

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

PRISCILLA RENNÓ ALMEIDA

**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)**

Poços de Caldas/MG
2014

PRISCILLA RENNÓ ALMEIDA

**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)**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciência e Engenharia Ambiental, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Alfenas.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Vinícius Rodrigues

Poços de Caldas/MG
2014

A447t

Almeida, Priscilla Rennó.

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). / Priscilla Rennó Almeida. - Poços de Caldas, 2014.

95 fls. : il. ; 30 cm.

Orientador: Marcos Vinícius Rodrigues

Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia Ambiental). –
Universidade Federal de Alfenas- Poços de Caldas, MG, 2014.

Bibliografias

1. Glifosato. 2. Toxicidade aguda. 3. *Physalaemus cuvieri*. I. Rodrigues, Marcos Vinícius (orient.). II. Universidade Federal de Alfenas- UNIFAL. III. Título.

CDD 628

PRISCILLA RENNÓ ALMEIDA

**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)**

A banca examinadora abaixo-assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciência e Engenharia Ambiental, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Alfenas.

Área de Concentração: Monitoramento Ambiental.

Aprovada em: 15 de Dezembro de 2014.

Prof. Dr. Marcos Vinícius Rodrigues

Instituição: Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL Poços de Caldas - MG

Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida

Instituição: Universidade Estadual Paulista – UNESP São José do Rio Preto - SP

Prof. Dr. Paulo Augusto Zaitune Pamplin

Instituição: Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL Poços de Caldas – MG

À meu querido pai (*in
memorian*), por nunca ter me
abandonado, mesmo depois de
sua partida, e por me fazer ter a
certeza de que, onde quer que
esteja, está sorrindo!

Dedico

AGRADECIMENTOS

Inicio os agradecimentos deste trabalho ao meu orientador Marcos Vinicius Rodrigues, por ter me dado total liberdade de desenvolver um projeto de meu interesse e ter me auxiliado a todo momento da melhor maneira possível e sempre a disposição, e à minha coorientadora Adriana Maria Imperador, pela serenidade e sutileza em todos os momentos;

Meu agradecimento especial à Juliane Silberschmidt Freitas, que desempenhou um papel de orientadora e amiga, por receber uma “estranha” em sua casa e por ser uma das principais responsáveis pelo desenvolvimento desse tema;

À professora Denise Rossa-Feres por ceder seu laboratório e pelos conselhos dados em breve encontro e à sua equipe, que me acolheu muito bem, em especial à Katiuce Picheli, pelo brilhante treinamento ministrado e por fazer eu me encantar ainda mais pelos "pequenos";

Aos amigos/herpetólogos Renato Gaiga, Pedro Dias e Christopher Loiola, mestres muito além da academia, pelos ensinamentos em cada dedo de prosa e por me fazerem ter a certeza de que escolhi a área certa;

À todos os colegas de mestrado, em especial Fábio Lima, Marcos Garcia, Daniel Pimenta e Enne Alves, por fazerem dessa trajetória algo mais divertido acompanhado de churrascos e cervejas;

À Fernanda Tonizza, Raphael Limão, Eduardo Almeida, Thales Trez, Stéfane Baron e outros amigos pelos materiais fornecidos e ajudas em momentos chave do desenvolvimento do projeto. Em especial ao Ernesto Cañedo (querido Juninho), que me salvou aos 47 minutos do segundo tempo; À todos os técnicos dos laboratórios, em especial Aline e David, pelos auxílios à bióloga de campo que sou dentro de um laboratório;

À minha família, por acreditarem na minha capacidade e me incentivarem sempre que o desânimo chegava e parecia que ia tomar conta. Mãe, Má e Amanda, obrigada por não me deixarem desistir. Obrigada também à todos meus amigos e amigas que não cabem aqui, por estarem sempre na torcida e presentes na minha caminhada;

E às maiores parcerias da vida, Allisson e Rafaella, por me tirarem constantemente a atenção e me fazerem desviar daquilo que estou fazendo só para poder desfrutar da companhia um do outro, mesmo que para fazermos nada, desde que juntos. Obrigada por serem companheiro e filha, e sempre que preciso biólogos, “sapólogos”, cozinheiros, mestrandos, donos de casa, mas sempre amigos e parceiros incondicionais. Com vocês a vida é mais leve e divertida!

À CAPES, pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste projeto.

À todos, minha sincera gratidão!

RESUMO

O declínio de anfíbios no mundo está cada vez maior e a perda de riqueza muitas vezes está associada a áreas agrícolas. O uso de agrotóxicos, em especial aqueles a base de glifosato é cada vez maior e novas formulações estão sendo desenvolvidas. O presente trabalho avaliou a toxicidade aguda do formulado comercial Roundup Original® e os efeitos comportamentais e morfológicos em girinos de *Physalaemus cuvieri* e *Rhinella icterica*. Foram utilizadas cinco diferentes concentrações além do teste Controle nos tempos amostrais de 48 horas e 96 horas. Para *P. cuvieri* as concentrações utilizadas foram 0 (controle), 3,19 mg/L, 6,36 mg/L, 9,51 mg/L, 12,64 mg/L e 15,75 mg/L de solução mãe de 1000 mg/L de glifosato e as concentrações utilizadas para *Rhinella icterica* foram 0 (controle), 4,97 mg/L, 9,90 mg/L, 14,78 mg/L, 19,61 mg/L e 24,39 mg/L de solução mãe de 1000 mg/L de glifosato. Para *Physalaemus cuvieri* a LC50_{48h} foi de 6,66 mg/L enquanto a LC50_{96h} foi de 7,17 mg/L, e para *Rhinella icterica* a LC50_{48h} foi de 15,01 mg/L e a LC50_{96h} foi de 11,25 mg/L. *P. cuvieri* se mostrou mais sensível em relação ao Roundup Original® do que *R. icterica*. As análises comportamentais foram realizadas nos indivíduos sobreviventes aos tratamentos do teste de toxicidade aguda, observando a forma do nado, se estava normal ou alterado. Não houve diferenças significativas em relação às alterações comportamentais e o aumento das concentrações de Roundup Original® tanto em *P. cuvieri* quanto em *R. icterica*. As análises morfológicas foram avaliadas através da malformação da cavidade oral, inserção caudal, posição intestinal (apenas em *P. cuvieri*), peso e comprimento. O presente trabalho sugere que Roundup Original® foi responsável pelas alterações morfológicas em Peso e Comprimento dos girinos de *P. cuvieri* e *R. icterica*. Sugere-se também que em elevado tempo de exposição, pode afetar a cavidade oral de girinos de *Physalaemus cuvieri*.

Palavras-chave: Glifosato. Toxicidade aguda. *Physalaemus cuvieri*. *Rhinella icterica*. Comportamento. Malformações.

ABSTRACT

The decline of amphibians in the world is increasing and the loss richness is often associated with agricultural areas. The use of pesticides, especially those based on glyphosate is increasing and new formulations are being developed. This study evaluated the acute toxicity of commercial formulated Roundup Original® and behavioral and morphological effects on *Physalaemus cuvieri* and *Rhinella icterica* tadpoles. Were used five different concentrations sample and the control test, at time of 48 hours and 96 hours. To *P. cuvieri* the concentrations used was 0 (control), 3,19 mg/L, 6,36 mg/L, 9,51 mg/L, 12,64 mg/L and 15,75 mg/L solution of 1000 mg/L of glyphosate, and the concentrations used to *R. icterica* was 0 (control), 4,97 mg/L, 9,90 mg/L, 14,78 mg/L, 19,61 mg/L and 24,39 mg/L solution of 1000 mg/L of glyphosate. To *Physalaemus cuvieri* the LC50_{48h} was 6,66 mg/L while LC50_{96h} was 7,17 mg/L and to *Rhinella icterica* the LC50_{48h} was 15,01mg/L and LC50_{96h} was 11,25 mg/L. *P. cuvieri* proved to be more sensitive to Roundup Original® than *R. icterica*. Behavioral analyzes was did in survivors of the acute toxicity test and analyzed the swimming, being normal or abnormal. There weren't significant differences in relation to behavioral changes and increased concentrations of Roundup Original® both *P. cuvieri* as in *R. icterica*. Morphological analyzes were assessed by malformation of the oral cavity, body, intestinal position (in *P. cuvieri* only), weight and length. The present work suggests that Roundup Original® was responsible for morphological changes in weight and length of tadpoles of *P. cuvieri* and *R. icterica*. It is also suggested that at high exposure time can affect the oral cavity of tadpoles of *Physalaemus cuvieri*.

Keywords: Glyphosate. Acute toxicity. *Physalaemus cuvieri*. *Rhinella icterica*. Behavior. Malformations.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura química do glifosato	26
Figura 2 -	Ilustração de cavidade oral de girino de <i>Physalaemus cicada</i> com fileiras de denticulos apontadas pelas setas vermelhas, sendo duas fileiras superiores (a segunda com um GAP – espaço entre uma única fileira) e três fileiras inferiores (sendo a primeira com um GAP)	33
Figura 3 -	<i>Physalaemus cuvieri</i> (Fitzinger, 1826) adulto	38
Figura 4 -	Distribuição de <i>Physalaemus cuvieri</i>	39
Figura 5 -	Desovas de espuma de <i>Physalaemus cuvieri</i>	39
Figura 6 -	Girino de <i>Physalaemus cuvieri</i> em visão lateral e dorsal, respectivamente ...	40
Figura 7 -	Cavidade oral padrão 2(2)/3(1) de <i>P. cuvieri</i>	41
Figura 8 -	<i>Rhinella icterica</i> macho (a esquerda) e fêmea (a direita)	42
Figura 9 -	Distribuição de <i>Rhinella icterica</i>	42
Figura 10 -	Desova de cordão de <i>Rhinella icterica</i> em ambiente lântico	43
Figura 11 -	Cavidade oral padrão 2(2)/3 de <i>Rhinella schneideri</i>	44
Figura 12 -	Disposição das desovas de <i>Physalaemus cuvieri</i> (A e B) e de <i>Rhinella schneideri</i> (C e D) nas bandejas em laboratório	45
Figura 13 -	Corpo e inserção caudal em visão dorsal (A) e ventral (B) de girino de <i>Physalaemus cuvieri</i> do tratamento controle considerado normal (padrão) para análise comparativa dos outros indivíduos	61
Figura 14 -	Intestino de girino de <i>Physalaemus cuvieri</i> do tratamento controle considerado normal (padrão) para análise comparativa dos outros indivíduos	62
Figura 15 -	Cavidade oral de girino de <i>Physalaemus cuvieri</i> (padrão 2(2)/3(1)) do tratamento controle considerado normal (padrão) para análise comparativa dos outros indivíduos	62
Figura 16 -	<i>P. cuvieri</i> considerados fora de padrão em relação ao corpo	69
Figura 17 -	<i>P. cuvieri</i> considerados fora de padrão em relação à cavidade oral	69
Figura 18 -	Intestinos de girinos de <i>Physalaemus cuvieri</i> com padrões alterados da dupla espiral, considerados não padrão e proeminência do fígado (setas)	70

Figura 19 -	Girinos de <i>Physalaemus cuvieri</i> mortos no experimento de toxicidade aguda com intestino esbranquiçado, Extrusão intestinal de girinos e esbranquiçamento dos mesmos	71
Figura 20 -	Corpo e inserção caudal em visão dorsal de girino de <i>Rhinella schneideri</i> considerado normal (padrão) para análise comparativa dos outros indivíduos	71
Figura 21 -	Cavidade oral de girino de <i>Rhinella schneideri</i> (padrão 2(2)/3) considerado normal (padrão) para análise comparativa dos outros indivíduos	72
Figura 22 -	Girino de <i>Rhinella icterica</i> em posição dorsal considerado com o corpo fora do padrão em análise comparativa com outros indivíduos considerados padrão	77
Figura 23 -	Cavidade oral de girinos de <i>R. icterica</i> com dentículos ausentes e falhos	78

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Mortalidade de girinos de <i>Physalaemus cuvieri</i> nos tempos de 48 e 96 horas	51
Gráfico 2 -	LC50 e níveis de variação ($p \leq 0.05$) de <i>Physalaemus cuvieri</i> nos tempos de 48 e 96 horas	51
Gráfico 3 -	Mortalidade de girinos de <i>Rhinella icterica</i> nos tempos de 48 e 96 horas..	52
Gráfico 4 -	LC50 e níveis de variação ($p \leq 0.05$) de <i>Rhinella icterica</i> nos tempos de 48 e 96 horas	53
Gráfico 5 -	LC50 em 48h e 96h de <i>Rhinella icterica</i> (à esquerda) comparada à LC50 de <i>Physalaemus cuvieri</i> nos mesmos tempos amostrais (à dir.)	53
Gráfico 6 -	Frequência de comportamento Normal e Afetado de <i>Physalaemus cuvieri</i> nas concentrações de Roundup Original® e Controle no tempo de 48 horas. Não houve avaliação em C3, C4 e C5, pois todos os indivíduos já haviam morrido no teste de toxicidade aguda	55
Gráfico 7 -	Frequência de comportamento Normal e Afetado de <i>Physalaemus cuvieri</i> nas concentrações de Roundup Original® e Controle no tempo de 96 horas. Não houve avaliação em C4 e C5, pois todos os indivíduos já haviam morrido no teste de toxicidade aguda	55
Gráfico 8 -	Frequência de girinos de <i>Physalaemus cuvieri</i> que apresentaram comportamento afetado nas concentrações de Roundup Original® e Controle, nos tempos de 48h e 96h. Não foram realizadas avaliações em C4 e C5, pois todos os indivíduos já haviam morrido no teste de toxicidade aguda	56
Gráfico 9 -	Relação de Comportamento Afetado (média de frequência) em relação aos Tratamentos de <i>Physalaemus cuvieri</i> no tempo amostral de 96h	57
Gráfico 10 -	Frequência de comportamento Normal e Afetado de <i>Rhinella icterica</i> nas concentrações de Roundup Original® e Controle em 48 horas	58
Gráfico 11 -	Frequência de comportamento Normal e Afetado de <i>Rhinella icterica</i> nas concentrações de Roundup Original® e Controle em 96 horas	58

