- **Predições:** Esperamos observar uma mudança na forma e uma redução no tamanho dos girinos expostos, assim como um retardamento no desenvolvimento ontogenético.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Agrotóxico

Para este estudo foi utilizado o Glifosato na formulação comercial Roundup Original DI®. Este produto é produzido pela Monsanto do Brasil Ltda, sendo do grupo químico glicina substituída, com formulação apresentando 44.5% de glifosato. Esta formulação possui classificação toxicológica II (Altamente Tóxico; ANVISA, 2019), e classificação do potencial de periculosidade Ambiental III (Produto perigoso ao meio ambiente). Este herbicida está registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA sob nº 00513.

3.2. Espécies alvo do experimento

A espécie *Physalaemus cicada* é caracterizada por possuir um corpo adulto mediano (fêmeas com ovos abdominais medindo entre 24 e 29 mm; machos com saco vocal discernível, 25 a 27 mm) pele do dorso e ventre lisos e ausência de glândula inguinal visível (Bokerman, 1966). Sua distribuição é conhecida para região nordeste do Brasil, estando presente nos estados da Bahia, Sergipe, Alagoas, Pernambuco, Paraíba e alguns registros no estado do Piauí (Fig. 1) (Frost, 2020; Santana e Junca, 2007). A espécie é classificada de acordo com a IUCN (2019) como pouco preocupante quanto ao risco de extinção (LC).

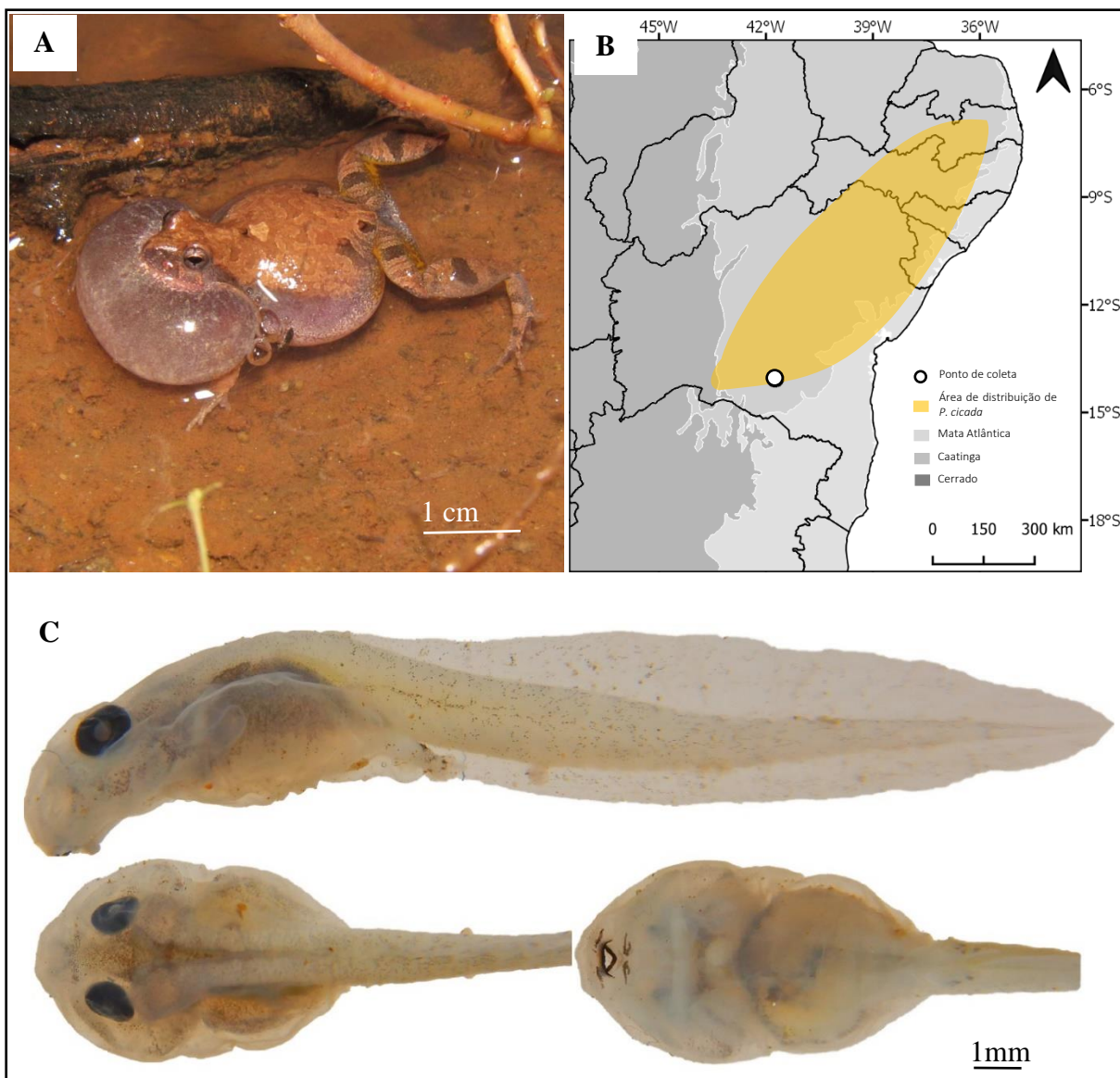


Figura 1: (A) Adulto de *Physalaemus cicada* (não-coletado); (B) Área de distribuição da espécie (em amarelo) com destaque para o ponto de coleta das desovas; (C) Forma larval de *Physalaemus cicada* no estágio 36 (Gosner, 1960), em vista lateral, dorsal e ventral.

A espécie *Physalaemus erikae* é uma espécie pertencente ao grupo *P. cuvieri*, caracterizado por um tamanho adulto médio em relação as outras espécies do grupo (fêmeas medindo entre 19,2 e 27,1 mm; machos entre 21,6 e 26,6 mm) e presença de glândulas inguinais (Cruz e Pimenta, 2004). Os seus habitats naturais são florestas tropicais ou subtropicais de baixa altitude. Seu período de atividade de acasalamento é de 3 a 7 meses (Dias et al. 2014). A espécie possui ocorrência conhecida para a região Sul do estado da Bahia, Brasil (Frost, 2020) (Fig. 2. B). A espécie é classificada de acordo com a IUCN (2019) como pouco preocupante quanto ao risco de extinção (LC).

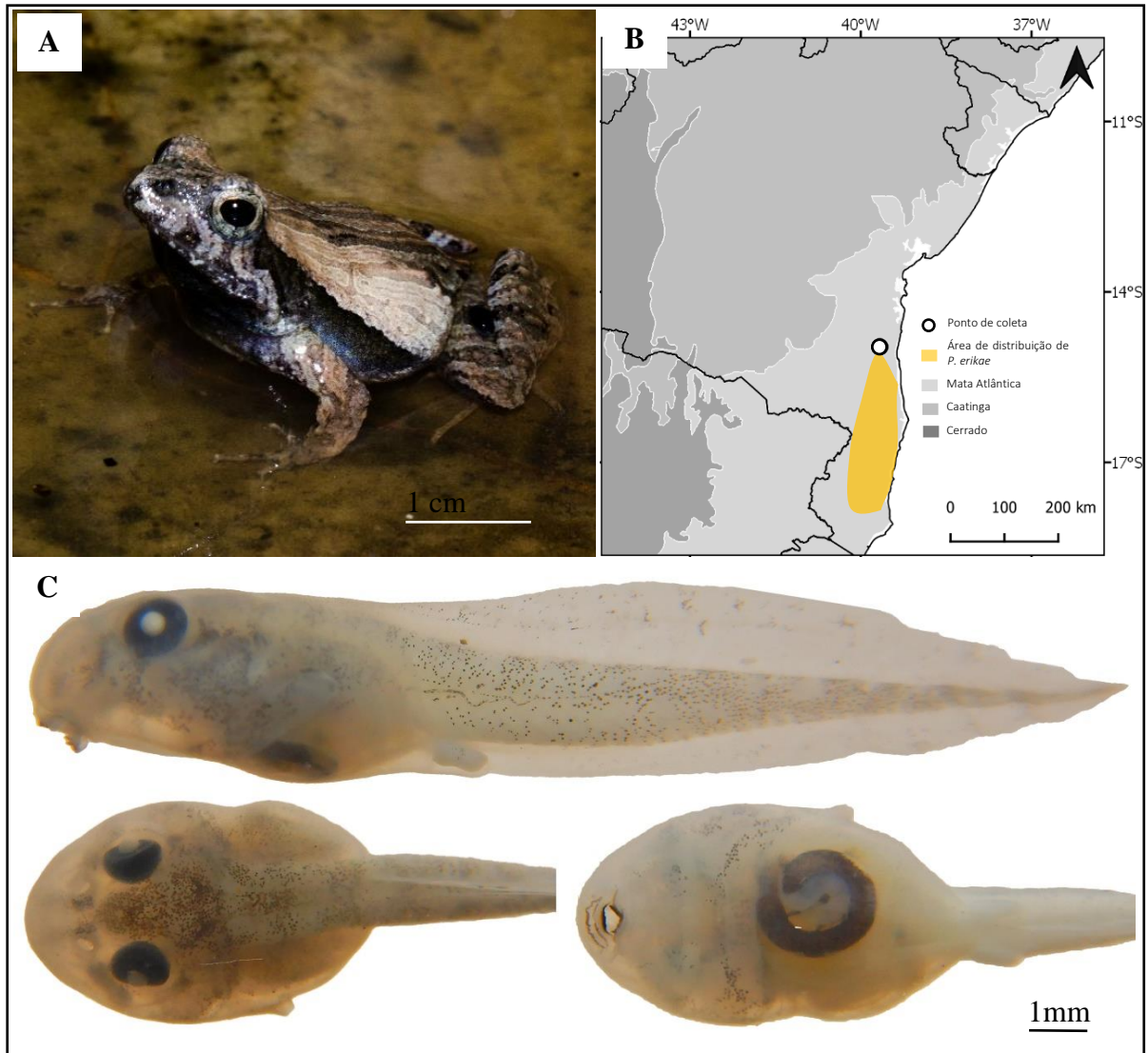


Figura 2: (A) Adulto de *Physalaemus erikae* (não-coletado); (B) Área de distribuição da espécie (em amarelo) com ponto de coleta das desovas; (C) Forma larval de *Physalaemus erikae* no estágio 31 (Gosner, 1960), em vista lateral, dorsal e ventral.

3.3. Coleta e manuseio das desovas

Coletamos quatro desovas de *Physalaemus cf. erikae* no município de Uruçuca (14°36'35.5"S; 39°21'24.3"W) e cinco desovas de *Physalaemus cicada* no município de Brumado (14°3'53.26 "S; 41°51'0.89" W), ambos no estado da Bahia, Brasil. Os ninhos de espuma contendo os ovos foram coletados manualmente com auxílio de peneiras, posteriormente acondicionadas em sacos plásticos com água da lagoa para transporte. Estas foram levadas ao laboratório de Zoologia de Vertebrados da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC, Ilhéus, Bahia, Brasil) onde foram acondicionadas em recipientes de vidro com

água desclorada, em temperatura de 25°C para que se desenvolvessem até o estágio 25 (Gosner, 1960).

3.4. Procedimento experimental

3.4.1. Experimento agudo

Foram realizados dois experimentos separadamente, um para *P. cicada* e outro para *P. erikae*. Os experimentos foram iniciados com os girinos no estágio 25 (Gosner, 1960) em ambas espécies. Foram aplicados cinco tratamentos com as seguintes concentrações crescentes de glifosato: Controle= 0 mg a.i./L; T1= 0,28 mg a.i./L; T2 = 1,5 mg a.i./L; T3 = 3 mg a.i./L; T4 = 6 mg a.i./L. O T1 foi definido com base na resolução CONAMA 357 dado que esta é a concentração máxima permitida por esta resolução. As outras concentrações foram baseadas em trabalhos recentes realizados com o glifosato (ver Costa e Nomura, 2016; Lajmanovich et al. 2013b; Relyea, 2012; Simioni et al. 2013).

No experimento de *P. cicada* foram distribuídos aleatoriamente 10 girinos por aquário. Cada tratamento teve um número de 7 réplicas, resultando em um total de 35 unidades experimentais e 350 girinos de *P. cicada* utilizados. Foram utilizados aquários de plástico (27 cm x 18 cm x 8 cm) com 1 litro de água desclorada, sem substrato e com oxigenação constante através de compressores de ar de aquário. Para o experimento de *P. erikae* foram utilizados 30 aquários de vidro (20 cm x 15 cm x 10 cm) com 1 litro de água desclorada. Foram distribuídos 10 girinos por aquário, com um número de 6 réplicas por tratamento e um total de 300 girinos *P. erikae* utilizados.

Para ambos os experimentos a posição das unidades experimentais e tratamentos foram aleatorizadas. Os girinos foram mantidos nos aquários por 24 h para aclimação antes de aplicar o herbicida. Os experimentos tiveram duração de 96 horas de exposição dos girinos ao herbicida, e nesse período não foi fornecida alimentação. A cada 24 h foi registrado o número de indivíduos mortos por aquário. Estes foram retirados e preservados em formalina a 10%, neste período também verificamos a temperatura e o pH da água.

3.4.2. Experimento crônico (*Physalaemus erikae*)

O experimento crônico foi realizado apenas para a espécie *P. erikae*. No experimento, as larvas foram submetidas a dois tratamentos: o controle com concentração de glifosato em 0 mg a.i./L e o tratamento (T) com 2 mg a.i./L; concentração definida a partir da LC50-96h (3,4 mg a.i./L) obtido no experimento agudo, visando garantir uma maior taxa de

sobrevivência e aumento no tempo de exposição, permitindo avaliar os efeitos do herbicida no desenvolvimento dos girinos.

Cada tratamento teve um número de 10 réplicas, totalizando 20 unidades experimentais e 120 girinos utilizados, sendo distribuídos aleatoriamente seis girinos por aquário. Os girinos foram mantidos por 24 h para aclimação, após este período o herbicida foi adicionado aos aquários do tratamento. A cada 24 h verificamos a presença de indivíduos mortos nas unidades experimentais, também conferimos a temperatura. Os girinos foram alimentados *ad libitum* com ração floculada para peixes ornamentais (Alcon Basic), os aquários possuíam oxigenação constante através de compressores de ar de aquário. O experimento teve uma duração total de 12 dias de exposição dos girinos ao herbicida. A água de todas as unidades experimentais foi renovada no intervalo entre cinco dias. Renovamos também a contaminação nas unidades experimentais do tratamento com o intuito de garantir um teor similar de contaminação no decorrer dos dias de exposição.

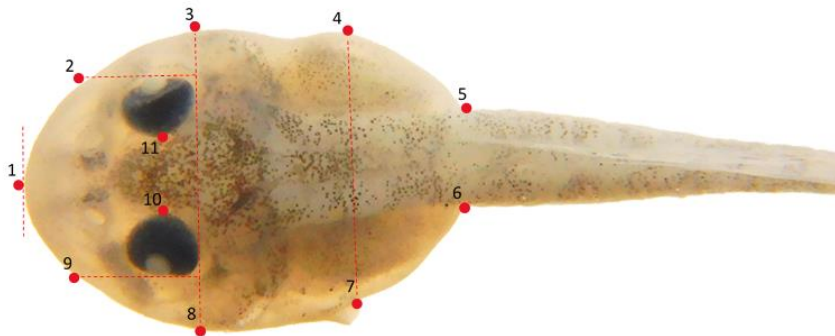
Ao final do experimento, os girinos sobreviventes foram sacrificados com imersão em solução de Hidroclorato de benzocaína (em solução de 1 mg/g). Após a morte, os exemplares foram fixados em formalina a 10%. Este método segue o protocolo determinado pela portaria nº 148/2012 do Conselho Federal de Biologia e os protocolos aprovados pela Resolução Normativa, nº.12. de 20/09/2013 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal.

Em seguida foram realizadas fotografias dos girinos para a análise morfológica. Para isso, utilizamos a câmera COOLPIX W300 da NIKON, apoiada com um tripé a uma distância de cinco centímetros dos girinos, posicionados em placa de Petri com gel de ultrassom e água. Utilizamos uma régua milimétrica como escala. O estágio de desenvolvimento também foi avaliado (Gosner, 1960), servindo de variável resposta juntamente com as análises morfológicas.

3.4.2.1. Morfometria geométrica (*Physalaemus erikae*)

Foram utilizados 100 girinos para serem examinados quanto à forma, sendo 50 do controle e 50 do tratamento. Os girinos variaram entre os estágios 25 e 37 (Gosner, 1960). Foram definidos 11 *landmarks* em vista dorsal (Fig.3) e 22 *landmarks* em vista lateral (modificado de Buskirk, 2009; Marques e Nomura, 2015) (Fig.4) para realizar análises. Cada *landmark* é representado por coordenadas x e y em um plano cartesiano, de modo que os *landmark* desse conjunto sejam as referências anatômicas que representam a forma do

organismo (Zelditch et al. 2012). Os *landmark* foram processados com a utilização do software TPS Dig2 2.31 (Rohlf, 2017).



Marcos	Descrição
1	Ponta do focinho
2	Na interseção entre a borda anterior do corpo com uma linha sagital que seja tocante à borda mais lateral do olho direito
3	Na interseção entre a borda lateral direita do corpo e uma linha transversal que seja tocante à borda posterior do olho direito
4	Na mesma linha transversal da borda posterior do espiráculo
5	Ponto na junção do músculo da cauda ao lado direito do corpo
6	Ponto na junção do músculo da cauda ao lado esquerdo do corpo
7	Borda do corpo na base do espiráculo
8	Na interseção entre a borda lateral esquerda do corpo e uma linha transversal que seja tocante à borda posterior do olho esquerdo
9	Na interseção entre a borda anterior do corpo com uma linha sagital que seja tocante à borda mais lateral do olho esquerdo
10	Paralelo ao lado interno do olho esquerdo
11	Paralelo ao lado interno do olho direito

Figura 3: Ilustrações e descrições da localização dos pontos de referência da morfologia do girino em vista dorsal.



Marcos	Referencia
1	Na interseção entre a borda anterior do corpo com uma linha sagital que seja tocante à borda mais basal do olho
2	Na interseção entre a borda anterior do corpo com uma linha sagital que seja tocante à borda mais superior do olho
3	Na interseção entre a borda dorsal do corpo com uma linha sagital que seja tocante à borda mais posterior do olho

4	Na mesma linha transversal da ponta posterior do espiráculo
5	Borda dorsal da barbatana caudal no ponto mais alto
6	Borda dorsal da cauda localizada no meio entre os pontos nº 5 e 7
7	Ponta da cauda
8	Borda ventral da barbatana caudal diretamente abaixo do nº 6
9	Borda ventral da barbatana caudal diretamente abaixo do nº 5
10	Borda ventral da nadadeira diretamente a baixo do nº 20
11	Borda ventral do corpo diretamente a baixo do ponto nº 4
12	Borda ventral do corpo diretamente a baixo do ponto nº 3
13	Ponto anterior do tubo oral quando visto de lado
14	Borda ventral do musculo da cauda na junção com o corpo
15	Borda ventral do músculo da cauda diretamente abaixo do ponto nº5
16	Borda ventral do músculo da cauda diretamente abaixo do nº 6
17	Borda dorsal do músculo da cauda diretamente abaixo do nº 6
18	Borda dorsal do músculo da cauda diretamente abaixo do ventral nº 5
19	Borda dorsal da musculatura da cauda diretamente a cima do ponto nº10
20	Interseção da notocorda e do corpo
21	Centro do olho
22	Ponto posterior do tubo oral quando visto de lado

Figura 4: Ilustrações e descrições da localização dos pontos de referência da morfologia do girino em vista dorsal.

3.4.2.2. Morfometria linear (*Physalaemus erikae*)

Foram realizadas as medidas dos traços morfológicos seguindo Relyea, (2005, 2000b) baseado em Altig (2007) (Fig. 5): CT (comprimento total); CC (comprimento do corpo); CCA (comprimento da cauda); DIO (distância interocular); LMC (largura da musculatura caudal); AMC (altura da musculatura caudal); LC (largura do corpo); AMC (altura máxima da cauda); AND (altura da nadadeira dorsal); ANV (altura da nadadeira ventral). As medidas foram feitas a partir de fotos, por meio do software ImageJ, de um total de 100 fotos, sendo 50 controles e 50 tratamentos.

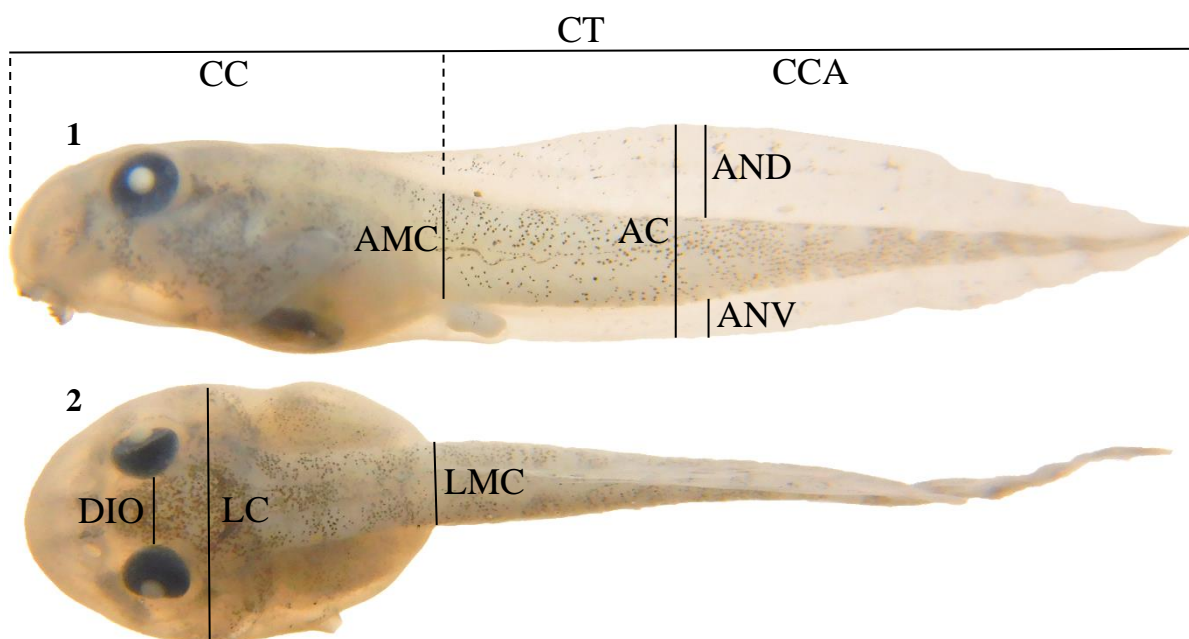


Figura 5: Medidas lineares obtidas em vista lateral (1); CT (Comprimento total); CC (comprimento do corpo); CCA (comprimento da cauda); AMC (altura da musculatura caudal); AC (Altura máxima da cauda); AND (altura da nadadeira dorsal); ANV (altura da nadadeira ventral), vista dorsal (2); DIO (distância interocular); LMC (largura da musculatura caudal); LC (largura do corpo), exemplificada em um girino de *Physalaemus erikae*.

3.5. Análise de dados

No experimento agudo utilizamos a taxa de sobrevivência ao final da exposição como a variável resposta, e realizamos o teste de Kruskal-Wallis para comparar a taxa de sobrevivência entre os diferentes tratamentos. A seguir, foi realizado um teste de Mann-Whitney com correção de Bonferroni para comparação a *post hoc*. Para calcular a LC50-96 h utilizamos análises de regressão Probit no software R com o pacote ecotox, nisso também calculamos as LC10 e LC90 em relação ao tempo de exposição (24, 48, 72, 96 h).

Para avaliar as alterações na forma, primeiro aplicamos o método de Superposição de Procrustes (Rohlf, 1990) para remover os efeitos de tamanho, posição ou rotação na variação de forma. Também geramos uma matriz de covariância para realizarmos as análises morfométricas. Em seguida realizamos uma Análise Função Discriminante (DFA) para gerar as variações de forma finais entre controle e tratamento. Realizamos também um teste de Permutação (10.000 aleatorizações) para avaliar uma significância estatística na diferença de

forma entre os tratamentos. Todas estas análises foram realizadas no software MorphoJ, versão 1.07a (Klingenberg, 2011).