Gráfico 12 -	Porcentagem de girinos de <i>Rhinella icterica</i> que mantiveram comportamento normal (nado não afetado) nas concentrações de Roundup Original® e Controle nos tempos de 48h e 96h. Não foram realizadas avaliações em C5, pois todos os indivíduos já haviam morrido no teste de toxicidade aguda em ambos os tempos amostrais	59
Gráfico 13 -	Relação de Comportamento Afetado (Média de Frequência) em relação aos Tratamentos de <i>Rhinella icterica</i> no tempo amostral de 48h	60
Gráfico 14 -	Resposta dos indivíduos de <i>Physalaemus cuvieri</i> nas análises morfológicas no tempo de 48h, apresentando alguma malformação (afetado) ou não (normal). Não foram realizadas análises morfológicas nas concentrações a partir de C3 pois todos os indivíduos já haviam morrido no experimento de toxicidade aguda	63
Gráfico 15 -	Tipos de malformações apresentadas pelos indivíduos em 48h de exposição ao Roundup Original® e suas respectivas frequências nas concentrações C1, C2 e Controle. Não foram realizadas análises morfológicas nas concentrações a partir de C3 pois todos os indivíduos já haviam morrido no experimento de toxicidade aguda	64
Gráfico 16 -	Relação do Comprimento dos indivíduos de <i>Physalaemus cuvieri</i> em relação aos tratamentos tempo amostral de 48h	65
Gráfico 17 -	Resposta dos indivíduos de <i>Physalaemus cuvieri</i> nas análises morfológicas no tempo amostral de 96h, apresentando alguma malformação (afetado) ou não (normal). Não foram realizadas análises morfológicas nas concentrações a partir de C3 pois todos os indivíduos já haviam morrido no experimento de toxicidade aguda	66
Gráfico 18 -	Tipos de malformações e interações apresentadas pelos indivíduos em 96h de exposição ao Roundup Original® e suas respectivas frequências nas concentrações C1, C2, C3 e Controle. Não foram realizadas análises morfológicas nas concentrações a partir de C4 pois todos os indivíduos já haviam morrido no experimento de toxicidade aguda	67
Gráfico 19 -	Relação de malformação da cavidade oral de <i>Pysalaemus cuvieri</i> em relação aos tratamentos em 96 horas	68

Gráfico 20 -	Relação de Peso e Comprimento de girinos de <i>Physalaemus cuvier</i> em relação aos Tratamentos em 96 horas	68
Gráfico 21 -	Resposta dos indivíduos de <i>Rhinella icterica</i> no tempo de 48h à presença ou ausência de alterações morfológicas. Não foram realizadas análises a partir de C3 pois todos os indivíduos já haviam morrido no experimento de toxicidade aguda	73
Gráfico 22 -	Frequência das malformações de cavidade oral, inserção caudal (corpo) e interação entre as ocorrências em indivíduos de <i>R. icterica</i> analisados no tempo de 48h	73
Gráfico 23 -	Relação de malformação da cavidade oral e da inserção caudal (corpo) de <i>Rhinella icterica</i> em relação aos tratamentos no tempo amostral de 48 horas	74
Gráfico 24 -	Resposta estatística no comprimento e peso de <i>Rhinella icterica</i> para Controle e as concentrações C1, C2, C3 e C4 no tempo amostral de 48 horas	75
Gráfico 25 -	Resposta dos indivíduos de <i>Rhinella icterica</i> às análises morfológicas no tempo de 96h. Não foram realizadas análises em C4 e C5 pois todos os indivíduos já haviam morrido no experimento de toxicidade aguda	75
Gráfico 26 -	Frequência das malformações de cavidade oral, inserção da cauda e interação entre as ocorrências em indivíduos de <i>R. icterica</i> analisados no tempo de 96h	76
Gráfico 27 -	Resposta estatística no comprimento e peso de <i>Rhinella icterica</i> para Controle e as concentrações C1, C2, C3 e C4 no tempo amostral de 96 horas	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Alguns testes de toxicidade aguda realizados por diferentes autores, formulações de glifosato ou surfactante isolado e diferentes tempos em diferentes espécies de anfíbios anuros(*) e organismos aquáticos	79
------------	--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	19
2.1	OBJETIVOS GERAIS	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3	REFERENCIAL TEÓRICO	20
3.1	TOXICOLOGIA E ECOTOXICOLOGIA	20
3.2	AGROTÓXICOS	24
3.2.1	Compostos químicos organofosforados	26
3.2.1.1	Glifosato e Roundup®	27
3.3	AGRICULTURA NO MUNICÍPIO DE POÇOS DE CALDAS – MG	30
3.4	ANFÍBIOS ANUROS	32
3.4.1	Declínio de Anfíbios	35
3.5	ESPÉCIES ESTUDADAS	38
3.5.1	<i>Physalaemus cuvieri</i> (Anura, Leptodactylidae)	38
3.5.2	<i>Rhinella icterica</i> (Anura, Bufonidae)	41
4	METODOLOGIA	44
4.1	TESTE DE TOXICIDADE AGUDA	44
4.1.1	<i>Physalaemus cuvieri</i>	46
4.1.2	<i>Rhinella icterica</i>	47
4.2	EFEITOS SUBLETAIS	47
4.2.1	Análise de comportamento	48
4.2.2	Análises morfológicas	48
4.2.3	Análises estatísticas	49
5	RESULTADOS	50
5.1	TESTE DE TOXICIDADE	50
5.1.1	<i>Physalaemus cuvieri</i>	50
5.1.2	<i>Rhinella icterica</i>	52
5.1.3	<i>Physalaemus cuvieri</i> x <i>Rhinella icterica</i>	53
5.2	ANÁLISE DE COMPORTAMENTO	54

5.2.1	<i>Physalaemus cuvieri</i>	54
5.2.2	<i>Rhinella icterica</i>	57
5.2.3	<i>Physalaemus cuvieri</i> x <i>Rhinella icterica</i>	60
5.3	ANÁLISES MORFOLÓGICAS	60
5.3.1	<i>Physalaemus cuvieri</i>	61
5.3.2	<i>Rhinella icterica</i>	71
5.3.3	<i>Physalaemus cuvieri</i> x <i>Rhinella icterica</i>	78
6	DISCUSSÃO	79
6.1	TESTE DE TOXICIDADE	79
6.2	ANÁLISES MORFOLÓGICAS E COMPORTAMENTAIS	84
7	CONCLUSÃO	87
	REFERÊNCIAS	88
	ANEXO A	94

1 INTRODUÇÃO

A ecotoxicologia identifica uma área de estudo que une ecologia e toxicidade, um tema muito enfatizado nos últimos tempos devido à preocupação de se conhecer os efeitos que produtos químicos, cada vez mais utilizados nos últimos anos, provocam em indivíduos, populações e comunidades. Walker et al. (2006) a definem como o estudo de efeitos nocivos de compostos químicos em ecossistemas, que incluem efeitos em indivíduos assim como os efeitos consequentes em populações e níveis superiores.

O principal foco desta área de estudo é a relação entre a quantidade de compostos químicos a qual um organismo é exposto e o grau de seu efeito prejudicial. A relação dose-resposta fornece a base para avaliação dos perigos e riscos apresentados pelos compostos. Um composto químico pode não ser prejudicial se a dose for baixa o suficiente, assim como todos podem ser se a dose for alta o suficiente (WALKER et al., 2006).

O desenvolvimento acelerado da agricultura tem levado ao aumento do uso de agrotóxicos. De acordo com Gasques et al. (2012), nos últimos 37 anos o produto agrícola no Brasil cresceu a uma taxa média anual de 3,77%. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2012) prevê uma projeção na produção do café, por exemplo, elevando-se a uma taxa média anual de 4,4% até o período de 2019/2020. Algumas mudanças, tais como o advento de alimentos transgênicos, resistentes a algumas pragas, não resultaram na diminuição do uso dos compostos químicos (AMARANTE JUNIOR et al., 2002), contribuindo para a produção de novas formulações, cada vez mais agressivas ao ambiente.

Os anfíbios são um dos grupos de animais mais ameaçados de extinção em todo o mundo e vêm sofrendo uma queda de riqueza em grandes proporções desde a década de 1980. Cerca de 30% das espécies de anfíbios estão classificadas como ameaçadas. Aproximadamente 25% possuem dados insuficientes, incapazes de classificar essas espécies quanto ao nível de ameaça. Estima-se que 38 espécies já foram certamente extintas na natureza, porém, 120 espécies não foram encontradas nos últimos anos e podem também terem sido extintas (IUCN, 2013).

Vários fatores são apresentados para explicar o declínio dos anfíbios, como alterações antrópicas, mudanças climáticas e destruição do habitat. Outras possíveis causas têm sido apontadas, como aumento da exposição à radiação ultravioleta, doenças emergentes, presença

de espécies exóticas e exposição a poluentes ambientais (BRUNELLI et al., 2009; DAVID et al., 2012; LAJMANOVICH et al., 2003; RELYEA, 2005b). Além do declínio da riqueza de espécies, a redução de populações e a alta incidência de deformidades têm sido relatadas em agroecossistemas, que podem estar relacionados à exposição a agrotóxicos (BRUNELLI et al., 2009; RELYEA, 2005b).

O impacto de poluentes ambientais na população de anfíbios é influenciado pelas alterações climáticas e modificação do habitat. As mudanças climáticas afetam os efeitos dos contaminantes, pois na maioria dos casos, a meia-vida dos poluentes químicos é dependente de vários fatores, como temperatura, pH, incidência de luz, humidade, etc., que podem reduzir o impacto do composto químico, reduzindo sua meia-vida, ou transformar os poluentes em formas mais prejudiciais. A modificação do habitat pode provocar maior aumento da exposição a produtos químicos, além da possibilidade de tornarem mais concentrados em lagos, lagoas e rios em períodos de estiagem, comprometendo o abastecimento de águas superficiais (HAYES et al., 2010).

O efeito de poluentes em girinos é menos conhecido em relação aos anfíbios adultos, pois as larvas dos anuros são menos visíveis e ao contrário dos adultos, não possuem vocalização. Girinos de várias espécies ainda não foram descritos, o que dificulta ainda mais o estudo aprofundado destes organismos (McDIARMID; ALTIG, 1999). De acordo com Seixas Filho et al. (2003), os girinos nos estágios menos desenvolvidos são mais sensíveis do que aqueles em estágios mais avançados, apresentando menor capacidade de ajuste ao meio, não resistindo ao intenso trabalho metabólico, assim como a preparação para mudança de uma respiração branquial para uma respiração pulmonar.

Poços de Caldas é uma cidade localizada na região sul de Minas Gerais, na divisa com o estado de São Paulo, na borda ocidental da Serra da Mantiqueira (LORENZO, 1991), fragmento de bioma Mata Atlântica, considerada a segunda maior floresta pluvial tropical do continente americano e o bioma brasileiro mais alterado pela ação antrópica (LEDERMAN; PADOVAN, 2005) e, mesmo considerado um dos biomas mais ameaçados do mundo, a Mata Atlântica é considerada um *hotspot* mundial, sendo uma das áreas mais ricas em biodiversidade (MYERS et al., 2000). O município situa-se num planalto com área aproximada de 750 km², altitude média de 1300 metros e campos suavemente ondulados (PREFEITURA MUNICIPAL DE POÇOS DE CALDAS, 2011), e de acordo com quatro

levantamentos da herpetofauna no município (CARDOSO, 1986; GIARETTA; SAZIMA, 1993; LOIOLA, 2010; MONTEIRO-LEONEL, 2004), Poços de Caldas apresenta uma riqueza de 40 espécies de anfíbios, sendo 3 espécies endêmicas da região de Minas Gerais. No município as culturas do café e da batata são as mais difundidas e o glifosato é o agrotóxico mais utilizado, e muitos corpos d'água utilizados como sítios reprodutivos dos anfíbios anuros coincidem com as áreas agrícolas na região.

2 OBJETIVOS

Neste tópico serão apresentados os objetivos deste trabalho, geral e específicos.

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo avaliar, sob condições laboratoriais, a toxicidade aguda da formulação do glifosato comercial Roundup Original[®] (Equivalente ácido de N - (fosfonometil) glicina a 36,0% m/v), analisando a sensibilidade de girinos de *Physalaemus cuvieri* e *Rhinella icterica*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos do presente trabalho são:

- A) Determinar as LC50 para o formulado comercial Roundup Original[®] em larvas de *Physalaemus cuvieri* e *Rhinella icterica*;
- B) Determinar as LC50 para os tempos de 48 e 96 horas;
- C) Avaliar a capacidade do formulado comercial Roundup Original[®] em provocar alterações comportamentais nos indivíduos submetidos aos tratamentos para todas as concentrações e tempos experimentais;
- D) Avaliar a ocorrência de malformações provocadas pelas concentrações do contaminante nos girinos de *Physalaemus cuvieri* e *Rhinella icterica*;
- E) Avaliar o efeito do formulado comercial Roundup Original[®] sobre as taxas de crescimento dos girinos através de medidas do comprimento e peso (comparados ao tratamento controle);
- F) Comparar a sensibilidade, comportamento e ocorrência de malformações entre as espécies estudadas.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

Neste tópico será apresentado o referencial teórico, subdividido nos subitens: Toxicologia e Ecotoxicologia, Agrotóxicos (subdividido em Compostos químicos organofosforados e novamente subdividido em Glifosato e Roundup®), Agricultura no município de Poços de Caldas – MG, Anfíbios anuros (subdividido em Declínio de Anfíbios) e Espécies estudadas (com os subitens *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leptodactylidae) e *Rhinella icterica* (Anura, Bufonidae)).