Como as medidas morfológicas lineares são tipicamente maiores em animais de tamanho maior, estas, examinamos ajustadas pelo comprimento total, nisso, dividindo as medidas lineares pelo comprimento total dos indivíduos. Utilizamos os valores da divisão como estimativas das variáveis independentes do tamanho. Realizamos o teste de Shapiro Wilk para verificar a normalidade dos dados, e as variáveis morfológicas não apresentaram distribuição normal. Para essas variáveis foram realizados o teste de Wilcoxon, para verificar se a exposição ao herbicida influenciou significativamente o tamanho (crescimento) e o desenvolvimento dos girinos em cada tratamento. Além disso realizamos uma análise multivariada (teste T^2 de Hotelling) para comparar o tratamento com o controle.

Também aplicamos o teste de Kruskal-Wallis para avaliar as diferenças de temperatura e pH da água entre controle e tratamento. No experimento agudo com *P. cicada* a temperatura da água não foi significativamente diferente entre os tratamentos ($H(4) = 2,991$, $p = 0,559$ - $T_{\text{mean}} = 21,794 \text{ } ^\circ\text{C} \pm 0,389$, intervalo = 21 - 22 $^\circ\text{C}$). Observamos uma diferença no pH da água entre os tratamentos ($H(4) = 18,005$, $p = 0,001$). Diferenças quando comparadas ao controle foram encontradas no tratamento T3 ($p < 0,001$) e T4 ($p = 0,004$). Com *P. erikae* a temperatura da água não diferiu entre os tratamentos ($H(4) = 2,420$, $p = 0,658$ - $T_{\text{mean}} = 23,05 \text{ } ^\circ\text{C} \pm 0,224$, intervalo = 22,7 - 23,5 $^\circ\text{C}$). No entanto também foi observado uma diferença no pH da água entre os tratamentos do experimento ($H(4) = 20,510$, $p < 0,001$). Quando comparadas ao controle, somente o T4 foi significativamente diferente ($H(1) = 6,533$, $p = 0,010$), não sendo encontrada diferenças significativas entre T1, T2 e T3. Apesar das análises terem mostrado diferenças significativas no pH da água entre os tratamentos, sugerimos que o pH não foi o fator decisivo para redução da sobrevivência nos tratamentos. Nos experimentos a variação do pH entre controle e tratamentos (ou seja, entre 4,57 e 4,88 respectivamente com *Physalaemus cicada* e 6,03 e 5,84 para *Physalaemus erikae*) foi muito pequena para podermos considerar que este foi o fator responsável pela redução da sobrevivência. Outros trabalhos já demonstram que variações no pH igual ou menor que 0,5 não tem efeito significativo na mortalidade de larvas de muitas espécies de anfíbios, além de só exibirem mortalidade a partir de um pH menor que 4,5 (Barth e Wilson, 2010; Farquharson e Smit, 2016; Pierce, 1985). Além disso, em locais de reprodução de anfíbios já foram observados valores de pH entre 4,8 e 8,5 (Hatch e Blaustein, 2000; Thompson et al. 2004).

No experimento crônico realizado com *P erikae* as características da água, temperatura ($H(1) = 0,073$, $p = 0.78$ - mean = $24.2^{\circ}C \pm 0,4$, variação = $23,4 - 24,9^{\circ}C$) e pH ($H(1) = 3,735$, $p = 0.053$ - mean = $5,7$, variação = $5 - 6,3$), não apresentaram diferenças significativas entre Controle e Tratamento.

4. RESULTADOS

4.1. Experimento agudo

4.1.1. *Physalaemus cicada*

A contaminação pelo Roundup Original DI® diminuiu a sobrevivência dos girinos de *Physalaemus cicada* ($H(4) = 17,501$, $p = 0,001$ —Fig. 6). Quando comparado ao controle, a menor sobrevida foi observada em T4 (50% dos sobreviventes - $p = 0,004$), T3 (52,8% dos sobreviventes - $p = 0,009$), T1 (61,4% dos sobreviventes - $p = 0,042$) e T2 (75,7% - não significativos) respectivamente (Tabela 1).

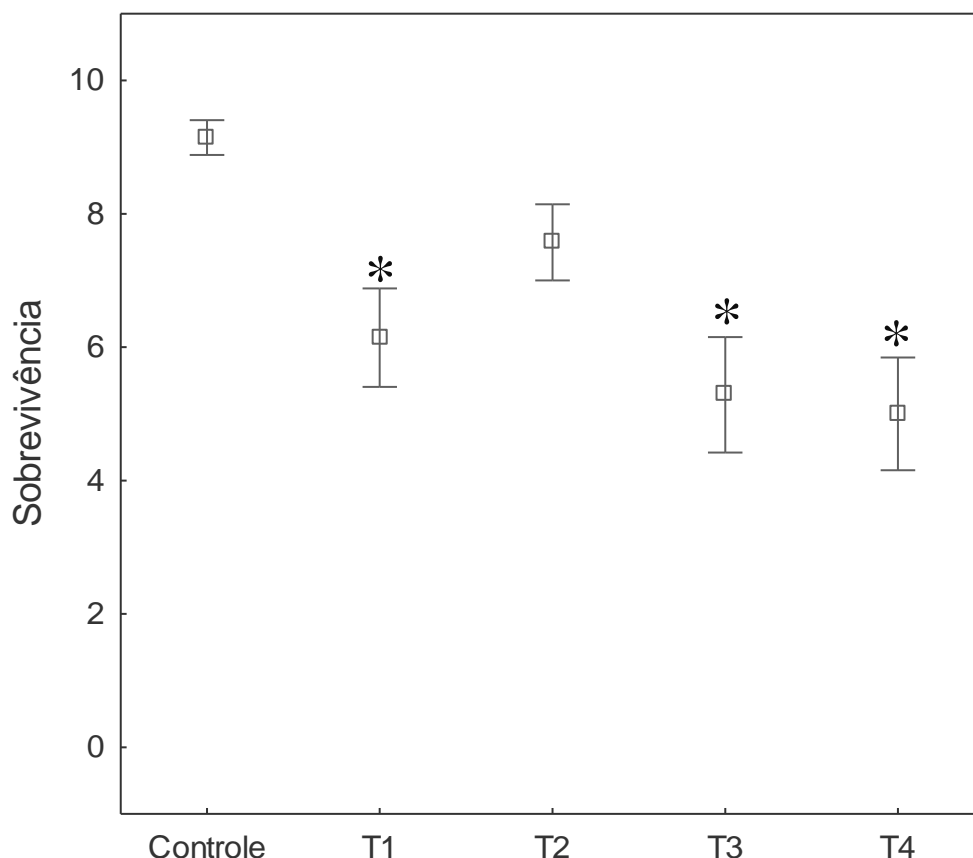


Figura 6: Gráfico representando a taxa de sobrevivência dos girinos de *Physalaemus cicada* em cada tratamento ao final do experimento agudo. Os quadrados representam as médias em

cada tratamento e as barras o intervalo de confiança $\pm 95\%$. As diferenças estatísticas em relação ao controle são marcadas com asterisco (*), com base no teste de Mann-Whitney.

Sobrevivência dos girinos					
Concentrações (mg a.i./L)	Sobrevivência				Sobre. (%)
	24 h	48 h	72 h	96 h	
0	69	69	69	64	91,43
0,28	66	60	51	43	61,43
1,5	68	6	57	53	75,71
3	66	56	41	38	52,86
6	44	43	40	35	50,00

Tabela 1: Sobrevivência de girinos de *Physalaemus cicada* submetidos a concentrações aguda da formulação comercial de Glifosato (Roundup Original DI®).

Os valores de LC10, 50 e 90 estimados pela análise de Probit em relação aos dados coletados a cada 24 horas de exposição estão detalhados na tabela 2. O valor de LC50-96 h apresentado para a espécie *Physalaemus cicada* foi de 5,52 mg a.i./L, sendo assim, o glifosato é classificado como moderadamente tóxico para a espécie de acordo com Giesy et al. (2000) e U.S.EPA (2008).

Concentração letal de glifosato (LC)			
Tempo (h)	LC10 mg a.i./L	LC50 mg a.i./L	LC90 mg a.i./L
24	1,65	26,25	419,00
48	0,37	39,40	4184,90
72	0,06	12,19	2466,93
96	0,02	5,52	1334,04

Tabela 2: Resposta a toxicidade aguda de girinos de *Physalaemus cicada* expostos à formulação comercial de glifosato (Roundup Original DI®).

4.1.2. *Physalaemus erikae*

Ao final do experimento o grupo controle e o T1 tiveram 100% de sobrevivência dos girinos. A exposição as outras concentrações de Roundup Original DI® diminuiu a

sobrevivência dos girinos de *Physalaemus erikae* ($H(4) = 21,23$, $p < 0,001$ - Fig. 7). Comparando ao controle, a menor sobrevivência ao final do experimento foi observada em T4 (7% de sobrevivência, $p = 0,003$), T3 (70% de sobreviventes, $p = 0,054$) e T2 (93% de sobrevivência, $p = 0,336$) (Tabela 3).

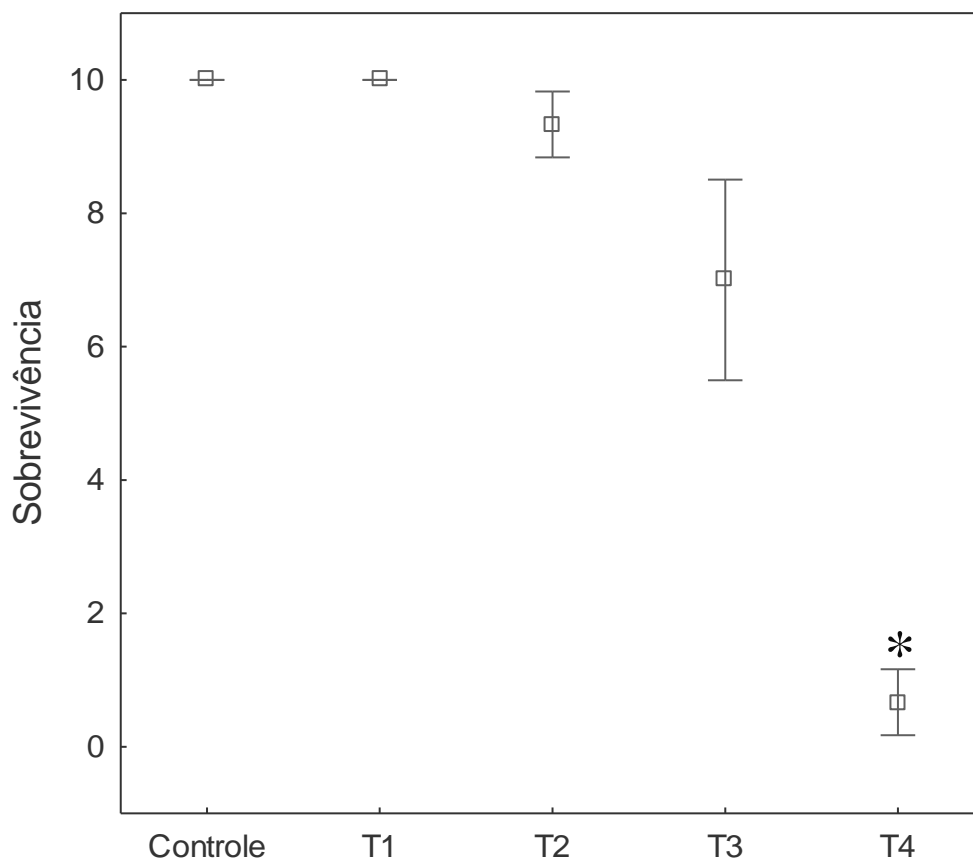


Figura 7: Gráfico representando a taxa de sobrevivência dos girinos de *Physalaemus erikae* em cada tratamento ao final do experimento agudo. Os quadrados representam as médias de cada tratamento e as barras o intervalo de confiança $\pm 95\%$. As diferenças estatísticas do controle são marcadas com (*), com base no teste de Mann-Whitney.

Sobrevivência dos girinos					
Concentrações (mg a.i./L)	Sobrevivência				Sobre. (%)
	24 h	48 h	72 h	96 h	
0	60	60	60	60	100
0,28	60	60	60	60	100
1,5	60	57	56	56	93
3	46	451	45	42	70
6	6	4	4	4	7

Tabela 3: Sobrevivência de girinos de *Physalaemus erikae* submetidos a concentrações aguda da formulação comercial de Glifosato (Roundup Original DI®).

Os valores de LC10, 50 e 90 de glifosato estimados para cada 24 horas de exposição estão detalhados na tabela 4. O valor de LC50-96 h apresentado para a espécie *Physalaemus erikae* foi de 3,40 mg a.i./L, sendo o glifosato classificado como moderadamente tóxico para a espécie (Giesy et al. 2000; U.S.EPA, 2008).