3.1 TOXICOLOGIA E ECOTOXICOLOGIA

Em toxicologia, a avaliação da toxicidade de um composto é geralmente realizada em duas etapas, sendo a) identificação da periculosidade e b) avaliação de dose-resposta. A avaliação de periculosidade é o processo para determinar se a exposição a um composto químico pode causar aumento na incidência de efeitos adversos à saúde (como câncer, por exemplo) e se o efeito adverso à saúde é provável que ocorra em seres humanos. A avaliação de dose-resposta é o processo de avaliar quantitativamente a toxicidade do composto químico e caracterizar a relação entre a dose administrada do contaminante e a incidência dos efeitos adversos sobre a saúde da população exposta (USEPA, 2014)

O objetivo da avaliação de toxicidade é avaliar as evidências disponíveis sobre o potencial de determinados contaminantes em causar efeitos adversos aos organismos expostos e fornecer, sempre que possível, uma estimativa da relação entre o grau de exposição a um contaminante e a gravidade dos efeitos adversos (USEPA, 2014).

O termo ecotoxicologia foi introduzido por Truhaut, em 1960 e foi derivado das palavras ecologia e toxicologia. A introdução deste novo termo refletiu a preocupação em relação ao crescimento dos compostos químicos no meio ambiente (WALKER et al., 2006).

A avaliação ecotoxicológica constitui importante ferramenta para análise dos efeitos prejudiciais de agrotóxicos em espécies não alvo, ou seja, aqueles a quem o produto não é diretamente destinado (SILVA et al., 2013).

Os bioensaios são ferramentas que permitem investigar os efeitos ambientais de poluentes em organismos vivos. Geralmente são realizados em laboratórios e têm a vantagem

de medir diretamente os efeitos tóxicos de substâncias bioacumuladas em organismos aquáticos, informando a relação entre os compostos químicos e a qualidade biológica, incluindo a identificação de causa e efeito (BESTEN; MUNAWAR, 2005), porém os ensaios laboratoriais têm a desvantagem dos efeitos químicos serem espécie-específicos, dependendo de diversas variáveis, muitas vezes impossibilitadas de serem reproduzidas em laboratório.

No início dos anos 70, as primeiras diretrizes de testes de toxicidade aguda foram desenvolvidas. Em 1980 a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (United States Environmental Protection Agency - USEPA) iniciou o desenvolvimento dos testes de toxicidade de curto prazo para a estimativa de toxicidade aguda. A partir dos anos 70, as metodologias para testes de toxicidade aumentaram rapidamente.

Testes de toxicidade aquática têm como objetivo estimar a segurança do ambiente e a ocorrência de efeitos adversos das concentrações de compostos químicos, separados ou misturas, em amostras ambientais (BESTEN; MUNAWAR, 2005).

Testes de toxicidade em vertebrados são realizados para a avaliação dos riscos ambientais dos compostos químicos. Embora a poluição seja um problema internacional, os testes são realizados para atender às exigências de autoridades reguladoras nacionais. Geralmente, estes testes são realizados durante o desenvolvimento dos compostos químicos ou se há alguma dúvida em relação à segurança destes compostos e haja necessidade de refazer os testes (WALKER, 1998).

Muitos testes de toxicidade fornecem uma estimativa da concentração do composto químico que vai causar uma resposta tóxica ao nível de 50%, ou seja, a concentração letal média que vai matar metade dos indivíduos submetidos ao experimento (LC50). Os valores obtidos em testes de toxicidade são dependentes das condições sob as quais os testes foram realizados. A interpretação dos dados de toxicidade precisa ser realizada com cautela, pois os testes devem ser determinados sob uma área de condições laboratoriais bem controladas, porém que podem diferir consideravelmente daquelas que prevalecem em um ambiente natural (WALKER et al., 2006).

Os testes de toxicidade aguda são realizados para obter informações sobre os efeitos imediatos em organismos teste a uma exposição de curto prazo (até 96 horas) a um material de teste possivelmente tóxico, em condições experimentais específicas. Um teste de toxicidade aguda não fornece informações se efeitos tardios serão detectados, porém

observações pós-exposição podem fornecer uma ideia de tais informações. Os resultados dos testes de toxicidade aguda devem ser utilizados para comparar as sensibilidades agudas de diferentes espécies e diferentes compostos químicos e estudar os efeitos de vários fatores ambientais nos resultados de toxicidade, além de estudar a possibilidade de relações entre compostos químicos e organismos testes (ASTM, 2002).

A concentração letal (LC) é utilizada quando os compostos químicos são diluídos no ar ou na água. A LC pode ser expressa em partes por milhão (ppm) ou miligramas do composto químico por m³ de água ou ar (mg/ m³). Diferente da LD50, que é a dose necessária para causar a morte de 50% dos indivíduos, e é expressa por miligramas do composto químico por kilogramas do peso corpóreo do animal (mg/kg). (HERZFELD; SARGENT, 2011). A LC50 é calculada com base na concentração de material de teste em água de diluição, enquanto LD50 é utilizada sempre que os resultados são calculados com base na quantidade de material teste que entra ou é diretamente aplicada nos organismos teste (ASTM, 2002).

Os efeitos tóxicos de uma substância química dependem das concentrações presentes nos tecidos do organismo que está submetido ao composto. Isto, por sua vez, depende da concentração do composto químico presente no ambiente e o período de tempo no qual ocorreu a exposição. Assim, a LC50 está relacionada com o período de exposição. Quanto maior a exposição, menor será a LC50, pois será mais tóxica, até atingir o seu limite; neste ponto, aumentos no período de exposição não irão provocar alterações na mortalidade. Pode-se presumir que quando o limite de LC50 é atingido, o sistema entra num estado de equilíbrio, onde a concentração do composto químico no tecido não aumenta com o passar do tempo (WALKER et al., 2006).

Geralmente, o requerimento para indústrias de compostos químicos é que sejam realizados testes de toxicidade em peixes, que geralmente são testes de LC50 ao longo de um período de exposição de 96 horas (teste de toxicidade aguda). Se a produção do composto químico exceder 100 toneladas por ano, são exigidos testes de toxicidade crônica. Caso a produção do composto exceda 1000 toneladas por ano, estudos adicionais de toxicidade devem ser realizados em aves e outros grupos. Por último são incluídos os mamíferos, para que os dados possam servir de avaliação de risco para os humanos (WALKER, 1998).

Nos testes de toxicidade aquática, é importante manter a concentração do agrotóxico na água, que pode ser perdida por absorção e metabolismo dos organismos testados ou por

volatilização, degradação ou adsorção pela água. Por isso, é indicada a renovação da água a intervalos regulares, principalmente em testes de toxicidade crônica (WALKER et al., 2006).

Uma preocupação em relação aos testes de toxicidade em animais é o tamanho dos grupos utilizados para obtenção dos dados (n), se estes são muito grandes em relação à qualidade dos dados que podem ser gerados, pois os dados obtidos dão apenas uma indicação aproximada da toxicidade ambiental. Estes dados não constam nos registros de agrotóxicos e não é claro, a partir dos dados fornecidos, como estes testes foram realizados, onde, quais as medidas de dose/concentração foram utilizadas e qual o nível de dose/concentração máxima prevista sem o aparecimento de sintomas tóxicos (WALKER, 1998).

Em avaliações de risco ambiental, muitos dos testes de toxicidade em animais utilizam a letalidade como ponto final. Entretanto, com o rápido progresso da toxicologia bioquímica nos últimos anos, foi adquirido o conhecimento de testes que precedem o aparecimento de sintomas evidentes de intoxicação química, sendo possível realizar testes de toxicidade evitando a morte e o sofrimento dos animais. Nestes testes, há a interação entre as moléculas tóxicas e os componentes celulares (geralmente macromoléculas), que desencadeia alterações adversas na função celular e expressadas ao nível de todo organismo como sintomas evidentes da toxicidade. Este avanço no conhecimento trouxe tecnologias sofisticadas, que facilitaram a detecção e quantificação das alterações deletérias, porém grande parte desta nova tecnologia é cara e continua restrita a laboratórios especializados (WALKER, 1998).

Ainda existe uma grande lacuna entre os resultados dos testes de laboratório e os reais efeitos que ocorrem em campo. Os resultados obtidos em laboratório estimam os riscos provocados por contaminantes sob condições controladas, e fatores como a rota de exposição dos compostos químicos, a exposição a complexas misturas dos contaminantes, (bio)transformação das substâncias, que podem aumentar ou diminuir a toxicidade, a alteração na concentração em que os organismos estão expostos devido a ligação dos compostos químicos com sedimentos, status nutricionais e fisiológicos dos organismos teste, situações de estresse e a adaptação genética ou fisiológica dos organismos submetidos aos testes são alguns dos diversos fatores que ocorrem no ambiente natural que não podem ser quantificados e completamente reproduzidos em experimentos laboratoriais (BESTEN; MUNAWAR, 2005).

3.2 AGROTÓXICOS

Xenobióticos são substâncias que não estão naturalmente presentes em determinado organismo, ou seja, não fazem parte de sua bioquímica normal. Assim, um elemento químico pode ser normal a um indivíduo, mas a outro não. Os xenobióticos podem ocorrer naturalmente (como toxinas produzidas pelas plantas, por exemplo) ou serem produzidos pelo homem, como biocidas: herbicidas, fungicidas, etc. (WALKER et al., 2006)

De acordo com a Lei nº 7.802 (BRASIL, 1989), agrotóxicos são:

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

São considerados componentes dos agrotóxicos os princípios ativos, os produtos técnicos, suas matérias-primas, os ingredientes inertes e aditivos utilizados na fabricação dos mesmos.

Os agrotóxicos são poluentes ambientais que podem ser uma importante causa de mortalidade da fauna e flora, pois vários declínios estão associados a áreas agrícolas e adjacentes (DAVIDSON et al., 2001; RELYEA, 2005b) e, quando utilizados para combater pragas específicas ou pragas de uma forma geral, sua utilização acaba afetando outros organismos que não são o alvo do produto (RELYEA; JONES, 2009).

Em áreas agrícolas, uma variedade de compostos químicos é utilizada durante o ciclo de cultivo, podendo ter sua toxicidade potencializada quando organismos estão expostos a misturas de agrotóxicos no ambiente (WALKER et al., 2006).

A avaliação do potencial tóxico dos compostos químicos em conjunto é limitada por vários aspectos, pois: a) em uma mistura muitas substâncias podem não ser facilmente identificadas ou detectadas através de análises, b) o número de substâncias pode ser tão

grande que a análise de um composto químico específico pode não ser possível, c) há dados incompletos ou d) faltam dados sobre as características ambientais de diversas substâncias químicas, não sendo possível definir alguns micropoluentes e compostos químicos degradados, que não são representados nas misturas e uma mistura pode ter diversas características ambientais distintas quando comparadas às características das substâncias separadas. Por causa destas limitações, amostras ambientais podem ser parcialmente caracterizadas ou avaliadas (BESTEN; MUNAWAR, 2005).

Para a maioria dos compostos químicos têm-se poucos dados de concentração na natureza e dos efeitos dos agrotóxicos na anurofauna, dificultando a avaliação do real impacto neste grupo. A razão para tal escassez de dados é que a regulamentação para registro de agrotóxicos exige testes em pássaros, mamíferos, peixes e invertebrados aquáticos, mas não em anfíbios; como consequência, a estimativa da toxicidade neste grupo é geralmente baseada através dos resultados de toxicidade de outros grupos (RELYEA, 2005a).

A base de dados de toxicidade para a maioria dos compostos químicos não possuem informações suficientes sobre os efeitos tóxicos em humanos. Sendo assim, pode-se inferir o potencial de um composto químico causar um efeito adverso em seres humanos a partir de informações de toxicidade de experimentos realizados em outros mamíferos, como ratos, coelhos, cachorros e macacos. A ideia de que os mamíferos são semelhantes na susceptibilidade de compostos químicos tóxicos e que os dados a partir de animais podem muitas vezes ser utilizados para seres humanos é uma das premissas da toxicologia (USEPA, 2014).

No Brasil, para registro de agroquímicos, são exigidos pelo Ministério da Saúde, entre outros testes (Anexo I da Portaria nº3, 16/01/92), ensaios de toxicidade em organismos não alvos para avaliar a forma de ação dessas substâncias nos organismos constituintes da cadeia alimentar. Embora os testes com anfíbios não sejam exigidos, tais ensaios têm sido importantes para aumentar o conhecimento e demonstrar a periculosidade e o grau de interferência dos agrotóxicos sobre os ecossistemas aquáticos (SILVA et al., 2013)

3.2.1 Compostos químicos organofosforados

Os compostos organofosforados foram desenvolvidos durante a Segunda Guerra Mundial por seu poder neurotóxico, devido sua habilidade de inibir a enzima acetilcolinesterase (AChE). Estes produtos foram produzidos por dois principais usos: como inseticidas e como agente de guerra química (WALKER et al., 2006).

O Roundup[®], cujo princípio ativo é o glifosato (N-fosfonometil-glicina), é um agrotóxico pertencente ao grupo dos organofosforados. A fórmula empírica do glifosato é C₃H₈NO₅P, enquanto a estrutural é representada na Figura 1.

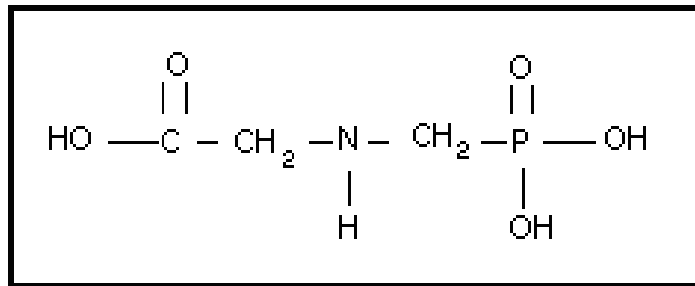


Figura 1 - Estrutura química do glifosato
Fonte: ITHO (2014).

Quando a AChE é inibida pelo composto químico, há um aumento na concentração do neurotransmissor acetilcolina (ACh), que fica acumulado e começam a surgir os sintomas neurológicos da contaminação. Mesmo em concentrações insuficientes para causar inibição da AChE, há evidências que os organofosforados podem alterar alguns processos celulares dos organismos afetados (SILVA et al., 2013).

A maioria dos compostos organofosforados são, em geral, menos estáveis do que os compostos organoclorados e são mais rapidamente quebrados por reações químicas ou bioquímicas, ou seja, eles apresentam uma meia-vida menor quando livres no ambiente, e seus danos ambientais estão largamente (mas não exclusivamente) relacionados à toxicidade aguda. Existe um interesse, assim como outros agroquímicos neurotóxicos, sobre seus efeitos comportamentais em animais submetidos a doses subletais (WALKER et al., 2006).

3.2.1.1 Glifosato e Roundup®

O glifosato foi sintetizado pela primeira vez em 1950. Somente em 1970, J. E. Franz descobriu a propriedade de herbicida desta molécula (BRAGUINI, 2005). O Roundup® surgiu em 1970, sendo o glifosato ingrediente ativo deste herbicida. Em 1974 o Roundup® foi registrado pela primeira vez para uso na Malásia e Reino Unido e, em 1976, para uso nos Estados Unidos. O Brasil recebeu sua primeira amostra para testes em 1972 e, em 1978, o produto (ainda importado) chegava ao país para ser comercializado. Ele passou a ser produzido no Brasil em 1984. Agrotóxicos à base de glifosato são autorizados para uso em jardinagem, como nos Estados Unidos, na reserva ecológica de Galápagos e nas ruínas de Pompéia, na Itália (MONSANTO, 2013).

Atualmente, o agrotóxico Roundup® possui registro em mais de 130 países e é mundialmente o mais vendido para o controle de plantas daninhas em pré-plantio das lavouras (MONSANTO, 2013).

O glifosato é o princípio ativo mais utilizado em agrotóxicos no mundo devido a sua alta eficácia no controle de ervas daninhas na agricultura. Recentemente seu uso aumentou devido ao aumento do cultivo de plantas geneticamente modificadas, resistentes ao glifosato (HOWE et al., 2004; RELYEA & JONES, 2009). É um herbicida de amplo espectro, pós-emergente (ou seja, aplicado após a planta ter emergido do solo), de ação não seletiva, ativo através de translocação na planta (movimento da água e solutos no interior da planta através de tecidos condutores ou vasculares) (ITHO, 2014).

O composto é um ácido orgânico fraco, formado por uma molécula de glicina e outra de fosfometil. Pertence ao grupo químico das glicinas e possui os grupos funcionais carboxilato, amino e fosfato. Tem efeito residual curto, sendo que os resíduos no solo apresentam uma meia-vida curta, e sua degradação no solo é realizada por grande quantidade de microorganismos que o utilizam como fonte de energia de fósforo (USEPA, 1993; AMARANTE JUNIOR et al., 2002; ITHO, 2014), não atingindo as águas subterrâneas devido à sua forte característica de adsorção. No entanto, o glifosato pode contaminar águas superficiais através de seus padrões de uso aquático e erosões, por absorver partículas do solo no escoamento superficial (USEPA, 1993).

Em plantas e alguns microorganismos, o glifosato age como inibidor de enzimas essenciais na síntese de aminoácidos necessários à síntese proteica das plantas, causando déficit de aminoácidos aromáticos (ITHO, 2014). Carbonari et al. (2012) concluíram que o glifosato ocasiona uma redução nos níveis de fenilalanina e tirosina (aminoácidos aromáticos fundamentais para a continuidade da síntese proteica nas plantas) em plantas de milho, embora a tendência seja a recuperar posteriormente. Porém, com a redução desses aminoácidos nas plantas, todos os processos que demandam a participação de enzimas e proteínas são diretamente afetados.

De acordo com Howe et al. (2004), com a remoção da proteção à patente do glifosato, que aconteceu em 2000, muitos novos agrotóxicos com este princípio ativo entraram no mercado, cada um com uma mistura química e surfactantes diferentes em relação à formulação do Roundup Original[®], alguns destes novos produtos altamente tóxicos para organismos não alvo. Assim, além do Roundup[®], alguns outros representantes comerciais têm o glifosato como princípio ativo, como Rodeo[®], Bronco[®] e Weedoff[®] (ITHO, 2014), Touchdown[®] e Roundup Biactive (MANN; BIDWELL, 1999).

O glifosato foi classificado em 1991 como Grupo E pela USEPA (1993), sendo considerado não carcinogênico para humanos, com base na falta de dados convincentes que comprovem a carcinogenicidade em estudos adequados. De acordo com a bula do Roundup Original[®], ele possui Classificação Toxicológica III – Medianamente tóxico e Classificação do Potencial de Periculosidade Classe III – Produto Perigoso ao Meio Ambiente.

Ainda de acordo com a bula em relação a efeitos agudos:

estudos realizados com animais de laboratório demonstraram que o ROUNDUP ORIGINAL possui baixa toxicidade aguda, com DL50 oral igual a 5400 mg/kg de peso corpóreo e DL50 dérmica maior que 5000 mg/kg de peso corpóreo. Em estudo de irritabilidade ocular em coelhos, ROUNDUP ORIGINAL foi levemente irritante, provocando congestão vascular e leve secreção na conjuntiva. Esses sintomas foram reversíveis no decorrer do estudo. ROUNDUP ORIGINAL não possui potencial de sensibilização cutânea.

Segundo Itho (2014), efeitos agudos de glifosato em animais são sugestivos de alteração da atividade mitocondrial. Porém Braguini (2005) concluiu que o glifosato não interferiu no metabolismo mitocondrial.

Nos tecidos orgânicos, a concentração mais elevada de glifosato é localizada nos ossos (ITHO, 2014). A administração de Roundup® para ratas em um período crítico para o desenvolvimento estrutural do estado embriogênico de ratos induziu um retardo no desenvolvimento ósseo, principalmente do crânio e ossos das patas (BRAGUINI, 2005 apud DALLEGRAVE et al., 2003).

Todos os agrotóxicos contêm adjuvantes além de seu princípio ativo, classificados como “inertes”, frequentemente confidenciais, destinados a estabilizar o princípio ativo e permitir que ele seja absorvido pelas plantas. Os órgãos reguladores e os fabricantes de herbicidas a base de glifosato fazem avaliações toxicológicas com o glifosato isolado, e não com o herbicida em suas formulações comerciais (MESNAGE et al., 2012).

Surfactantes (surface active agent) são agentes de atividade superficial, ou seja, são substâncias solventes que tendem a reduzir a tensão superficial do composto em que estão dissolvidas e diferentes formulações de Roundup® possuem diferentes surfactantes. Todos os surfactantes são considerados como ingredientes inertes e não necessitam de testes ou descrição na formulação do produto. Como consequência, fabricantes constantemente desenvolvem novos surfactantes, o que torna necessário constantes testes de toxicidade em organismos não alvos (RELYEA; JONES, 2009).

A formulação de Roundup Original® mais comumente utilizada contém sais de isopropilamina, uma amina surfactante - polioxietilenoamina (POEA) e água. Os solventes utilizados em formulações comerciais podem alterar as propriedades toxicológicas do produto, e alguns surfactantes podem apresentar ações irritativas de importância, não sendo uma ação do próprio princípio ativo (ITHO, 2014).

Os surfactantes mais utilizados em formulações do glifosato são as etilaminas. Os compostos desse grupo de surfactantes são significativamente mais tóxicos do que o próprio princípio ativo (AMARANTE JUNIOR et al., 2002; LAJMANOVICH et al., 2003; MANN; BIDWELL, 1999). Estima-se que o surfactante POEA apresente toxicidade 3 vezes maior do que o glifosato. Porém, o tipo de surfactante e sua concentração podem diferir por formulação (AMARANTE JUNIOR et al., 2002).

Releya e Jones (2009) e Mann e Bidwell (1999) alegaram que o surfactante POEA é o componente do Roundup Original[®] responsável pela mortalidade das larvas de anuros. O produto comercial Roundup[®] é mais tóxico do que o glifosato isolado. A quantidade de Roundup[®] (contendo glifosato e o surfactante POEA) necessária para causar a morte de ratos é aproximadamente 1/3 da quantidade de glifosato sozinho (BRAGUINI, 2005).

Segundo Giesy et al. (2000), as formulações de glifosato são consideradas praticamente não tóxicas para aves e mamíferos, moderadamente a praticamente não tóxicas à peixes e invertebrados e leve a moderadamente tóxicas para anfíbios.

O glifosato tem sido testado em algumas espécies de anfíbios que, coletivamente, representam menos de 0,2% das espécies existentes no mundo e, para se alcançar um conhecimento real dos impactos do glifosato, é necessário expandir informações gerais sobre os anfíbios, tanto taxonomicamente quanto geograficamente. Porém, quando testado em algumas espécies de anfíbios, em testes conduzidos principalmente sob condições laboratoriais e com girinos, estudos indicaram que o Roundup[®] pode ser altamente letal para anfíbios norte-americanos (RELYEA, 2005b).

Alguns produtos a base de glifosato possuem categorias de toxicidade I ou II para irritação ocular ou na pele. Na Califórnia, o glifosato apresenta uma elevada taxa de registros de doenças ou lesões nos trabalhadores, que relatam inúmeros casos de irritação nos olhos ou na pele durante a mistura do produto ou transporte. Por isso, é indicado o uso de equipamentos de proteção individual quando para a manipulação de produtos a base de glifosato (USEPA, 1993).

3.3 AGRICULTURA NO MUNICÍPIO DE POÇOS DE CALDAS – MG

Poços de Caldas - MG localiza-se na região sul do Estado de Minas Gerais, na divisa com o Estado de São Paulo, nas coordenadas 21°15'20"S e 46°33'55"W (LORENZO, 1991), na borda ocidental da Serra da Mantiqueira, fragmento de bioma Mata Atlântica. O município situa-se num planalto com área aproximada de 750 km², altitude média de 1300 m e campos suavemente ondulados. É rodeado de montanhas com altitudes entre 1600 m e 1800 m (PREFEITURA MUNICIPAL DE POÇOS DE CALDAS, 2011).

No município são observados impactos ambientais significantes associados à pecuária e à agricultura, que estão localizados próximos a cursos d'água. Dentre as principais culturas estão a do café e da batata.

O sistema de plantio direto ocupa hoje cerca de 25 milhões de hectares ou 50% da área plantada com culturas no Brasil. A adoção do cultivo direto pelos agricultores só foi possível através da utilização de agroquímicos, entre os quais o glifosato é o mais utilizado (YAMADA; CASTRO, 2014).

A utilização do glifosato é comum na prática agrícola, entretanto, devido ao uso inadequado dos equipamentos de aplicação, à falta de uma regulação adequada do mesmo e/ou aplicação em condições ambientais desfavoráveis, os danos provocados pelo agrotóxico podem se acentuar (DOMINGUES JÚNIOR, 2011).

No Relatório Técnico da Comissão das Águas (2012), realizado pela Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), Departamento Municipal de Eletricidade (DME), Departamento Municipal de Água e Esgoto (DMAE) e entregue à Prefeitura Municipal de Poços de Caldas, não foi detectado concentração acima do limite de compostos organofosforados. Foram realizadas coletas para análise da água em 21 pontos da cidade, porém o relatório não especifica se os pontos de coleta eram áreas adjacentes à áreas agrícolas.

A cultura da batata em Poços de Caldas apresenta grandes problemas de erosão, poluição por agrotóxicos e consumo elevado de água, devido às características do manejo (PMISBPPC, 2010).

O clima ameno faz da região do Sul de Minas uma região privilegiada ao cultivo da batata, possibilitando o plantio e colheita durante todo ano. Em 2006 foi cultivada por mais de 2 mil agricultores da região, ocupando uma área de 20 mil hectares, sendo responsável por mais de 100 mil empregos diretos (ALVARENGA, 2014).

Minas Gerais é hoje o maior produtor de café do Brasil. As condições topográficas irregulares do Sul de Minas favoreceu o cultivo dessa cultura, impróprias para outras culturas, e as características do Sul de Minas se adequaram perfeitamente às exigências da atividade cafeeira, sendo hoje a maior produtora de café do Estado (ANDRADE, 1994).

Em Poços de Caldas a cultura do café é a mais difundida e o glifosato é o agrotóxico mais utilizado, e de acordo com Domingues Júnior (2011), sua aplicação diretamente na

planta pode contaminar a deriva (“contato da molécula herbicida com organismo não alvo de sua aplicação”), ou seja, o composto, tendo ação não seletiva, pode afetar a própria cultura cafeeira pela deriva.

3.4 ANFÍBIOS ANUROS

De acordo com evidências fósseis de 400 milhões de anos, os anfíbios evoluíram a partir dos peixes, sendo os primeiros vertebrados a conquistarem a terra firme. O fóssil mais antigo de um anfíbio em sua forma atual data de cerca de 250 milhões de anos, encontrado em Madagascar e ficou conhecido como *Triadobatrachus* (WOEHL Jr.; WOEHL, 2008).

Os anfíbios são animais de sangue frio (exotérmicos), ou seja, utilizam a energia externa pra regular a temperatura do corpo. Ao contrário de animais de sangue quente, como aves e mamíferos, não precisam de grande quantidade de alimentos para gerar energia interna. São animais de extrema importância para o equilíbrio ecológico, uma vez que se alimentam de insetos e outros pequenos vertebrados e servem de alimento para muitas espécies de répteis, aves e mamíferos (WOEHL Jr.; WOEHL, 2008).

A palavra “anfíbio” origina-se do grego (*anfi*=duas e *bio*=vida) e significa vida dupla, sendo uma fase aquática e outra terrestre. A fase aquática é caracterizada pelo desenvolvimento larval, cujos girinos se desenvolvem até atingir a vida adulta, que se dá em terra. Enquanto girinos, os anfíbios possuem brânquias por onde respiram retirando o oxigênio disponível na água. Quando adultos, geralmente há o desenvolvimento de pulmões, e a respiração passa a ser pulmonar. Ambos utilizam a pele para auxiliar na respiração. (WOEHL Jr.; WOEHL, 2008).