Concentração letal de glifosato (LC)

Tempo (h)	LC10 mg a.i./L	LC50 mg a.i./L	LC90 mg a.i./L
24	2,51	3,87	5,96
48	2,08	3,56	6,08
72	1,98	3,51	6,21
96	1,91	3,40	6,07

Tabela 4: Resposta a toxicidade aguda de girinos de *Physalaemus erikae* expostos à formulação comercial de glifosato (Roundup Original DI®).

A LC50 com relação ao tempo de exposição ao glifosato de *P. cicada* apresentou grande variação (5,52 – 26,25 mg a.i./L), enquanto para *P. erikae* houve pouca variação (3,40 – 3,87 mg a.i./L) (Fig.8).

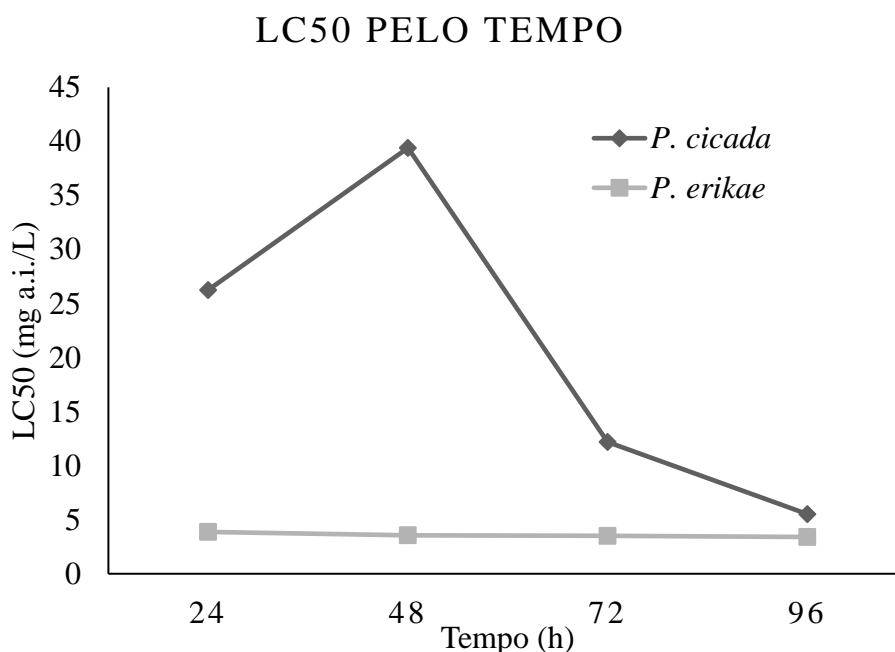


Figura 8: LC50 do glifosato para as espécies *P. cicada* e *P. erikae* em relação ao tempo de exposição.

4.2. Experimento crônico (*Physlaemus erikae*)

4.2.1. Desenvolvimento

Durante o experimento crônico morreu um total de 5 girinos, sendo quatro no controle e um no tratamento. Ao comparar o estágio de desenvolvimento (Gosner 1960) dos girinos sobreviventes no controle e tratamento, não foi encontrado diferenças significativas ($W = 1337$, $p = 0,672$), com médias do estágio de desenvolvimento seguindo Gosner, (1960) em: controle $29,6 \pm 3,95$ e tratamento $29,4 \pm 3,97$. Além disso, os girinos do controle e do T, também apresentaram uma distribuição semelhante para o número de girinos em cada estágio de desenvolvimento.

4.2.2. Morfologia

4.2.2.1. Morfometria geométrica

Na DFA entre tratamento e controle foi observada diferença significativa em plano dorsal (Procrustes distance: 0,0225, $p = <0,01$) e plano lateral (Procrustes distance: 0,014, $p = 0,029$). As diferenças de forma estão relacionadas aos marcos anatômicos da posição do centro do olho e o ponto do final da cauda em vista lateral. Em vista dorsal as diferenças estão nos marcos em paralelo com o espiráculo e no ponto de posição dos olhos (Fig. 9).

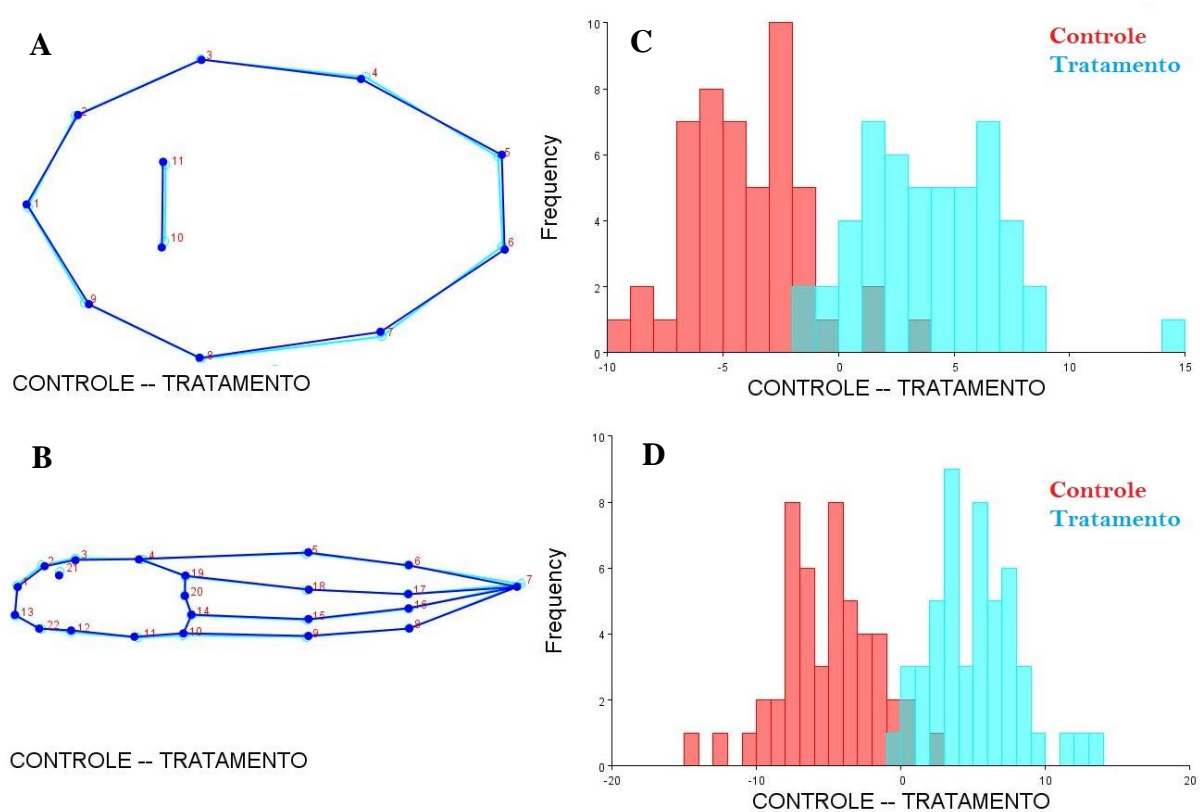


Figura 9: Resultados de DFA entre controle e tratamento. (A) Reconstruções gráficas do corpo dos girinos em vista dorsal (B) em vista lateral, derivadas das deformações obtidas com a DFA resultante da comparação entre controle e tratamento. (C) Gráfico de pontuação discriminante da diferença de forma em vista dorsal, (D) Gráfico de pontuação discriminante da diferença de forma em vista lateral.

4.2.2.2. Morfometria linear

Observamos que houve diferença nos traços morfológicos lineares mensurados em *P. erikae*, entre o controle e tratamento ($T^2=5,441$, $p < 0,001$). Quando avaliamos as variáveis morfológicas: AND ($W = 937$, $p = 0,031$), LMC ($W = 931$, $p = 0,028$) e DIO ($W = 382$, $p < 0,001$) apresentaram diferenças entre o controle e o tratamento (Fig. 10). As demais variáveis não apresentaram diferenças significativas: CT ($W = 1250$, $p = 1$), CC ($W = 1136$, $p = 0,435$); CCA ($W = 1318$, $p = 0,639$); AC ($W = 981$, $p = 0,064$); ANV ($W = 995$, $p = 0,079$); AMC ($W = 1255$, $p = 0,972$), LC ($W = 1369$, $p = 0,411$).

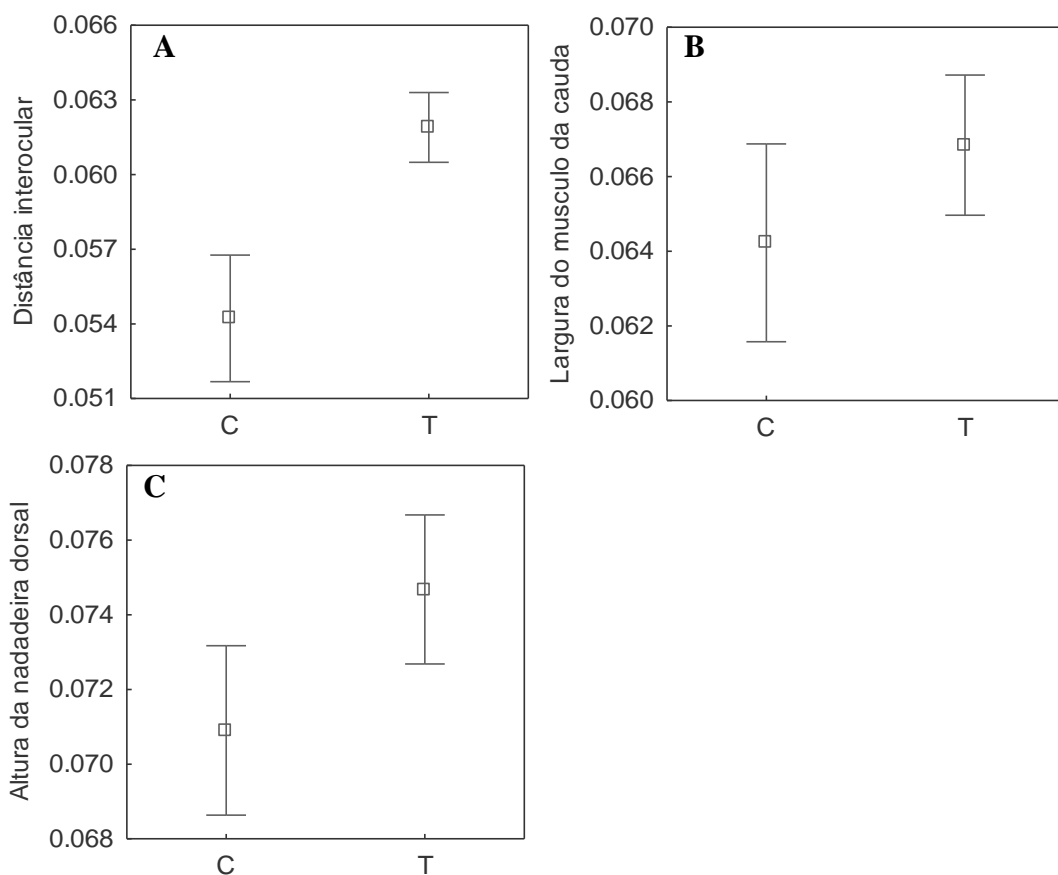


Figura 10: Média e intervalo de confiança de (A) Distância interocular, (B) largura do músculo da cauda, (C) Altura da nadadeira dorsal, dos girinos de *Physalaemus erikae* dos grupos controle e tratamento ao final do período experimental do teste de toxicidade crônica.

5. DISCUSSÃO

5.1. Exposição aguda

A contaminação aguda pelo Roundup Original DI® diminuiu o número de girinos sobreviventes de *Physalaemus cicada* e *Physalaemus erikae*. A diferença absoluta nos valores de toxicidade aguda para o glifosato entre as duas espécies foi de 38%, sendo *P. cicada* (LC50-96 h = 5,52 mg a.i./L) mais resistente que *P. erikae* (LC50-96 h = 3,4 mg a.i./L).