São considerados como indicadores de estresse ambiental (bioindicadores) por terem contato com estressores tanto aquáticos (em sua forma larval e adulta) como atmosféricos e do solo (em sua forma adulta), e possuírem a pele permeável e ovos sem cascas que ficam diretamente expostos ao solo, água e luz solar. Compreendem a maior biomassa de vertebrados e contribuem significativamente para a dinâmica trófica em muitas comunidades, tanto como presa, quanto predador, sendo que o declínio de anfíbios anuros pode ter impactos importantes sobre outros organismos (BLAUSTEIN et al., 1994; BLAUSTEIN; KIESECKER, 2002).

Os girinos são menos conhecidos em relação aos pós-metamórficos, são menos visíveis e não possuem vocalização. Girinos de várias espécies de anuros ainda não foram descritos, o que dificulta ainda mais o estudo aprofundado destes organismos (McDIARMID; ALTIG, 1999).

A eclosão dos girinos ocorre a partir do estágio 20 da tabela de Gosner (1960) (Anexo A) e neste estágio os girinos ainda não possuem movimentos natatórios e se alimentam das suas reservas nutritivas (saco vitelínico). No estágio 25 ocorre a absorção total do saco vitelínico, encapsulação das brânquias e maturação de estruturas anatômicas utilizadas na captura do alimento. Nesta fase os girinos começam a se alimentar e movimentam-se livremente à procura de alimento (DUELLMAN; TRUEB, 1994; McDIARMID; ALTIG, 1999).

Os girinos alimentam-se raspando com os dentículos (FIGURA 2) existentes na boca materiais aderidos ao substrato e, com isso, liberam na água partículas de alimentos que serão posteriormente filtradas. A filtração é feita na medida em que aspiram a água, havendo a ingestão das partículas (DUELLMAN; TRUEB, 1986; McDIARMID; ALTIG, 1999).

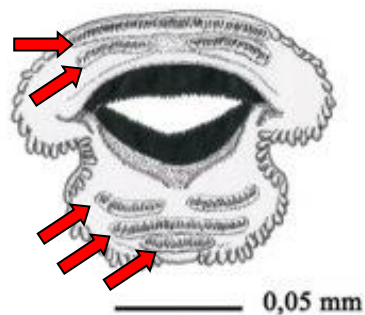


Figura 2 - Ilustração de cavidade oral de girino de *Physalaemus cicada* com fileiras de dentículos apontadas pelas setas vermelhas, sendo duas fileiras superiores (a segunda com um GAP – espaço entre uma única fileira) e três fileiras inferiores (sendo a primeira com um GAP).

Fonte: VIEIRA; ARZABE (2008, p.267)

Os girinos possuem características estruturais específicas que são ausentes nos adultos. O aparato oral é um exemplo, pois é uma estrutura presente apenas na fase larval dos anuros (DUELLMAN; TRUEB, 1994). As características principais do aparato oral são as papilas

labiais, as fileiras de dentículos e o bico córneo na abertura da cavidade oral. A presença destas estruturas, assim como o número, a densidade, o tamanho e a forma das mesmas, variam entre as espécies de girinos e está relacionado ao meio em que vivem e ao hábito alimentar (McDIARMID; ALTIG 1999). Alterações nas estruturas orais podem provocar uma redução na eficiência de forrageamento dos organismos, pois estas estruturas são fundamentais para que os girinos possam se alimentar.

Na metamorfose para a vida adulta, as alterações morfológicas são extremas: observa-se o desenvolvimento dos membros, a degeneração das brânquias, o desenvolvimento dos pulmões, a reabsorção da cauda, o desenvolvimento das glândulas dermais, desenvolvimento dos olhos, a formação da boca e da língua e a diferenciação do trato digestório, com um rearranjo dos órgãos na cavidade visceral, sendo uma das mudanças mais drásticas que ocorrem durante a metamorfose. Neste período ocorre uma acentuada diminuição do intestino, além do desenvolvimento do estômago, degeneração da região oral do girino para a formação da boca e desenvolvimento da língua (BAHIA, 2007).

Em muitas espécies as taxas de desenvolvimento e crescimento são fundamentais para a determinação de maturidade sexual. O tamanho do corpo também é a base para seleção intrasexual (competição entre os machos por uma fêmea) e intersexual (escolha de parceiro, geralmente pelas fêmeas) e muitas vezes determina o número máximo de ovos que a fêmea pode produzir. A diminuição da nutrição, como resultado de uma doença ou má formação, pode causar um desenvolvimento retardado e falhas reprodutivas. A exposição à poluentes ambientais pode causar falhas de desenvolvimento e reprodução, mesmo que em doses sub-letais, que não apresentem efeitos fisiológicos adversos e consequências sobre a saúde (HAYES et al., 2010).

A classificação dos anfíbios vem sofrendo constantes alterações, que envolvem desde proposição de novos grupos de espécies, gêneros e famílias a realocações de famílias, gêneros e espécies através de estudos recentes de algumas hipóteses filogenéticas, que ainda estão pouco suportadas. Além disso, muitas novas espécies estão sendo constantemente descritas, por isso há grandes lacunas de conhecimento em relação às espécies brasileiras (ROSSA-FERES et al., 2011).

3.4.1 Declínio de Anfíbios

A população de anfíbios está decrescendo globalmente em elevadas taxas e são diversas as causas citadas para tal declínio, tais como alterações ambientais causadas pelo homem (BLAUSTEIN; KIESECKER, 2002; BRUNELLI et al., 2009; TOLEDO et al., 2010; WOEHL Jr.; WOEHL, 2008), como fragmentação de habitat, mudanças climáticas, maior exposição à radiação ultravioleta, introdução de espécies exóticas e exposição à poluentes ambientais (BLAUSTEIN; KIESECKER, 2002; BRUNELLI et al., 2009; DAVIDSON et al., 2001; HAYES et al., 2010).

A taxa de declínio dos anfíbios é de pelo menos 211 vezes maior do que a predita pelo registro fóssil (BRUNELLI et al., 2009; TOLEDO et al., 2010), e tais declínios são ainda mais preocupantes quando ocorrem em regiões de alta riqueza e endemismos, como é o caso do Brasil, que possui o maior número de espécies de anfíbios, abrigando cerca de 17% da diversidade global e o maior número de espécies endêmicas do mundo (FROST, 2014; TOLEDO et al., 2010).

A perda da diversidade de anfíbios acarreta: a) Prejuízos na agricultura, visto que os anfíbios se alimentam de insetos e consomem uma grande quantidade destes animais por ano, proporcionando um equilíbrio ecológico e evitando surtos de pragas agrícolas; b) Acúmulo de matéria orgânica nos corpos d'água, já que os girinos se alimentam dessa matéria orgânica, auxiliando na redução da mesma nos reservatórios de água; c) prejuízo no abastecimento de água para a população e encarecimento do tratamento da mesma para consumo; d) desequilíbrio das redes tróficas, já que os anfíbios são a base de alimento de diversos organismos terrestres e aquáticos e se alimentam de uma diversidade muito grande de invertebrados, proporcionando controle ecológico, inclusive de insetos vetores de doenças; e e) prejuízos na indústria farmacêutica, pois muitos compostos químicos produzidos pelas glândulas cutâneas dos anfíbios estão sendo utilizadas para a produção de fármacos no Brasil e no mundo (CAMARGO, 2005; TOLEDO et al., 2010).

Há evidências de que as alterações climáticas globais influenciam no declínio dos anfíbios. Alterações na precipitação e temperatura afetam a fenologia (fenômenos periódicos de seres vivos em relação às condições ambientais) (BLAUSTEIN; KIESECKER, 2002).

Altas temperaturas associadas a altos índices pluviométricos podem antecipar o período reprodutivo de anfíbios anuros, assim como a ausência de chuva pode retardá-lo.

A radiação ultravioleta (UV-B) induz efeitos subletais que podem afetar o crescimento e desenvolvimento, comportamento, fisiologia e anatomia dos anfíbios (BLAUSTEIN; KIESECKER, 2002).

Evidências sugerem que o declínio de anfíbios em todo mundo está relacionado com o uso de agrotóxicos (RELYEA, 2005a). Estudos de impacto subletal de agroquímicos em populações de anfíbios são escassos, apesar do uso de xenobióticos (sozinhos ou associados a outros fatores) ser considerado, nas últimas décadas, o principal fator responsável pelo declínio de anfíbios (DAVID et al., 2012; LAVORATO et al., 2013).

De acordo com Hayes et al. (2010), agrotóxicos e misturas de compostos químicos podem atrasar e/ou inibir a metamorfose dos anfíbios, e a completa inibição da metamorfose irá impactar negativamente a reprodução.

A redução na riqueza de espécies, redução das populações e alta incidência de deformidades tem sido relatadas em áreas de plantio (agroecossistemas), que pode ter relação com o uso indiscriminado e intensivo de compostos químicos (BRUNELLI et al., 2009, RELYEA, 2005a). Isso indica que os anfíbios podem ser sensíveis à exposição a contaminantes, sendo bons bioindicadores para monitoramento da qualidade da água (BESTEN; MUNAWAR, 2005).

Há várias razões pelas quais os anfíbios são sensíveis à contaminação de ambientes aquáticos, entre elas o desenvolvimento das larvas de anfíbios até sua vida adulta ser regulado por hormônios, que podem ser afetados por compostos que promovem a desregulação endócrina, além de dispenderem parte de suas vidas na água, estando assim expostos a contaminantes presentes na água e por sua capacidade de absorver compostos químicos através da pele (BESTEN; MUNAWAR, 2005).

Muitas espécies usam em parte de seu ciclo de vida lagoas temporárias e pequenos cursos d'água adjacentes às áreas agrícolas, onde os agrotóxicos são aplicados, e muitas vezes estas aplicações coincidem com o período reprodutivo e desenvolvimento larval (DAVID et al., 2012; HAYES et al., 2010; HOWE et al., 2004). A contaminação de corpos d'água próximos à área de agricultura geralmente aumenta durante a estação chuvosa, período de reprodução da maioria das espécies de anfíbios. Então, é possível que os anfíbios possam

ser gravemente afetadas pelos resíduos da agricultura principalmente na estação chuvosa, que pode carregar poluentes presentes no solo para corpos d'água através de uma forte chuva. Estes poluentes podem estar dissolvidos na água ou associados ao solo ou a partículas minerais (DAVID et al., 2012; WALKER et al., 2006).

De acordo com Walker et al. (2006), as principais rotas de absorção de poluentes orgânicos por anfíbios anuros são a alimentação e a pele, através dos poluentes dissolvidos ou suspensos na água. Após a absorção, a substância é transportada para diferentes compartimentos do corpo através do sangue e da linfa (no caso de vertebrados). O movimento dentro dos tecidos e órgãos pode ser por difusão entre as barreiras de membranas.

No Brasil há pouca informação sobre os efeitos dos agrotóxicos em espécies de anfíbios. Estes animais tornam-se altamente vulneráveis à contaminação química devido sua pele bastante permeável, além da reprodução e dos estágios larvais dependerem do ambiente aquático, o que pode resultar em efeitos significativos nos indivíduos e nas populações de anfíbios (HAYES et al., 2010; SILVA et al., 2013).

Porém, de acordo com Hayes et al. (2010), uma única causa não explica o declínio dos anfíbios, sendo importante considerar as interações entre vários fatores. Alguns declínios locais podem apresentar causas individuais, porém na maioria das vezes os declínios e extinções são provocados por interações entre dois ou mais fatores. Os declínios de anfíbios podem variar espacial e temporalmente, sendo os cinco principais fatores as mudanças atmosféricas, poluentes ambientais, modificação de habitats, espécies invasoras e patógenos, agindo muitas vezes em sinergia entre eles (BLAUSTEIN et al., 1994; BLAUSTEIN; KIESECKER, 2002; HAYES et al., 2010).

Em estudos com *Rana sylvatica* por exemplo, Relyea (2005a) concluiu que a adição do estresse predatório fez o agrotóxico Roundup® apresentar um efeito duas vezes mais letal do que quando utilizado sozinho, comprovando o potencial sinérgico de diferentes fatores.

3.5 ESPÉCIES ESTUDADAS

As espécies estudadas neste trabalho foram *Physalaemus cuvieri* (Família Leptodactylidae) e *Rhinella icterica* (Família Bufonidae). Este tópico traz um pouco das principais características destas espécies.

3.5.1 *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leptodactylidae)

Physalaemus cuvieri (Fitzinger, 1826), também conhecida como rã-cachorro (FIGURA 3), é uma espécie de pequeno porte (CRCm = 28,9 mm; variação de 24 a 39 mm) presente em quase todo o território brasileiro (MIJARES et al., 2010).



Figura 3 - *Physalaemus cuvieri* (Fitzinger, 1826) adulto.
Fonte: Adaptado de Gaiga (2014)

Possui um padrão de coloração dorsal bem variado, desde quase uniformemente marrom a padrões de mosaico marrons simetricamente complexos. Possuem nas pernas padrões de faixas e braços levemente listrados (HEYER et al. 1990).

Possui ampla distribuição, sendo conhecida no sul, sudeste, nordeste e região central do Brasil (FIGURA 4), além da Argentina e Paraguai (MIJARES et al., 2010; HERPETO.ORG, 2014). Segundo Mijares et al. (2010), uma espécie foi listada como sendo *P. cuvieri* vinda de El Manteco, na Venezuela, porém a identificação desta espécie necessita

ainda de maiores investigações. É considerada uma espécie pouco preocupante em relação à conservação, devido a sua ampla distribuição geográfica, tolerância em uma ampla gama de habitats e regiões e população estável (MIJARES et al., 2010)



Figura 4 - Distribuição de *Physalaemus cuvieri*
Fonte: IUCN, 2013

É uma espécie de hábitos noturnos, que ocorre em diversos habitats, incluindo áreas abertas, pastos e florestas. Sua reprodução ocorre em poças, temporárias ou permanentes, geralmente em áreas abertas. Os ovos são depositados em ninhos de espuma flutuante (FIGURA 5) presos à vegetação marginal das poças (CONDEZ et al., 2009).