A LC50 com relação ao tempo de exposição ao glifosato de *P. cicada* apresentou grande variação enquanto para *P. erikae* houve pouca variação. Também *P. cicada* apresentou uma maior variação entre os valores de LC10, LC50 e LC90, enquanto em *P. erikae* esta variação foi bem menor. Isso pode ser explicado pela alta mortalidade dos girinos de *P. erikae* que ocorreu logo nas primeiras 24 horas de experimento, diferente de *P. cicada* cuja mortalidade dos girinos foi distribuída entre os 4 dias de exposição. Essa diferença de sensibilidade entre as duas espécies pode estar relacionada a distribuição geográfica. A

espécie *P. erikae* possui ocorrência na Mata Atlântica e sofre com condições ambientais com menor variação quando comparado à *P. cicada* que possui distribuição por áreas caracterizadas pelo bioma Caatinga, podendo assim estar exposta a uma maior variação sazonal e um histórico de condições extremas. Dessa forma *P. cicada* pode apresentar uma maior adaptação as diferentes alterações do ambiente.

A diminuição da sobrevivência de girinos expostos a herbicidas à base de glifosato também foi observada para as espécies congêneres *P. cuvieri* (Costa e Nomura, 2016), *P. centralis* (Figueiredo e Rodrigues, 2014) e *P. albonotatus* (Simioni et al. 2013). A LC50 estimada após 96 h de *Physalaemus cicada* é similar a *P. albonotatus* (Simioni et al. 2013), aproximadamente o dobro do valor encontrado para *P. cuvieri* (Costa e Nomura, 2016) e quatro vezes menos que *P. centralis* (Figueiredo e Rodrigues, 2014). A LC50-96 h de *Physalaemus erikae* foi o segundo menor encontrado para o gênero, ficando acima apenas de *P. cuvieri* (Costa e Nomura, 2016) e quase seis vezes menor que *P. centralis* (Figueiredo e Rodrigues, 2014) e 36% menor que *P. albonotatus* (Simioni et al. 2013) (Fig. 11).

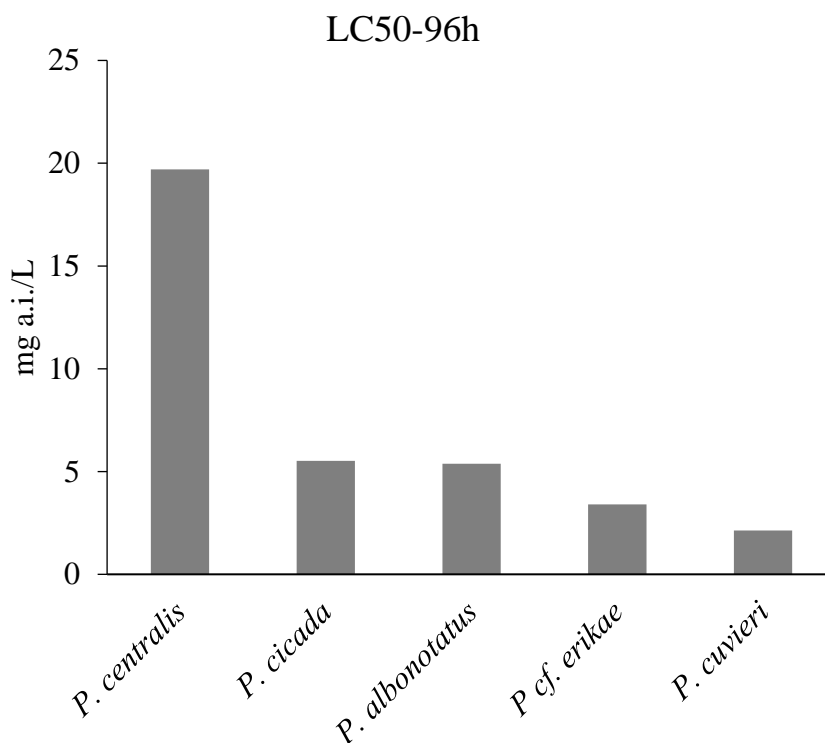


Figura 11: Gráfico com valores de LC50-96 h do glifosato para espécies do gênero *Physalaemus*.

Comparando estes resultados com os obtidos para outras espécies e outros ingredientes ativos, observamos que o Glifosato é o terceiro princípio ativo mais tóxico para as espécies do

gênero *Physalaemus*. Estudos mostram que o Cypermethrin é o ingrediente ativo mais tóxico para espécies do gênero *Physalaemus*, com valores de LC50-96 h variando de 0,12 a 5,01 mg a.i./L para as espécies *P. biligonigerus*, *P. cuvieri*, *P. gracilia* (Izaguirre et al. 2000; Macagnan et al. 2017; Wrubleswski et al. 2018). O segundo mais tóxico é o ingrediente ativo Tebuconazole com o valor encontrado de LC50-96 h para *P. cuvieri* de 0,98 mg a.i./L (Wrubleswski et al. 2018). Enquanto para o Glifosato os valores de LC50-96 h variaram de 2,13 a 19,7 mg a.i./L (Tabela 5). Estes resultados mostram uma grande variação na toxicidade entre as espécies de um mesmo gênero. Esta variação se torna ainda maior devido às diferentes formulações de pesticidas.

LC50 para espécies do gênero *Physalaemus*

Espécies	Formulação	LC50-96 h (mg a.i./L)	Referência
	Glifosato		
<i>P. albonotatus</i>	Gliz 480 SL	5,38	(Simioni et al. 2013)
<i>P. centralis</i>	Glyphosate 480 Agripec®	19,7	(Figueiredo e Rodrigues, 2014)
<i>P. cicada</i>	Roundup Original DI®	5,27	Este estudo
<i>P. cuvieri</i>	Roundup Original®	2,13	(Costa e Nomura, 2016)
<i>P. cuvieri</i>	Glifosato puro	115	(Dann et al. 2019)
<i>P. erikae</i>	Roundup Original DI®	3,40	Este estudo
	Cypermethrin		
<i>P. biligonigerus</i>	Cypermethrin Sherpa 25%	0,129	(Izaguirre et al. 2000)
<i>P. cuvieri</i>	Cypermethrin 250 EC	0,24	(Wrubleswski et al. 2018)
<i>P. gracilia</i>	Cypermethrin 250 EC	5,01	(Macagnan et al. 2017)
	Tebuconazole		
<i>P. cuvieri</i>	Fungicida 200 EC	0,98	(Wrubleswski et al. 2018)
	Atrazine		
<i>P. cuvieri</i>	Atrazine 500 SC	19,69	(Wrubleswski et al. 2018)
	Trifloxistrobina		
<i>P. santafecinus*</i>	50 WG	0,14	(Junges et al. 2012)
	Deltamethrin		
<i>P. gracilis</i>	Decis 25 EC	3,04	(Macagnan et al. 2017)
	2.4-D		
<i>P. centralis</i>	U 46 D-FLUID 2.4-D	515,75	(Figueiredo e Rodrigues, 2014)

	Picloram		
<i>P. centralis</i>	Padron	0,51	(Figueiredo e Rodrigues, 2014)

Tabela 5: Dados de toxicidade de pesticidas para espécies do gênero *Physalaemus* (LC50-96 h, mg a.i./L). (*) LC50 -24 h.

Quando comparados os valores de LC50-96 h do Roundup Original DI® obtidos no presente trabalho para *P. cicada* e *P. erikae* ao LC50-96 h de *P. cuvieri* ao Glifosato puro (115 mg/L) (Daam et al. 2019), observa-se uma grande diferença quanto à toxicidade. No trabalho realizado por Daam et al. (2019), *P. cuvieri* apresentou uma LC50-96 h para o Glifosato puro, sendo 21 vezes maior do que foi encontrado para *P. cicada*, e quase 39 vezes maior do que foi encontrado para *P. erikae* no presente trabalho. Também ao comparar o valor de LC50-96 h de Roundup Original® apresentado por Costa e Nomura, (2016) (2,13 mg a.i./L), para *P. cuvieri*, ao encontrado por Daam et al. (2019), o último é quase 54 vezes maior (115 mg/L). Esta diferença pode ser em boa parte explicada pelas diferenças metodológicas dos trabalhos (Tabela 6). Alguns pesticidas em formulação comercial apresentam uma toxicidade muito maior do que o próprio ingrediente ativo do produto, devido à estas formulações apresentarem surfactantes que podem ter maior toxicidade que o ingrediente ativo (Giesy et al. 2000; Howe et al. 2004; Lajmanovich et al. 2013; Mann e Bidwell, 1999; Perkins et al. 2000; Williams e Semlitsch, 2010), o que mostra a necessidade de mais estudos com diferentes formulações.

Existem vários estudos ecotóxicológicos com girinos, mas o poder das comparações entre espécies parece ser incerto e limitado. Podemos enumerar duas causas principais: (i) poucos estudos com espécies proximamente relacionadas e (ii) diferenças em protocolos e condições metodológicas. Maiores diferenças nas condições experimentais (por exemplo, diferenças nas formulações comerciais, tempo de exposição, número de repetições, condições experimentais, estágio / idade dos organismos e outras) (Tabela 6) adicionadas à maior distância filogenética entre as espécies, dificultam a comparação e a identificação de quais clados ou quais espécies são mais sensíveis (Mann et al. 2009; Relyea e Jones 2009; Simioni et al. 2013). Porém, mesmo estudos entre espécies congêneres estão sujeitas à variáveis que dificultam as comparações. Um bom exemplo acontece com estudos utilizando espécies do gênero *Physalaemus*. Costa e Nomura (2016), Figueiredo e Rodrigues (2014), Simioni et al. (2013), e o presente estudo são metodologicamente semelhantes. Entretanto, há diferenças na formulação de glifosato. O presente estudo usa Roundup Original DI® com 44.5% de

ingrediente ativo, Costa e Nomura (2016) testaram o Roundup Original® com 48%, Figueiredo e Rodrigues (2014) testaram o Glifosato 480 Agripec® com 48%, e Simioni et al. (2013) testaram Gliz® 480 SL com 48%. Essas formulações comerciais têm diferentes tipos de “ingredientes inertes”, com diferentes concentrações de substâncias tensoativas (por exemplo, seboína polietoxilada - POEA, ácido aminometilfosfônico - AMPA), que podem aumentar ou não a toxicidade do glifosato (Giesy et al. 2000; Mann et al. 2009).

Outro fator complicador é o nível de estresse do ambiente onde as desovas foram coletadas. Algumas populações podem ser mais tolerantes a pesticidas do que outras porque vivem dentro e/ou mais perto de áreas agrícolas que sofrem uma aplicação periódica de pesticidas (Cothran et al. 2013; Hua et al. 2015. 2014; Lenhardt et al. 2015). Este é o caso do *P. centralis*, a espécie de *Physalaemus* que apresentou maior tolerância ao glifosato. Esta tolerância pode ser explicada pela área de coleta das desovas utilizadas no experimento, uma vez que Figueiredo e Rodrigues, (2014) utilizaram desovas coletadas à distâncias de 10 a 50 metros de plantações. Outro complicador é o baixo número de indivíduos utilizados nos experimentos que pode não ser representativo. Por exemplo: os experimentos com *P. centralis* e *P. albonotatus* (Figueiredo e Rodrigues, 2014; Simioni et al. 2013), utilizaram apenas 20 indivíduos no total, diferente dos trabalhos mais recentes que utilizaram de 200 a 500 indivíduos (Costa e Nomura, 2016; Daam et al. 2019; David e Kartheek, 2015; Rimayi et al. 2018;) em experimentos para determinar a LC50.

No entanto, apesar das diferenças metodológicas, Bridges e Semlitsch, (2001) e Simioni et al. (2013) sugerem que a discrepância entre os valores de LC50 pode representar a tolerância específica da espécie. Assim, podemos construir uma escala de tolerância ao herbicida à base de glifosato para as diferentes espécies de *Physalaemus* testadas, na qual *P. centralis* é mais tolerante (apesar de seu estudo ter um viés metodológico, ao coletar as desovas próximo a áreas que ocorre aplicação de herbicidas a base de glifosato), seguida por *P. albonotatus*, *P. cicada*, *P. erikae*, e *P. cuvieri*.