Figura 5 - Desovas de espuma de *Physalaemus cuvieri*
Fonte: Da autora

De acordo com Silva et al. (2013), os corpos d'água utilizados por *P. cuvieri* para reprodução e desenvolvimento são semelhantes aos corpos d'água associados às áreas agrícolas, deixando os girinos desta espécie expostos a possíveis contaminações por agrotóxicos.

Os girinos são pequenos e possuem corpo oval e focinho arredondado em visão dorsal; possuem o dorso e musculatura da cauda marrom claros, com pequenas manchas pretas dispersas, e ventre despigmentado (HEYER et al., 1990) (FIGURA 6). Possuem cavidade oral com padrão 2(2)/3(1) (FIGURA 7), e vivem no fundo dos corpos d'água alimentando-se de matéria orgânica (CONDEZ et al., 2009).

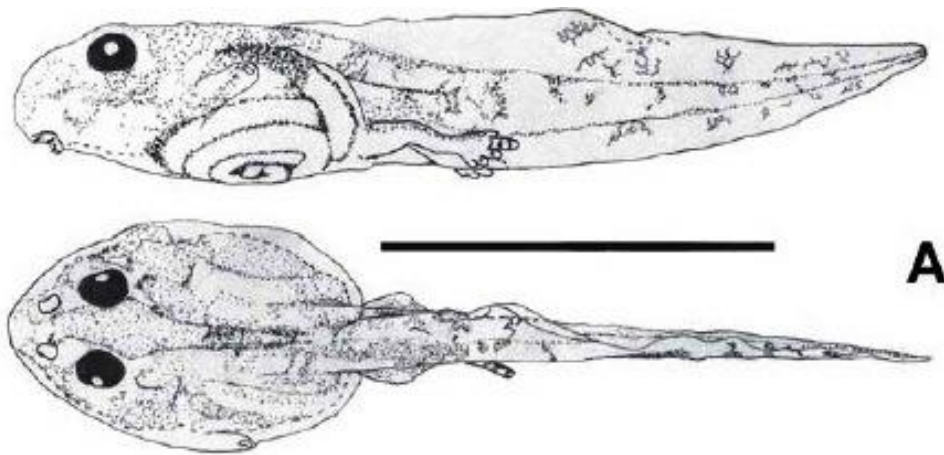


Figura 6 - Girino de *Physalaemus cuvieri* em visão lateral e dorsal, respectivamente

Fonte: ROSSA-FERES; NOMURA (2006, p. 20)



Figura 7 - Cavidade oral padrão 2(2)/3(1)
de *P. cuvieri*

Fonte: ROSSA-FERES; NOMURA (2006, p.24).

A espécie *Physalaemus cuvieri* constitui bom modelo para avaliação da suscetibilidade de espécies nativas por se tratar de uma espécie abundante e de ampla distribuição geográfica no Brasil (SILVA et al., 2013).

Para maiores detalhes sobre a morfologia externa de *Physalaemus cuvieri*, tanto indivíduos adultos, quanto girinos, ver Heyer et al. (1990), páginas 312 e 313. A vocalização da espécie está disponível no site http://vertebrates.si.edu/herps/frogs_boraceia/calls4.htm.

3.5.2 *Rhinella icterica* (Anura, Bufonidae)

Rhinella icterica (Spix, 1824), também conhecida como sapo cururu ou sapo boi (FIGURA 8) é uma espécie da família Bufonidae com ampla distribuição, sendo encontrada em mais de um bioma, ocorrendo em áreas florestadas e também em fisionomias abertas, desde o sul e sudeste do Brasil até o norte da Argentina e Leste do Paraguai (FIGURA 9) (SILVANO, 2010).



Figura 8 - *Rhinella icterica* macho (a esquerda) e fêmea (a direita)
 Fonte: HERPETO.ORG (2015)



Figura 9 - Distribuição de *Rhinella icterica*.
 Fonte: IUCN, 2014.

Devido sua ampla distribuição é listado como pouco preocupante. Esta espécie é muito comum em áreas antropizadas, mas têm hábitos florestais (HERPETO.ORG, 2015).

São animais de grande porte, sendo as fêmeas bege-pardo claras com padrão regular de manchas escuras no dorso e os machos cinza-amarelados. Possuem cristas cefálicas

pronunciadas, grandes glândulas paratóides e pele com muitas verrugas (HERPETO.ORG, 2015).

A reprodução se dá em riachos e em água parada, como lagoas e poças. Os machos vocalizam próximos ou dentro da água principalmente à noite. A desova se dá de Agosto a Janeiro, em grandes cordões gelatinosos com milhares de ovos escuros (FIGURA 10). Os girinos são pequenos, livre-nadantes, permanecem em congregações e se alimentam de matéria em suspensão e na superfície de pedras e plantas submersas (HERPETO.ORG, 2015).



Figura 10 - Desova de cordão de *Rhinella icterica* em ambiente lântico.

Fonte: Da autora

Os girinos são pequenos e possuem corpo oval em vista dorsal e focinho arredondado em visão dorsal. Possuem a coloração escura e cavidade oral com padrão 2(2)/3, assim como a espécie *Rhinella schneideri* (FIGURA 11).

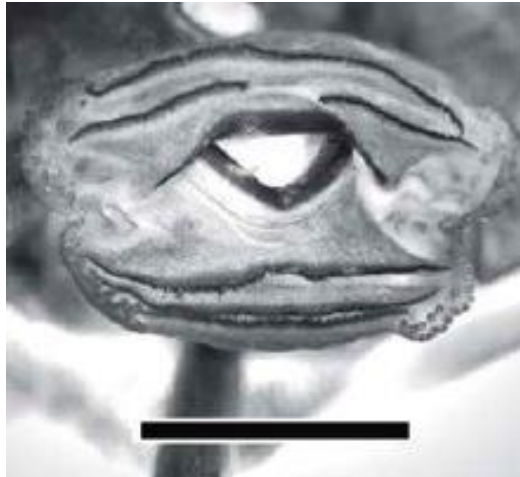


Figura 11 - Cavidade oral padrão 2(2)/3 de *Rhinella schneideri*.

Fonte: ROSSA-FERES; NOMURA (2006, p. 22).

4 METODOLOGIA

Este item apresenta as metodologias utilizadas para as análises realizadas no presente estudo.

4.1 TESTE DE TOXICIDADE AGUDA

Os testes de toxicidade aguda foram realizados de acordo com o Guia Padrão para realização de Testes de Toxicidade Aguda da ASTM (2002).

Foram coletadas desovas, pois de acordo com o item 10.2 do guia (p. 9), todos os organismos submetidos aos testes devem ter tamanhos e idade semelhantes, e no caso dos anfíbios anuros, as larvas jovens devem ser utilizadas sempre que possível. Embora apenas no estágio 25 de desenvolvimento as larvas comecem a se alimentar (GOSNER, 1960) e já estejam no período de serem submetidas aos tratamentos, a orientação é de que sejam alimentadas pelo menos uma vez ao dia antes de iniciar os tratamentos, para que os organismos tenham estrutura para um funcionamento normal.

As desovas foram coletadas e imediatamente levadas ao laboratório, onde foram colocadas em bandejas de plástico com capacidade para 16 litros (FIGURA 12), previamente desinfetadas, contendo 4 litros de água de clorificada (coletadas no Fontanário do Monjolinho)

cada. Pouca água de campo foi adicionada às bandejas, para que os girinos eclodissem na mesma água em que fossem submetidos aos tratamentos.

Cada bandeja foi areada com compressor de ar de aquário por 24h/dia, onde as larvas eclodiram. Ficaram sob tais condições até atingirem o estágio 25 de desenvolvimento, segundo Gosner (1960) (para mais informações sobre os estágios de desenvolvimento de larvas de anfíbios anuros consultar o Anexo A). Os girinos foram alimentados com ração comercial para peixe (Alcon Basic) quando atingiram o estágio 25 de desenvolvimento.

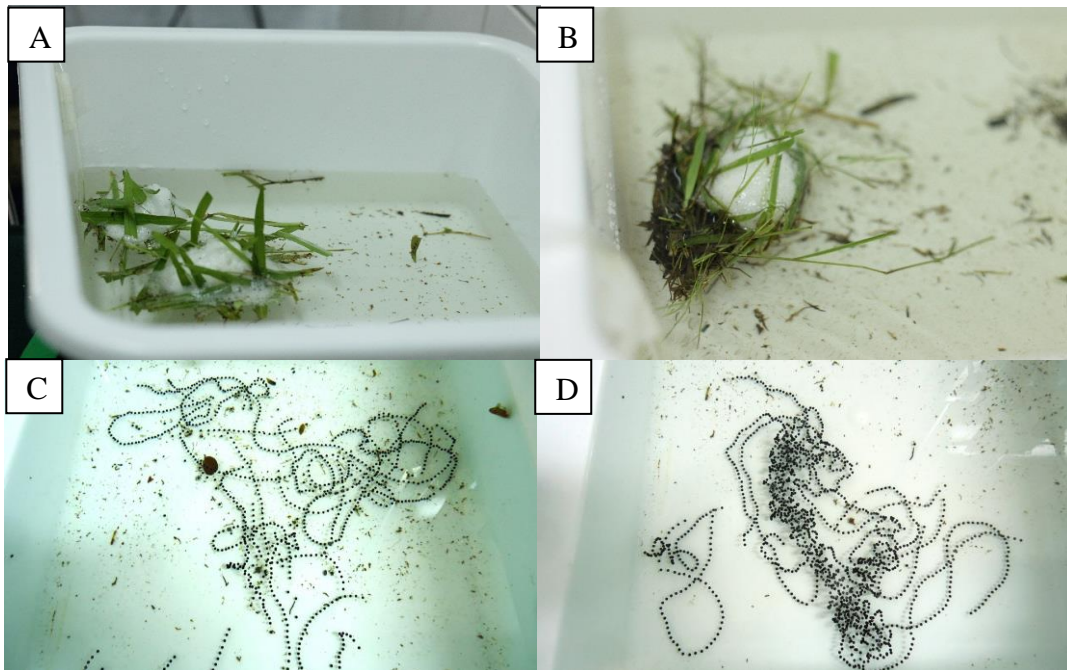


Figura 12 - Disposição das desovas de *Physalaemus cuvieri* (A e B) e de *Rhinella icterica* (C e D) nas bandejas em laboratório.

Fonte: Da autora

Para preparação dos experimentos foi realizada uma solução mãe de 1000 ppm em concentração nominal. Para avaliar a sensibilidade das espécies e definir as concentrações a serem utilizadas nos tratamentos foi realizado um teste piloto com cada espécie para determinar a menor concentração de glifosato que fosse letal para 100% dos indivíduos em 48 horas de exposição. A menor concentração letal apresentada nos testes piloto foi determinada como concentração máxima utilizada nos tratamentos, reduzindo igualmente em cinco até chegar ao tratamento controle (que foi realizado sem adição do agrotóxico). Os experimentos foram realizados em 48h e 96h.

Para cada unidade experimental cinco girinos foram aleatoriamente transferidos das bandejas para potes de vidro contendo 1 litro de água decolorificada + a concentração da solução mãe em seus respectivos tratamentos (totalizando as cinco diferentes concentrações, específicas para cada espécie). Durante o período experimental os animais não foram alimentados. A presença de mortalidade foi registrada diariamente e os animais mortos foram retirados, registrados e fixados em mistura de 50% Álcool 70% e 50% Formol a 15%. Os animais que sobreviveram a cada tempo experimental foram fixados em seus respectivos tempos e tratamentos para análises posteriores. Quatro réplicas foram realizadas para cada grupo de tratamento e controle.

Todos os materiais utilizados foram limpos de acordo com o guia padrão da ASTM (2004), lavados com detergente assim que finalizado cada teste, deixado de molho em água sanitária (100 ml para cada 1 litro), enxaguado com água de torneira e enxaguado novamente com água destilada por duas vezes, para que o mesmo material pudesse ser utilizado para as duas espécies submetidas aos tratamentos.

A permissão de coleta, transporte e manutenção temporária dos animais descritos neste projeto foi concedida pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), órgão do Ministério do Meio Ambiente (MMA), Autorização 41955-1, de 17 de Novembro de 2013, e os experimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Alfenas (protocolo 23087.006836/2013-33, de 10 de Setembro de 2013).

4.2.1 *Physalaemus cuvieri*

Foram coletadas três desovas de *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leptodactylidae) em poças temporárias no município de Poços de Caldas – MG, no Parque Municipal Antônio Molinari, no dia 10 de Dezembro de 2013, às 10h40. As desovas foram transportadas em sacos plástico e diretamente levadas ao laboratório.

Todo experimento foi conduzido em ciclos de luz-escuro de 12/12 horas, temperatura da água mantida em $20^{\circ}\text{C} \pm 2$, pH na faixa de $6,0 \pm 0,8$ e OD na faixa de $6,0 \text{ mg/l} \pm 1,5$. Os parâmetros de qualidade da água (temperatura, pH e OD) foram medidos em cada período

experimental. Foi utilizado o software Vernier (Logger Lite versão 1.4) para medições de OD e Temperatura.

Para *Physalaemus cuvieri* houve renovação da água e seus respectivos tratamentos no tempo de 72 horas, pois de acordo com Walker (2006) a água deve ser renovada constantemente devido à adsorção do composto ou à presença de excrementos que podem influenciar a resposta dos indivíduos. As análises de *Physalaemus cuvieri* foram realizadas nos tempos de 48h e 96h nos dias 31/12/2013 e 02/01/2014, respectivamente.

4.2.2 *Rhinella icterica*

Uma única desova de *Rhinella icterica* (Anura, Bufonidae) foi coletada em poça permanente no município de Poços de Caldas – MG, no Recanto Japonês, no dia 22 de Outubro de 2014, às 12h30. As desovas foram transportadas em sacos plástico e diretamente levadas ao laboratório.

Todo experimento foi conduzido em ciclos de luz-escuro de 12/12 horas, temperatura da água mantida em $21^{\circ}\text{C} \pm 0,5$, pH na faixa de $6,5 \pm 0,5$ e OD na faixa de $6,0 \text{ mg/l} \pm 0,9$. Os parâmetros de qualidade da água (temperatura, pH e OD) foram medidos em cada período experimental. Foi utilizado o programa Logger Lite versão 1.4 para medições de OD e Temperatura.