Dados metodológicos

	<i>P. albonotatus</i>	<i>P. centralis</i>	<i>P. cicada</i>	<i>P. cuvieri</i>	<i>P. cuvieri</i>	<i>P. erikae</i>
Formulação comercial	Gliz 480 SL	Glifosato 480 Agripec ®	Roundup Original DI®	Roundup Original®	Glifosato	Roundup Original DI®
Glifosato na fórmula	48%	48%	44.5%	48%	99.2%	44.5%
Ingredientes inertes	Não descrito	Não descrito	Não descrito	Não descrito	Não descrito	Não descrito
Tratamentos	0 - 0.8 - 1.6 - 3.2 - 6.4 (mg L ⁻¹)	0 - 8 - 16 - 32 - 64 - 128 (mg / l)	0 - 0.28 - 1.5 - 3 - 6 (mg a.i./ l)	0 - 0.38 - 2 - 4 - 6 (mg a.i./ l)	0-84; 97; 112; 130 - 150 (mg/L)	0 - 0.28 - 1.5 - 3 - 6 (mg a.i./L)
N. de repetições por tratamento	4	4	7	9	4	6
N. de girinos por aquários	5	5	10	10	10	10
N. de girinos testados	20	20	350	450	240	300
N. de massas de ovos coletados	Três desovas de diferentes locais, separados por pelo menos 1 km	Seis desovas de diferentes locais, separados por pelo menos 1 km	Cinco desovas na mesma lagoa	Quatro desovas de duas lagoas diferentes, separadas por pelo menos 1 km	Quatro desovas	Quatro desovas na mesma lagoa
D.s. de girinos (Gosner 1960)	Não descrito	25	25	25	25	25
Descrição do local de coleta	Não descrito	Lagoas temporárias localizadas a 10-50 metros de distância de uma plantação de soja, onde o glifosato tem sido usado por pelo	Uma lagoa semi-permanente, cercado por um fragmento relativamente bem conservado da vegetação da Caatinga, sem	Dois lagos similares com um alto porcentagem de vegetação de Cerrado em suas margens. Baixo perturbação antrópica na	A coleta ocorreu em uma lagoa dentro de uma bacia hidrográfica não poluída e protegida.	Uma lagoa, de área aberta, com vegetação herbácea e algumas árvores de cacau na margem.

		menos uma década.	contato com terras cultiváveis	paisagem circundante.		
Aclimação de girinos em e.u. antes da exposição	Não descrito	Não descrito	24 horas	24 horas	Não descrito	24 hours
Local do experimento	Não descrito	Laboratório	Laboratorial	Laboratorial	Laboratorial	Laboratorial
Condição laboratorial durante experimentos	A temperatura média foi de 31.2°C	Temperatura entre 28 ° C e 32 ° C	Temperatura média 25°C ± 1°C. Fotoperíodo controlado (12 h claro / 12 h escuro).	Temperatura média 28° ± 2° C. Fotoperíodo controlado (12 h claro / 12 h escuro).	Temperatura média de 25 ± 2 ° C com (12 h claro / 12 h escuro).	Temperatura média 25° ± 1° C. Fotoperíodo controlado (12 h claro / 12 h escuro).
Condições das unidades experimentais	Aquários de plástico com 1 L de água mineral (pH médio = 4.92)	Recipientes circulares transparentes (material não descrito) com 1 L de água da chuva (pH ajustado para 7)	Aquários de plástico com 1 litro de água desclorada, sem substrato e com oxigenação constante	Aquários de vidro com 2 L de água desclorada, sem substratos e com oxigenação constante (pH entre 7 e 7.2)	Aquários de plástico com 1 litro.	Aquários de vidro com 1 L de água desclorada, sem substratos e com oxigenação constante.
Tempo de exposição	96 horas	96 horas	96 horas	96 horas	97 hours	96 hours
Referência	Simioni et al. (2013)	Figueiredo e Rodrigues (2014)	Este estudo	Costa e Nomura (2016)	Daam et al. (2019)	Este estudo

Tabela 6: Diferenças metodológicas entre estudos com espécies congêneres que conduziram um teste de toxicidade de LC50. N = número; e.u. = unidade experimental; d.s. = fase de desenvolvimento.

A distribuição geográfica das espécies de *Physalaemus* incluídas nesta comparação contempla a maior parte do Brasil e representa diferentes domínios morfoclimáticos altamente suprimidos por terras agrícolas onde os pesticidas são utilizados. *Physalaemus cicada* é encontrada na maior parte do Nordeste Brasileiros; *P. erikae* é encontrada na região sul do estado da Bahia; *P. centralis* e *P. albonotatus* são encontrados no Sudeste e Centro-Oeste, enquanto *P. cuvieri* possui ocorrência em praticamente todas as regiões do país (Frost, 2020). Este grupo de espécies amplamente distribuído pode ser usado como uma ferramenta bioindicadora (Niemelä, 2000; Noss, 1990). Um aumento no conhecimento sobre grupos específicos amplamente distribuídos, como o gênero *Physalaemus*, pode ajudar a desenvolver estratégias de mitigação para reduzir os impactos de herbicidas à base de glifosato.

5.2. Experimento crônico

As concentrações subletais utilizadas em nosso estudo foram destinadas a provocar efeitos no desenvolvimento dos girinos sendo que durante todo o experimento apenas um girino morreu no tratamento, nisso o glifosato não foi agudamente tóxico neste experimento. A exposição crônica dos girinos de *Physalaemus erikae* ao glifosato não teve um efeito no desenvolvimento destes, no entanto, alterações morfológicas foram observadas nos girinos expostos ao glifosato quando comparado com os girinos do controle.

Alguns estudos avaliaram o efeito do glifosato no desenvolvimento de anfíbios (Cauble e Wagner, 2005; Gahl et al. 2011; Howe et al. 2004; Lanctôt et al. 2013; Relyea, 2009; Williams e Semlitsch, 2010;), nestes foram observados que a exposição crônica ao glifosato pode tanto prolongar o período larval, como também acelerar a metamorfose. Já outros observaram a ausência de efeitos do glifosato na metamorfose dos girinos de algumas espécies (Gahl et al. 2011; Lanctôt et al. 2013; Relyea, 2009). Todos estes trabalhos tiveram duração entre 30 e 60 dias dado que estes estudos realizaram experimentos até a metamorfose dos girinos, diferente do nosso que teve uma duração de 12 dias de exposição ao herbicida. No presente estudo, além de avaliar o efeito no desenvolvimento, também avaliamos o efeito na morfologia dos girinos. Portanto, quando os primeiros girinos começaram atingir o estágio 39 finalizamos o experimento já que a partir do estágio 40 o comprimento total do girino começa a diminuir pela reabsorção da cauda (Gosner, 1960). No entanto, os 12 dias foram suficientes para a exposição ao herbicida ter efeitos no desenvolvimento.

Apesar de não haver diferença no desenvolvimento dos girinos do controle para o tratamento verificamos os efeitos da contaminação por Roundup Original DI® na morfologia

destes girinos de *P. erikae*. Nossos resultados mostraram que a morfologia dos girinos de *P. erikae* é afetada significativamente por concentrações subletais de glifosato em formulação comercial. Este provocou alterações na forma do corpo dos girinos além de mudanças em traços morfológicas, como: Altura da nadadeira dorsal, largura do músculo da cauda e distância interocular. Estas mudanças na morfologia dos girinos de *P. erikae* provocado pela exposição ao glifosato podem ter diversas implicações na vida destes animais, tanto na fase larval como na fase adulta.

Uma das mudanças mais visíveis na forma do corpo dos girinos foi na largura do corpo na posição do espiráculo em vista dorsal. Os girinos do controle apresentaram os pontos de referências desta posição mais afastados, e isso pode ser interpretado como um corpo mais largo quando comparado aos girinos do T. Este tipo de mudança altera a hidrodinâmica dos girinos, podendo afetar no seu deslocamento na coluna d'água (Arendt, 2010). Registramos também nos girinos expostos ao glifosato um aumento na altura da nadadeira dorsal, juntamente com um aumento na largura da musculatura da cauda, ao contrário das nossas expectativas. Também foi verificado uma mudança na forma da cauda dos girinos, onde é possível se observar um deslocamento na ponta da cauda entre os girinos do controle e tratamento. Como já foi sugerido por alguns autores, mudanças nessas características influenciam principalmente na velocidade e na manobrabilidade durante a natação dos girinos (Arendt, 2010; Hoff e Wassersug, 2000; Kupferberg et al. 2011; Van Buskirk e McCollum, 2000) impactando em sua sobrevivência.

Dentro do gênero *Physalaemus*, Figueiredo e Rodrigues, (2014) e Costa e Nomura, (2016) avaliaram efeitos subletais do glifosato no desenvolvimento de girinos. Figueiredo e Rodrigues, (2014), observaram que concentrações subletais de glifosato em girinos de *Physalaemus centralis* aumentam o tamanho do corpo dos metamorfos enquanto o Picloram, a depender da concentração, pode causar aumento ou diminuição do corpo. Já, Costa e Nomura, (2016) observaram que os girinos de *P. cuvieri* expostos ao glifosato apresentam uma maior Assimetria Flutuante (AF) na distância narina-focinho e na largura dos olhos. Isso mostra que efeitos subletais de pesticidas em anfíbios podem variar bastante.

As mudanças na morfologia dos girinos expostos ao Glifosato podem implicar no sucesso ou no fracasso desses animais em diversas atividades, como: conseguir alimento e fugir de predadores. Os efeitos destas mudanças morfológicas ainda são incertos. O que sabemos, é que a exposição à pesticidas pode afetar os girinos de várias formas, podendo provocar anomalias e más-formações (Harris et al. 2000; Allran e Karasov, 2001; Devi e

Gupta, 2013), além de aumentar ou diminuir o tamanho dos girinos e de estruturas importantes para o fitness destes animais. Por exemplo, Relyea, (2004) verificou que vários pesticidas (Carbaryl/Sevin®, Diazinon, Malathion, Glyphosate/Roundup®) individualmente e a mistura deles, provocam uma diminuição no crescimento dos girinos de *Lithobates pipiens*, *L. clamitans*, *L. catesbeianus*, *Anaxyrus americanus* e *Dryophytes versicolor*. Já outro trabalho mostra que concentrações maiores de Carbaryl causa um maior crescimento dos girinos de *Lithobates catesbeianus* (Relyea, 2006). Todas estas alterações morfológicas demonstram a necessidade de mais estudos com esse enfoque, especialmente quando levamos em consideração que o glifosato pode persistir no ambiente entre 76 a 240 dias (Torretta, 2018; Vereecken, 2005), de modo que os anfíbios ficam expostos a estes pesticidas por um período ainda mais prolongado.

6. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstram que o herbicida Roundup Original DI®, à base de glifosato, tem um grande impacto na vida dos anfíbios. A taxa de mortalidade dos girinos de *Physalaemus cicada* e *Physalaemus erikae* demonstradas nesse estudo, coloca o glifosato como sendo considerado moderadamente tóxico (Giesy et al. 2000; U.S.EPA 2008) para essas espécies.

Comparando com espécies congêneres, *P. cicada* tem uma tolerância intermediária a pesticidas, e *P. erikae* está entre as menos tolerantes. A comparação entre estas espécies congêneres é robusta porque as condições experimentais entre as espécies eram muito semelhantes e podem representar um primeiro passo para o desenvolvimento de medidas de mitigação no futuro. No entanto, as comparações em relação a outros estudos devem ser feitas com cautela, principalmente quando os protocolos experimentais apresentam grandes diferenças metodológicas.

Nossos resultados mostraram também que as larvas de *Physalaemus erikae* expostas a concentrações subletais de Glifosato na formulação de Roundup Original DI®, desenvolvem diferenças na sua morfologia, em comparação com as larvas sem exposição ao herbicida. Essas diferenças podem ter várias influências na sobrevivência destes animais, já que pode interferir na aptidão para se alimentar, reproduzir ou fuga de predador.

Concluimos que, apesar do gênero *Physalaemus* ser um dos grupos mais estudados a respeito de efeitos toxicológico de pesticidas, ainda há uma grande lacuna para termos uma real compreensão de como estas espécies estão sendo afetadas. Também há uma necessidade de estruturação metodológica de como avaliar os efeitos de pesticidas em anfíbios.

Aprovação ética

As desovas foram coletadas sob a licença permanente 13708-1 concedida a M Solé e 64159-1 concedida a Mario Barbosa da Silva Junior pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). Este estudo foi realizado sob os Protocolos nº 012/15 e nº 026/18 emitidos pela Comissão de Ética em Uso de Animais (Universidade Estadual de Santa Cruz, Brasil).

7. REFERÊNCIAS

- Allran, J.W., Karasov, W.H. 2001. Effects of Atrazine on embryos, larvae, and adults of Anuran Amphibians. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20:769–775.
- Armas, E.D., Teresa, R., Monteiro, R., Antunes, P.M., Alice, M., Firme, P. 2007. Diagnóstico espaçotemporal da ocorrência de herbicidas nas águas superficiais e sedimentos do Rio Corumbataí e principais afluentes 30:1119–1127.
- Altig, R., 2007. A primer for the morphology of anuran tadpoles. *Herpetol. Conserv. Biol.* 2, 71–74. <https://doi.org/10.1126/science.277.5333.1793>
- Arendt, J. 2010. Correlatos morfológicos da velocidade de natação em cinco espécies de girinos de sapo Spadefoot: comparações de métodos morfométricos. *J. Morphol.* 271: 1044 - 1052.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2019. <http://portal.anvisa.gov.br/rss/-/asset_publisher/Zk4q6UQCj9Pn/content/id/5578706> Acessado em 15 agosto de 2019.
- Bokermann, W.C.A. 1966. Notas sobre três espécies de *Physalaemus* de Maracas, Bahia (Amphibia, Leptodactylidae). *Revista Brasileira de Biologia*, 26. 253–259.
- Bridges, C.M., Semlitsch, R.D. 2001. Genetic variation in insecticide tolerance in a population of Southern Leopard Frogs (*Rana sphenoccephala*): implication for amphibian conservation. *Copeia* 1:7–13.
- Blaustein, A.R., Kiesecker, J.M. 2002. Complexity in conservation: lessons from the global decline of amphibian populations. *Ecol Lett* 5:597–608.
- Boone, M.D., James, S.M., 2005. Use of aquatic and terrestrial mesocosms in ecotoxicology. *Appl. Herpetol.* 2, 231–257. <https://doi.org/10.1163/1570754054507442>
- Boone, M.D., Cownan, D., Davidson, C., Hayes, T.B., Hopkins, W.A., Relyea, R.A., Schiesari, L., Semlitsch, R. 2007. Evaluating the role of environmental contamination in amphibian population decline. In: Gascon C, Collins JP, Moore RD, Church DR, McKay JE, Mendelson III JR (ed) Amphibian conservation action plan. Proceedings: IUCN/SSC Amphibian Conservation Summit 2005. The World Conservation Union

- (IUCN), Gland, Switzerland, pp 32–35.
- Barth, B.J., Wilson, R.S. 2010. Life in acid: interactive effects of pH and natural organic acids on growth, development and locomotor performance of larval striped marsh frogs (*Limnodynastes peronii*):1293–1300.
- Buck, J.C., Scheessele, E.A., Relyea, R.A., Blaustein, A.R. 2012. The effects of multiple stressors on wetland communities: pesticides, pathogens and competing amphibians:61–73.
- Baker, N.J., Bancroft, B.A., Garcia, T.S., 2013. Science of the Total Environment A meta-analysis of the effects of pesticides and fertilizers on survival and growth of amphibians. *Sci. Total Environ.* 449, 150–156. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.01.056>
- Buck, J.C., Hua, J., Brogan, W.R., Dang, T.D., Urbina, J., Bendis, R.J., Stoler, A.B., Blaustein, A.R., Reylea, R.A. 2015. Effects of Pesticide Mixtures on Host- Pathogen Dynamics of the Amphibian Chytrid Fungus. *PLoS One* 10, 1–17. <https://doi.org/10.5061/dryad.45595>
- Bombardi, L.M., 2017. Atlas: Geografia do Uso de Agrotóxicos no Brasil e Conexões com a União Européia. FFLCH - USP 1, 296.
- Babini, M.S., Bionda, C de L, Salinas, Z.A., Salas, N.E., Martino, A.L. 2018. Ecotoxicology and Environmental Safety Reproductive endpoints of *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae): Populations that persist in agroecosystems and their use for the environmental health assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 154:294–301. Elsevier Inc. Available from <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.02.050>.
- Clements, W.H. 2000. Integrating effects of contaminants across levels of biological organization: an overview. *J Aquat Ecosyst Stress Recovery* 7:113–116.
- Cruz, C.A.G., Pimenta, B.V.S., 2004. New Species of *Physalaemus* Fitzinger, 1826 from Southern Bahia, Brazil (Anura, Leptodactylidae). *J. Herpetol.* 38, 480–486. <https://doi.org/10.1670/214-02a>
- Cauble, K., Wagner, R.S., 2005. Sublethal effects of the herbicide glyphosate on amphibian metamorphosis and development. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 75, 429–435. <https://doi.org/10.1007/s00128-005-0771-3>

- CONAMA 357. 2005. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 357. de 17 de março de 2005. Publicada no DOU nº 053. de 18/03/2005. pp 58–63.
- Cothran, R.D., Brown, J.M., Relyea, R.A. 2013. Proximity to agriculture is correlated with pesticide tolerance: evidence for the evolution of amphibian resistance to modern pesticides. *Evol Appl* 6: 832–841.
- Carneiro, F.F., Augusto, L.G.S., Rigotto, R.M., Friedrich, K., Búrigo, A.C. 2015. Dossiê ABRASCO: Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos. Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio, Rio de Janeiro, Expressão Popular, São Paulo, pp 624.
- Carneiro, F.F., 2015. Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde.
- Costa, R.N., Nomura, F., 2016. Measuring the impacts of Roundup Original® on fluctuating asymmetry and mortality in a Neotropical tadpole. *Hydrobiologia* 765, 85–96. <https://doi.org/10.1007/s10750-015-2404-0>
- Davidson, C., 2004. Declining downwind: Amphibian population declines in California and historical pesticide use. *Ecol. Appl.* 14, 1892–1902. <https://doi.org/10.1890/03-5224>
- Delgado-acevedo, J., Restrepo, C. 2008. The Contribution of Habitat Loss to Changes in Body Size, Allometry, and Bilateral Asymmetry in Two Eleutherodactylus Frogs from Puerto Rico 22:773–782.
- Duarte-Guterman, P., Trudeau, V.L., Ryan, M.J., Hogan, N.S. 2012. Developmental Profiles and Thyroid Hormone Regulation of Brain Transcripts in Frogs: A Species Comparison with Emphasis on *Physalaemus pustulosus* 2012:98–112.
- Devi, N.N., Gupta, A. 2013. Toxicity of endosulfan to tadpoles of *Fejervarya* spp. (Anura: Dicroglossidae): mortality and morphological deformities. *Ecotoxicology* 22:1395–1402.
- Daam, M.A., Moutinho, M.F., Espíndola, E.L.G., Schiesari, L., 2019. Lethal toxicity of the herbicides acetochlor, ametryn, glyphosate and metribuzin to tropical frog larvae. *Ecotoxicology*. <https://doi.org/10.1007/s10646-019-02067-5>
- Figueiredo, J., Rodrigues, D.D.J., 2014. Effects of four types of pesticides on survival, time and size to metamorphosis of two species of tadpoles (*Rhinella marina* and *Physalaemus centralis*) from the southern Amazon, Brazil. *Herpetol. J.* 24, 1–9

- Farquharson, C., Wepener, V., Smit, N.J., 2016. Acute and chronic effects of acidic pH on four subtropical frog species 42:52–62.
- Frost, Darrel R. 2020. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0 (Date of access). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA. Acessado em 17 de janeiro de 2020.
- Gosner, K.L., 1960. A Simplified Table for Staging Anuran Embryos Larvae with Notes on Identification. *Herpetodologists' Leag.* 16, 183–190. <https://doi.org/10.2307/3890061>
- Giesy, J.P., Dobson, S., Solomon, K.R., 2000. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. Springer New York, New York, NY. <https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1156-3>
- Glennemeier, K. A, e R. J. Denver. 2002. Small changes in whole-body corticosterone content affect larval *Rana pipiens* fitness components. *General and Comparative Endocrinology* 127:16–25.
- Gahl, M.K., Pauli, B.D., Houlahan, E., 2014. Effects of chytrid fungus and a glyphosate-based herbicide on survival and growth of wood frogs (*Lithobates sylvaticus*) Author (s): Megan K. Gahl, Bruce D. Pauli and Jeff E. Houlahan Stable URL: <http://www.jstor.org/stable/41416676>. *Ecol. Appl.* 21, 2521–2529.
- Gomes, M.A.F., Barizon, R.R.M. 2014. Panorama da Contaminação Ambiental por Agrotóxicos e Nitrato de origem Agrícola no Brasil: cenário 1992/2011. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, São Paulo pp 35.
- Hatch, A.C., Blaustein, A.R., 2000. Combined Effects of UV-B, Nitrate, and Low pH Reduce the Survival and Activity Level of Larval Cascades Frogs (*Rana cascadae*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 39, 494–499. <https://doi.org/10.1007/s002440010132>
- Hoff, K.V., Wassersug, R.J. 2000. Tadpole Locomotion: Axial Movement and Tail Functions in a Largely Vertebraeless Vertebrate. *Amer.Zool* 76:62–76.
- Harris, M.L., Chora, L., Bishop, C.A., Bogart, J.P. 2000. Species- and Age-Related Differences in Susceptibility to Pesticide Exposure for Two Amphibians, *Rana pipiens*, and *Bufo americanus*:263–270.
- Howe, C.M., Berrill, M., Pauli, B.D., Helbing, C.C., Werry, K., Veldhoen, N., 2004. Toxicity

- of glyphosate-based pesticides to four North American frog species. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 1928–1938. <https://doi.org/10.1897/03-71>
- Hayes, T.B., Case, P., Chui, S., Chung, D., Haefele, C., Haston, K., Lee, M., Mai, V.P., Marjua, Y., Parker, J., Tsui, M., 2006. Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: Are we underestimating the impact? *Environ. Health Perspect.* 114, 40–50. <https://doi.org/10.1289/ehp.8051>
- Hayes, T.B., Falso, P., Gallipeau, S., Stice, M. 2010. The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's perspective. *J Exp Bio* 213: 921–933.
- Haddad, C.F.B., 2011. ANFÍBIOS Uma Análise da Lista Brasileira de Anfíbios Ameaçados de Extinção. *Icambio* 2, 287–288. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Hua, J., Jones, D.K., Relyea, R.A., 2014. Induced Tolerance from a Sublethal Insecticide Leads to Cross-Tolerance to Other Insecticides.
- Hua, J., Jones, D.K., Mattes, B.M., Cothran, R.D., Relyea, R.A., Hoverman, J.T., 2015. The contribution of phenotypic plasticity to the evolution of insecticide tolerance in amphibian populations. <https://doi.org/10.1111/eva.12267>
- Izaguirre, M.F., Lajmanovich, R.C., Peltzer, P.M., Soler, A.P., Casco, V.H., 2000. Cypermethrin-induced apoptosis in the telencephalon of *Physalaemus biligonigerus* tadpoles (Anura: Leptodactylidae). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 65, 501–507. <https://doi.org/10.1007/s001280000152>
- IBAMA—Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. 2019. Relatórios de Comercialização de Agrotóxicos—Boletim Anual de Produção, Importação, Exportação e Vendas de Agrotóxicos no Brasil, Boletim 2013. <https://ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#boletinsanuais>
- IUCN. 2019. Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN. Versão 2019-2. <http://www.iucnredlist.org>. Acessado em 18 de julho de 2019.
- Josh Van, B., 2009. Natural variation in morphology of larval amphibians: phenotypic plasticity in nature? *Ecol. Monogr.* 79, 681–705. <https://doi.org/10.1890/08-1692.1>
- Jones, D.K., Hammond, J.I., Relyea, R.A., 2010. Roundup® and amphibians: The importance

- of concentration, application time, and stratification. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 2016–2025. <https://doi.org/10.1002/etc.240>
- Junges, C.M., Peltzer, P.M., Lajmanovich, R.C., Attademo, A.M., Cabagna Zenklusen, M.C., Basso, A., 2012. Toxicity of the fungicide trifloxystrobin on tadpoles and its effect on fish-tadpole interaction. *Chemosphere* 87, 1348–1354. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.02.026>
- Krain, L.P., Denver, R.J. 2004. Developmental expression and hormonal regulation of glucocorticoid and thyroid hormone receptors during metamorphosis in *Xenopus laevis*. *Journal of Endocrinology* 181:91–104.
- Kupferberg, SJ, Lind, AJ, Thill, V e Yarnell, SM. 2011. Tolerância à velocidade da água em girinos do sapo de patas amarelas do sopé (*Rana boylii*): desempenho, crescimento e sobrevivência da natação. *Copeia.*, 2011: 141 - 152.
- Lajmanovich, R.C., Sandoval, M.T., Peltzer, P.M. 2003. Induction of Mortality and Malformation in *Scinax nasicus* Tadpoles Exposed to Glyphosate Formulations 5470:612–618.
- Leite, P.Z., Margarido, T.C.S., de Lima, D., Rossa-Feres, D. de C., de Almeida, E.A., 2010. Esterase inhibition in tadpoles of *Scinax fuscovarius* (Anura, Hylidae) as a biomarker for exposure to organophosphate pesticides. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 17, 1411–1421. <https://doi.org/10.1007/s11356-010-0326-y>
- Londres, F., 2011. AGROTÓXICOS NO BRASIL um guia para ação em defesa da vida, Vasa. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Lajmanovich, R.C., Junges, C.M., Attademo, A.M., Peltzer, P.M., 2013. Individual and Mixture Toxicity of Commercial Formulations Containing Glyphosate, Metsulfuron-Methyl , Bispyribac-Sodium , and Picloram on *Rhinella arenarum* Tadpoles. <https://doi.org/10.1007/s11270-012-1404-1>
- Lanctôt, C., Robertson, C., Navarro-Martín, L., Edge, C., Melvin, S.D., Houlihan, J., Trudeau, V.L. 2013. Effects of the glyphosate-based herbicide Roundup WeatherMax® on metamorphosis of wood frogs (*Lithobates sylvaticus*) in natural wetlands. *Aquatic Toxicology* 140–141:48–57. Elsevier B.V. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.05.012>.