Para *Rhinella icterica* não houve renovação da água durante o experimento pois de acordo com a ASTM (2002) não é necessário renovação de água nos testes de toxicidade aguda. As análises de *R. icterica* foram realizadas nos tempos de 48h e 96h nos dias 05/11/2014 e 07/11/2014, respectivamente.

4.3 EFEITOS SUBLETAIS

Para avaliação dos efeitos subletais foram realizadas análise do comportamento natatório e análises morfológicas através de análises estatísticas.

4.3.1 Análise de comportamento natatório

Alterações nas respostas comportamentais foram registradas em todos os tempos experimentais (48h e 96h), agitando a água com um bastão de vidro suavemente por 5 segundos até formar um redemoinho, e observando por um minuto a atividade de natação de cada organismo em seu respectivo tratamento (DAVID et al., 2012).

As mudanças comportamentais avaliadas foram relacionadas à natação dos girinos. Foram analisados o nado normal, quando o animal nadava normalmente e ativamente contra a corrente criada, e o nado afetado, quando o animal nadava um pouco contra a corrente e se deixava levar por ela por tempo superior ao do nado, nadava com o corpo na lateral ou fora do padrão e quando havia paralisia na natação e o animal se deixava levar por completo contra a corrente criada.

4.3.2 Análises morfológicas

Tanto as análises de medidas quando as análises de anormalidades foram realizadas com os animais fixados que sobreviveram aos tratamentos nos tempos de 48h e 96h. Não foram realizadas análises de anormalidades nos animais mortos.

Para avaliação de malformações foi utilizada lupa LEICA S8APO, onde foram realizadas as imagens em câmera de vídeo digital LEICA DFC295, e foram avaliadas a posição caudal (corpo), a condição do intestino (quando visível) e a cavidade oral.

Para avaliação de comprimento dos girinos foi utilizado papel milimetrado (1mm x 1mm) abaixo da placa de petri, devido ao pequeno tamanho dos animais e a dificuldade de utilizar paquímetro digital nestas condições. Para pesagem foi utilizada balança digital modelo AY220 com precisão de 0,0001g. O excesso de água dos girinos foi retirado com papel antes da pesagem.

Todos os indivíduos que sobreviveram aos tratamentos foram fixados em solução de 50% álcool 70% e 50% formol 15%, para facilitar o manuseio dos girinos nas análises morfológicas.

4.3.3 Análises Estatísticas

Os valores de LC50 para 48h e 96h de exposição foram calculados utilizando o software Trimmed Spearman-Kaber Method, versão 1.5 (TSK, 1991).

Para análise dos dados foram utilizados modelos lineares generalizados (GLM) ajustados à distribuição adequada dos dados. Todas as análises foram realizadas utilizando o software R 3.11 (R CORE TEAM, 2014).

5 RESULTADOS

Neste item serão apresentados os resultados obtidos nos testes de toxicidade e nas análises comportamentais e morfológicas dos girinos de *Physalaemus cuvieri* e *Rhinella icterica*.

5.1 TESTE DE TOXICIDADE

Foram realizados testes de toxicidade aguda em girinos de *Physalaemus cuvieri* e *Rhinella icterica*:

5.1.1 *Physalaemus cuvieri*

O projeto piloto realizado para avaliar a sensibilidade de *Physalaemus cuvieri* foi realizado nos dias 25 e 26 de Dezembro de 2013, com 4 réplicas contendo 5 girinos em cada (totalizando 20 girinos/concentração), e a menor concentração letal para todos os indivíduos em 48 horas de exposição foi de 16,0 mg/L de solução mãe. A concentração foi reduzida até chegar ao controle, e assim os girinos foram submetidos à 5 diferentes concentrações + controle, sendo assim as concentrações utilizadas foram 3,19 mg/L, 6,36 mg/L, 9,51 mg/L, 12,64 mg/L e 15,75 mg/L (C1, C2, C3, C4 e C5, respectivamente).

Para o controle, seguido das 5 concentrações, no tempo de 48 horas a mortalidade foi de 0, 1, 6, 20, 20 e 20 indivíduos (totalizando 0%, 5%, 30%, 100%, 100% e 100%, respectivamente) e no tempo de 96 horas a mortalidade foi de 0, 1, 5, 17, 20 e 20 indivíduos (totalizando 0%, 10%, 25%, 85%, 100% e 100%, respectivamente), conforme mostra o Gráfico 1.

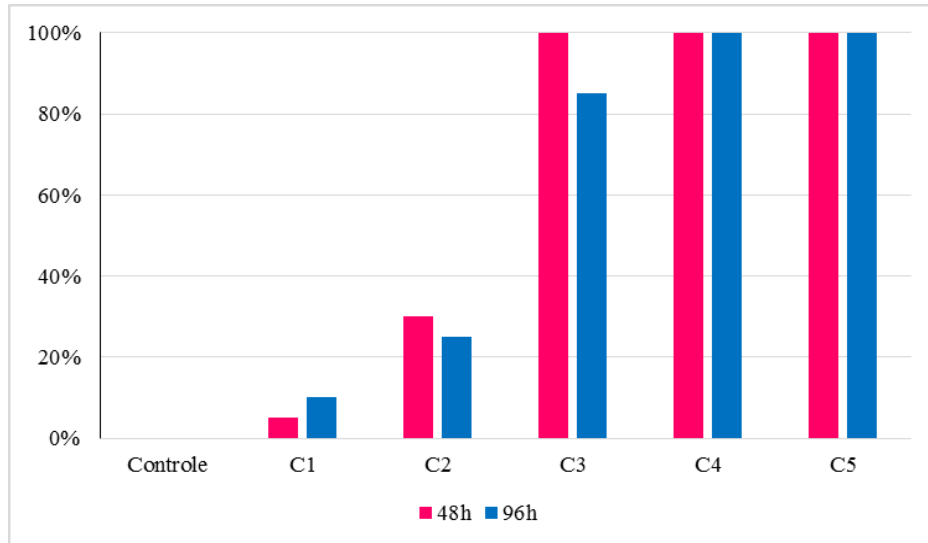


Gráfico 1 - Mortalidade de girinos de *Physalaemus cuvieri* nos tempos de 48 e 96 horas.

Fonte: Da autora

Em 48h todos os indivíduos de C3 já haviam morrido, enquanto sobreviveram 3 indivíduos na mesma concentração em 96h, alcançando a mortalidade 100% somente em C4.

A LC50 calculada para o tempo de 48 horas foi de 6,61 mg/L (5,81 mg/L a 7,53 mg/L) e de 7,12 mg/L (6,21 mg/L a 8,16 mg/L) para o tempo de 96 horas (GRÁFICO 2).

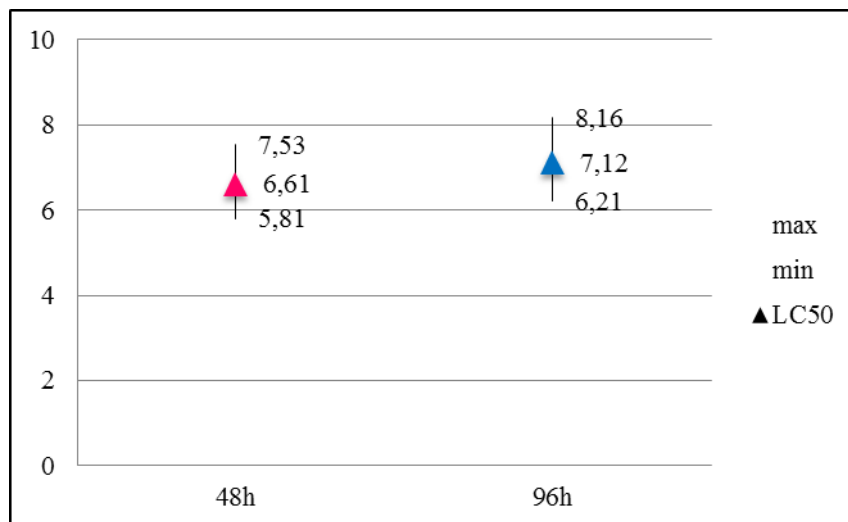


Gráfico 2 - LC50 e níveis de variação ($p \leq 0.05$) de *Physalaemus cuvieri* nos tempos de 48 e 96 horas.

Fonte: Da autora

5.1.2 *Rhinella icterica*

O projeto piloto realizado para avaliar a sensibilidade de *Rhinella icterica* foi realizado nos dias 03 e 04 de Novembro de 2014, com 4 réplicas contendo 5 girinos em cada (totalizando 20 girinos/concentração), e a menor concentração letal para todos os indivíduos em 48 horas de exposição foi de 24,39 mg/L de solução mãe. A concentração foi reduzida até chegar ao controle, e assim os girinos foram submetidos à 5 diferentes concentrações + controle, sendo assim as concentrações utilizadas foram 4,97 mg/L, 9,90 mg/L, 14,78 mg/L, 19,61 mg/L e 24,39 mg/L (C1, C2, C3, C4 e C5, respectivamente).

Para o controle, seguido das 5 concentrações, no tempo de 48 horas a mortalidade foi de 0, 0, 0, 9, 19 e 20 indivíduos (totalizando 0%, 0%, 0%, 45%, 95% e 100%, respectivamente) e no tempo de 96 horas a mortalidade foi de 0, 0, 5, 17, 20 e 20 indivíduos (totalizando 0%, 0%, 25%, 85%, 100%, 100%, respectivamente), conforme mostra o Gráfico 3.

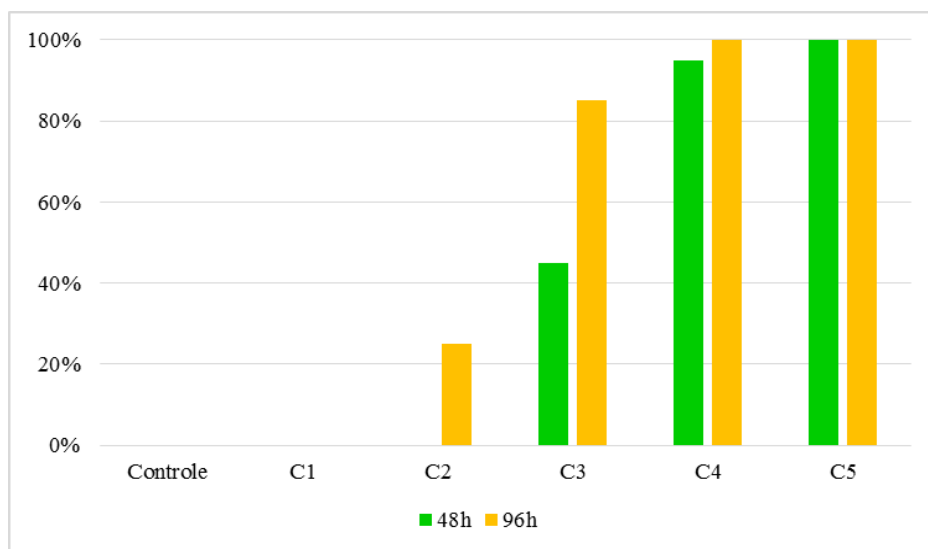


Gráfico 3 - Mortalidade de girinos de *Rhinella icterica* nos tempos de 48 e 96 horas.

Fonte: Da autora

A mortalidade no tempo amostral de 48h iniciou em C3 e atingiu 100% em C4, enquanto no tempo amostral de 96h mais de 20% dos indivíduos já haviam morrido em C2, atingindo 100% em C4.

A LC50 calculada para o tempo de 48 horas foi de 14,78 mg/L (13,65 mg/L a 16,01 mg/L) e de 11,11 mg/L (9,97mg/L a 12,68mg/L) para o tempo de 96 horas (GRÁFICO 4).

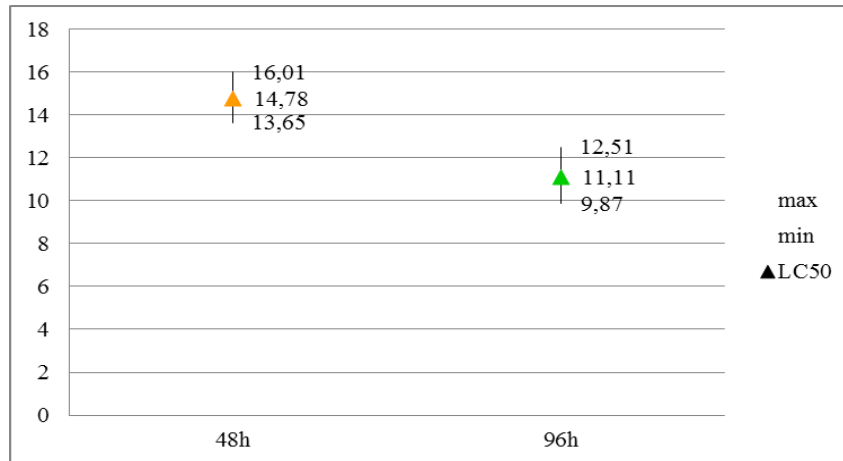


Gráfico 4 - LC50 e níveis de variação ($p \leq 0.05$) de *Rhinella icterica* nos tempos de 48 e 96 horas.

Fonte: Da autora

5.1.3 *Physalaemus cuvieri* x *Rhinella icterica*

O Gráfico 5 ilustra a LC50 e níveis de variação ($p \leq 0.05$) de *Physalaemus cuvieri* e *Rhinella icterica* nos tempos amostrais de 48h e 96h para traçar um comparativo entre as espécies amostradas.