- Lenhardt, P.P., Brühl, C.A., Berger, G. 2015. Temporal coincidence of amphibian migration and pesticide applications on arable fields in spring. *Basic Appl Ecol* 16:54–63.
- Lourenço, L.B., Targueta, C.P., Baldo, D., Nascimento, J., Garcia, P.C.A., Andrade, G.V., Haddad, C.F.B., Recco-Pimentel, S.M., 2015. Phylogeny of frogs from the genus *Physalaemus* (Anura, Leptodactylidae) inferred from mitochondrial and nuclear gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 92:204–216.
- Mann, R.M., Bidwell, J.R., 1999. The Toxicity of Glyphosate and Several Glyphosate Formulations to Four Species of Southwestern Aus.pdf 199, 193–199.
- Machado, R.A., Bernarde, P.S., Morato, S.A.A., Anjos, L. Dos, 1999. Análise comparada da riqueza de anuros entre duas áreas com diferentes estados de conservação no município de Londrina, Paraná, Brasil (Amphibia, Anura). *Rev. Bras. Zool.* 16, 997–1004. <https://doi.org/10.1590/S0101-81751999000400009>
- Mattos, M.L., Peralba, T., Dias, M.C.R., Prata, S.L.P.F., Camargo, L. 2002. Monitoramento ambiental do glyphosate e do seu metabólito (ácido aminometilfosfônico) na água de lavoura de arroz irrigado. *Pesticidas: Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, p. 145-154.
- Moreira, F.P.J.C., 2007. Saúde e ambiente em sua relação com o consumo de agrotóxicos em um pólo agrícola do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Saúde, Ambient. e Agrotóxicos* 612–621. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2007001600021>
- Mann, M.R., Hyne, R.V., Choung, C.B., Wilson, S.P. 2009. Amphibians and agricultural chemicals: Review of the risks in a complex environment. *Environ Pollut* 157:2903–2927
- Marcantonio, A.S., Ranzani-Paiva, M.J.T., França, F.M., Dias, D.C., Teixeira, P.C., Ferreira, C.M., 2011. Toxicidade do sulfato de zinco para girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*): Toxicidade aguda, crônica e parâmetros hematológicos. *Bol. do Inst. Pesca* 37, 143–154.
- Matías-Ferrer. N., Escalante P. 2015. Size, body condition, and limb asymmetry in two hylid frogs at different habitat disturbance levels in Veracruz, México 25:169–176.

- Marques, N.S., Nomura, F., 2015. Where to Live? How Morphology and Evolutionary History Predict Microhabitat Choice by Tropical Tadpoles. *Biotropica* 47, 227–235. <https://doi.org/10.1111/btp.12199>
- Macagnan, N., Rutkoski, C.F., Kolcenti, C., Vanzetto, G. V., Macagnan, L.P., Sturza, P.F., Hartmann, P.A., Hartmann, M.T., 2017. Toxicity of cypermethrin and deltamethrin insecticides on embryos and larvae of *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 20699–20704. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9727-5>.
- MAPA, Ministério da Agricultura, pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/informacoes-tecnicas>. Acessado em 02 de setembro de 2019.
- Noss, R.F., 1990. Indicators for monitoring biodiversity: a hierarchical approach. *Conserv Biol* 4:355–364.
- Niemelä, J. 2000. Biodiversity monitoring for decision-making. *Ann Zool Fennici* 37:307–17.
- Pierce, B.A., 1985. Acid tolerance in amphibians. *BioScience* 35 (4) 239–243. <http://dx.doi.org/10.2307/1310132>
- Perkins, P.J., Boermans, H.J., Stephenson, G.R., 2000. Toxicity of glyphosate and triclopyr using the frog embryo teratogenesis assay- *Xenopus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 940–945. <https://doi.org/10.1002/etc.5620190422>
- Peres, F., Moreira, J.C., Dubois, G.S., 2003. Agrotóxicos, saúde e ambiente: panorama atual e dilemas. Ed. Fiocruz.
- Pedlowski, M.A., Canela, M.C., da Costa Terra, M.A., Ramos de Faria, R.M., 2012. Modes of pesticides utilization by Brazilian smallholders and their implications for human health and the environment. *Crop Prot.* 31, 113–118. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.10.002>
- Pignati, W., Oliveira, N.P., Silva, A.M.C. da, 2014. Vigilância aos agrotóxicos: quantificação do uso e previsão de impactos na saúde-trabalho-ambiente para os municípios brasileiros. *Cien. Saude Colet.* 19, 4669–4678. <https://doi.org/10.1590/1413-812320141912.12762014>
- Relyea, R.A., 2000a. TRAIT-MEDIATED INDIRECT EFFECTS IN LARVAL ANURANS:

- REVERSING COMPETITION WITH THE THREAT OF PREDATION. *Ecology* 81, 2278–2289.
- Relyea, R.A., 2000b. Trait-Mediated Indirect Effects in Larval Anurans: Reversing Competition with the Threat of Predation Published by: Ecological Society of America TRAIT-MEDIATED INDIRECT EFFECTS IN LARVAL ANURANS: REVERSING COMPETITION WITH THE THREAT OF PREDATION. *Ecology* 81, 2278–2289.
- Relyea, R.A., 2004. Growth and Survival of five amphibian species exposed to combinations of pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23:1737–1742.
- Relyea, Rick A., 2005. The Lethal Impacts of Roundup and Predatory Stress on Six Species of North American Tadpoles 357, 351–357. <https://doi.org/10.1007/s00244-004-0086-0>
- Relyea, R. A., 2005. The lethal impacts of roundup and predatory stress on six species of North American tadpoles. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 48, 351–357. <https://doi.org/10.1007/s00244-004-0086-0>
- Relyea, R.A., 2009. A cocktail of contaminants: How mixtures of pesticides at low concentrations affect aquatic communities. *Oecologia* 159, 363–376. <https://doi.org/10.1007/s00442-008-1213-9>
- Relyea, R.A., Jones, D.K., 2009. The toxicity of roundup original max® to 13 species of larval amphibians. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 2004–2008. <https://doi.org/10.1897/09-021.1>
- Relyea, R.A., 2012. New effects of Roundup on amphibians: Predators reduce herbicide mortality; Herbicides induce antipredator morphology. *Ecol. Appl.* 22, 634–647. <https://doi.org/10.1890/11-0189.1>
- Rodrigues, S.C., Prado, I.M.M., 2004. Agentes Poluidores de Água. *Arq. Apadec*.
- Rodrigues, B.N., Almeida, F.L.S. 2005. Guia de Herbicidas. Grafmark, Londrina p. 592.
- Sparling, D.W., Fellers, G.M., McConnell, L.L., 2001. Pesticides and Amphibian Population Declines in California, USA. *Environ Toxicol Chem* 20:1591–1595.
- Simon, S., 2006. *Physalaemus erikae*. Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN 2006:

e.T61832A12565227.

<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2006.RLTS.T61832A12565227.en>. acessado em 17 de agosto de 2019.

Santana, A.S., J.F., 2007. Diet of *Physalaemus cicada* (Leptodactylidae) and *Bufo granulosis* (Bufonidae) in a semideciduous forest. *Braz. J. Biol* 67, 125–131.

Schiesari, L., Grillitsch, B., Grillitsch, H., 2007. Biogeographic biases in research and their consequences for linking amphibians declines to pollution. *Conserv Biol* 21:465–471.

Sumanadasa, D.M., Wijesinghe, M.R., Ratnasooriya, W.D., 2008. Effects of diazinon on survival and growth of two amphibian larvae. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka* 36:165–169.

Sayed, A.E.H., Hakeem, S.S.A., Mahmoud, U.M., Mekkawy, I.A., 2012. 4-Nonylphenol induced morphological and histopathological malformations in *Bufo regularis* tadpoles 1:143–151.

Simioni, F., Silva, D.F.N. da, Mott, T., 2013. Toxicity of Glyphosate on *Physalaemus albonotatus* (Steindachner, 1864) from Western Brazil. *Ecotoxicol. Environ. Contam.* 8, 55–58. <https://doi.org/10.5132/eec.2013.01.008>

Salgado Costa, C., Ronco, A., Trudeau, V., Marino, D., Natale, G., 2018. Tadpoles of the horned frog *Ceratophrys ornata* exhibit high sensitivity to chlorpyrifos for conventional ecotoxicological and novel bioacoustic variables. *Environ. Pollut.* 235, 938–947. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.096>

Thompson, D.G., Wojtaszek, B.F., Staznik, B., Chartrand, D.T., Stephenson, G.R., 2004. Chemical and biomonitoring to assess potential acute effects of Vision® herbicide on native amphibian larvae in forest wetlands. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 843–849. <https://doi.org/10.1897/02-280>

Torretta, V., 2018. Critical Review of the Effects of Glyphosate Exposure to the Environment and Humans through the Food Supply Chain 1–20. <https://doi.org/10.3390/su10040950>

U.S.EPA. (United States Environmental Protection Agency). 2008. Risks of glyphosate use to federally threatened California Red-legged frog (*Rana aurora draytonii*). Pesticide effects determination. Washington, D.C. Accessible at

<<http://www.epa.gov/espp/litstatus/effects/redleg-frog/#glyphosate>> Downloaded on 30 November 2019.

- Van Buskirk, J. e McCollum, S.A., 2000. Mecanismos funcionais de uma defesa induzível em girinos: morfologia e comportamento influenciam o risco de mortalidade por predação. *J Evol Biol.*, 13: 336 - 347.
- Vereecken, H., 2005. Mobility and leaching of glyphosate: a review. *Pest Manag. Sci.* 61, 1139–1151. <https://doi.org/10.1002/ps.1122>
- Veiga, M.M., Duarte, F.J. de C.M., Meirelles, L.A., Garrigou, A., Baldi, I., 2007. A contaminação por agrotóxicos e os Equipamentos de Proteção Individual (EPIs). *Rev. Bras. Saúde Ocup.* 32, 57–68. <https://doi.org/10.1590/S0303-76572007000200008>
- Wilson, C., Tisdell, C., 2001. Why farmers continue to use pesticides despite environmental, health and sustainability costs. *Ecol. Econ.* 39, 449–462. [https://doi.org/10.1016/S0921-8009\(01\)00238-5](https://doi.org/10.1016/S0921-8009(01)00238-5)
- Widder, P.D., Bidwell, J.R., 2008. Tadpole size, cholinesterase activity, and swim speed in four frog species after exposure to sub-lethal concentrations of chlorpyrifos 88:9–18.
- Williams, B.K., Semlitsch, R.D., 2010. Larval responses of three midwestern anurans to chronic, low-dose exposures of four herbicides. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 58, 819–827. <https://doi.org/10.1007/s00244-009-9390-z>
- Wrubleswski, J., Reichert, F.W., Galon, L., Hartmann, P.A., Hartmann, M.T., 2018. Acute and chronic toxicity of pesticides on tadpoles of *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leptodactylidae). *Ecotoxicology* 27, 360–368. <https://doi.org/10.1007/s10646-018-1900-1>
- Zhelev, Z., Tsonev, S., Georgieva, K., Arnaudova, D., 2018. Health status of *Pelophylax ridibundus* (Amphibia: Ranidae) in a rice paddy ecosystem in Southern Bulgaria and its importance in assessing environmental state: haematological parameters. *Environmental Science and Pollution Research*.