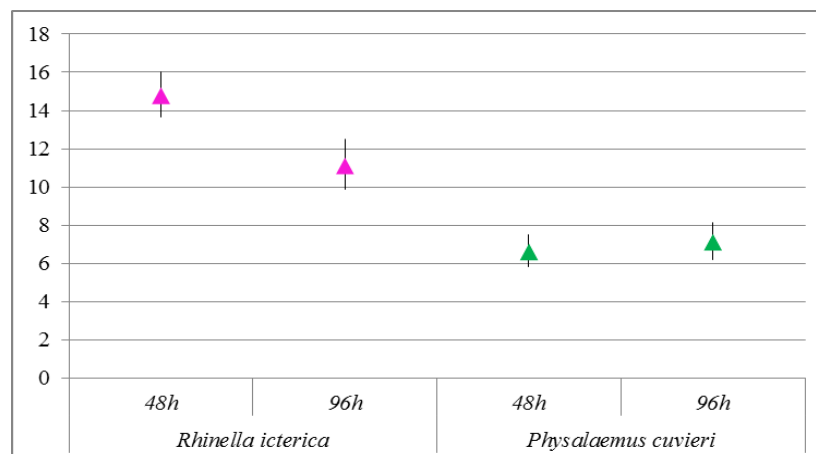


Gráfico 5 - LC50 em 48h e 96h de *Rhinella icterica* (à esquerda) comparada à LC50 de *Physalaemus cuvieri* nos mesmos tempos amostrais (à dir.).

Fonte: Da autora

5.2 ANÁLISE DE COMPORTAMENTO NATATÓRIO

Assim como as avaliações toxicológicas, as análises comportamentais foram realizadas em 48 e 96 horas. Para avaliações de comportamento foram registrados quantos indivíduos, dos que permaneceram vivos, apresentaram nado normal e nado afetado (nado cansado, nado torcido ou imobilidade no nado).

5.2.1 *Physalaemus cuvieri*

Pode-se perceber que houve uma redução na frequência de nado normal em relação ao Controle conforme as concentrações aumentavam nos dois tempos amostrais. No tempo de 48h, 80% dos indivíduos do Controle apresentaram comportamento de nado normal, porém em C2 (maior concentração onde permaneceram girinos vivos para análises de comportamento), apenas 43% dos indivíduos apresentaram comportamento de nado normal.

Em 96h, apenas 10% dos indivíduos do Controle apresentaram nado afetado, enquanto 87% dos indivíduos apresentaram comportamento afetado em C2. Em C3 sobreviveram apenas 3 indivíduos, e 2 deles apresentaram comportamento afetado e 1 apresentou comportamento normal.

Os Gráficos 6 e 7 ilustram a frequência do comportamento dos girinos de *Physalaemus cuvieri* nos tempos de 48h e 96h, respectivamente, nas concentrações de Roundup Original® onde houve sobreviventes para análise. A barra nas colunas significa a variância de erro padrão a 5%, para mais e para menos.

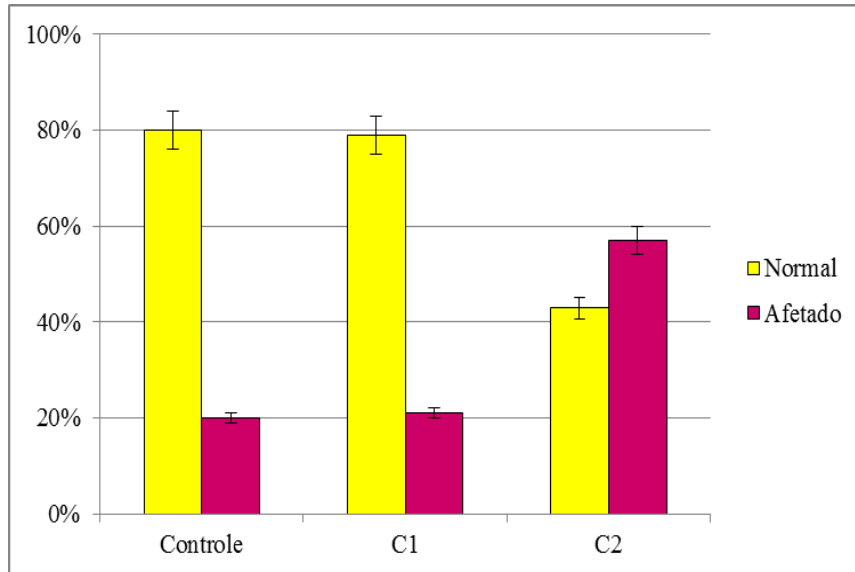


Gráfico 6 - Frequência de comportamento Normal e Afetado de *Physalaemus cuvieri* nas concentrações de Roundup Original® e Controle no tempo de 48 horas. Não houve avaliação em C3, C4 e C5, pois todos os indivíduos já haviam morrido no teste de toxicidade aguda.

Fonte: Da autora

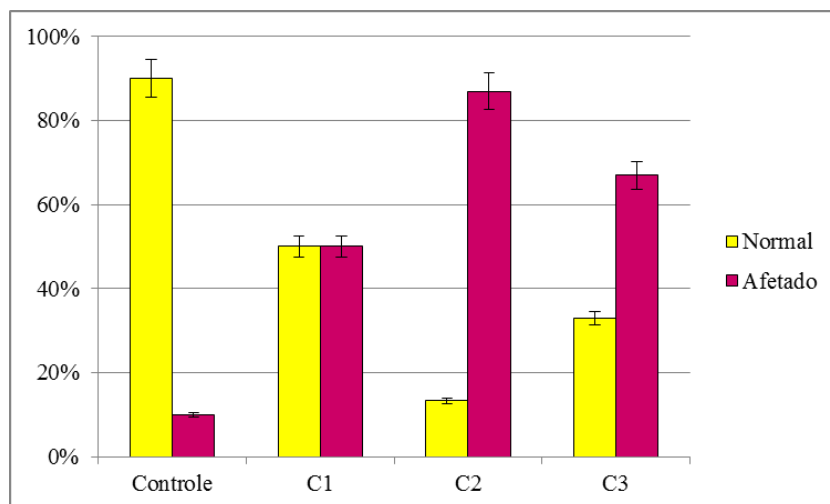


Gráfico 7 - Frequência de comportamento Normal e Afetado de *Physalaemus cuvieri* nas concentrações de Roundup Original® e Controle no tempo de 96 horas. Não houve avaliação em C4 e C5, pois todos os indivíduos já haviam morrido no teste de toxicidade aguda.

Fonte: Da autora

O Gráfico 8 ilustra as comparações entre os diferentes tempos amostrais para o comportamento natatório afetado. Observa-se que há uma redução na frequência de comportamento normal e um aumento do comportamento afetado em ambos os tempos até C2. A barra nas colunas significa a variância de erro padrão a 5%, para mais e para menos.

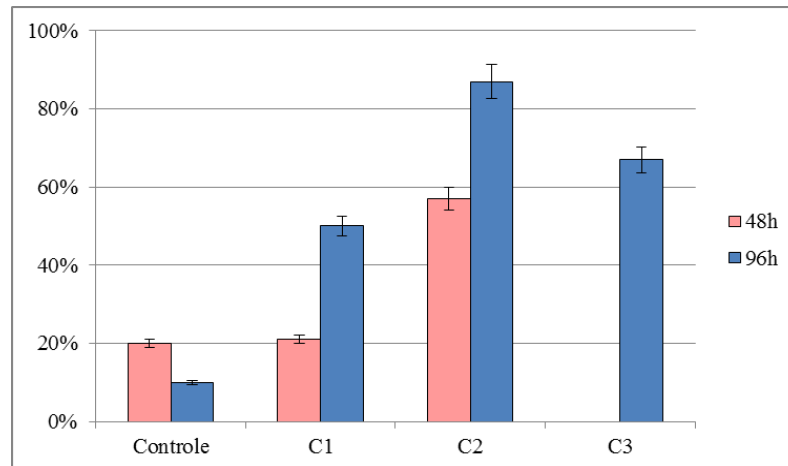


Gráfico 8 - Frequência de girinos de *Physalaemus cuvieri* que apresentaram comportamento afetado nas concentrações de Roundup Original® e Controle nos tempos de 48h e 96h. Não foram realizadas avaliações em C4 e C5, pois todos os indivíduos já haviam morrido no teste de toxicidade aguda.

Fonte: Da autora

Não houve diferença significativa em relação ao comportamento afetado e o aumento da concentração no tempo de 48 horas ($p=0.2935$ e $F= 1.2527$). Em 96 horas houve uma diferença significativa em relação ao nado errático e às concentrações ($p < 0.001$ e $X^2= 83.335$), onde C1 e C2 se mostraram iguais estatisticamente, diferindo de C3 e Controle, que se mostraram iguais entre si (GRÁFICO 9).

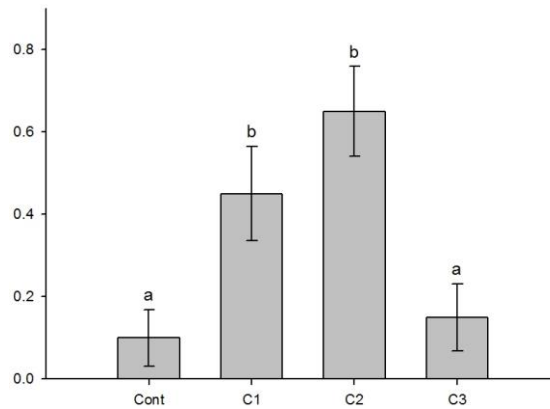


Gráfico 9 - Relação de Comportamento Afetado (média de frequência) em relação aos Tratamentos de *Physalaemus cuvieri* no tempo amostral de 96h.

Fonte: Da autora

5.2.2 *Rhinella icterica*

Na análise de comportamento natatório de *Rhinella icterica* os indivíduos de C1 apresentaram maior frequência de comportamento de nado normal em relação ao Controle, sem adição do agroquímico e houve maior incidência de comportamento normal em C2 do que em C1 em 48h. Porém, neste tempo amostral, os indivíduos de C3 apresentaram maior frequência de alteração comportamental em relação à C2. Em 96 horas houve uma redução na frequência de comportamento normal em C2 em relação à C1.

Os Gráficos 10 e 11 ilustram a resposta comportamental dos girinos de *Rhinella icterica* nos tempos de 48h e 96h, respectivamente, nas concentrações de Roundup Original® e Controle. A barra nas colunas significa a variância de erro padrão a 5%, para mais e para menos.

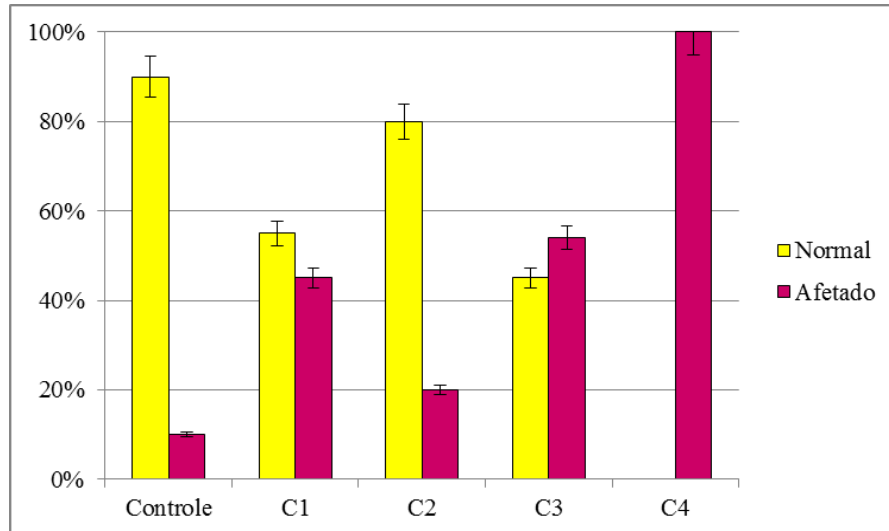


Gráfico 10 - Frequência de comportamento Normal e Afetado de *Rhinella icterica* nas concentrações de Roundup Original® e Controle em 48 horas.

Fonte: Da autora

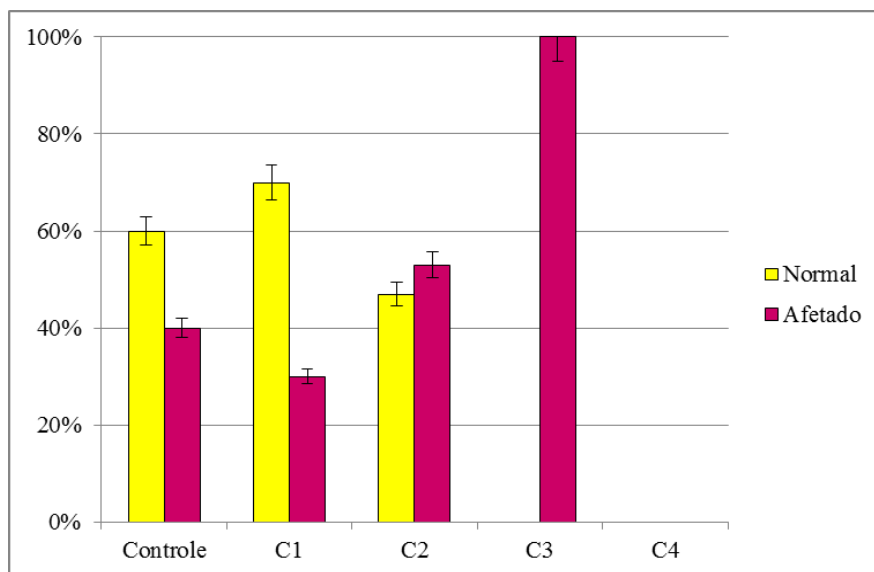


Gráfico 11 - Frequência de comportamento Normal e Afetado de *Rhinella icterica* nas concentrações de Roundup Original® e Controle em 96 horas.

Fonte: Da autora

Não houve avaliação em C4 e C5, pois todos os indivíduos já haviam morrido no teste de toxicidade aguda. Não foi observada uma relação linear para os comportamentos normais e afetados nos tempos de 48h e 96h em relação ao aumento das concentrações, conforme esperado, porém observou-se um aumento na frequência de comportamento afetado nas

maiores concentrações em ambos os tempos amostrais. A barra nas colunas significa a variância de erro padrão a 5%, para mais e para menos (GRÁFICO 12).

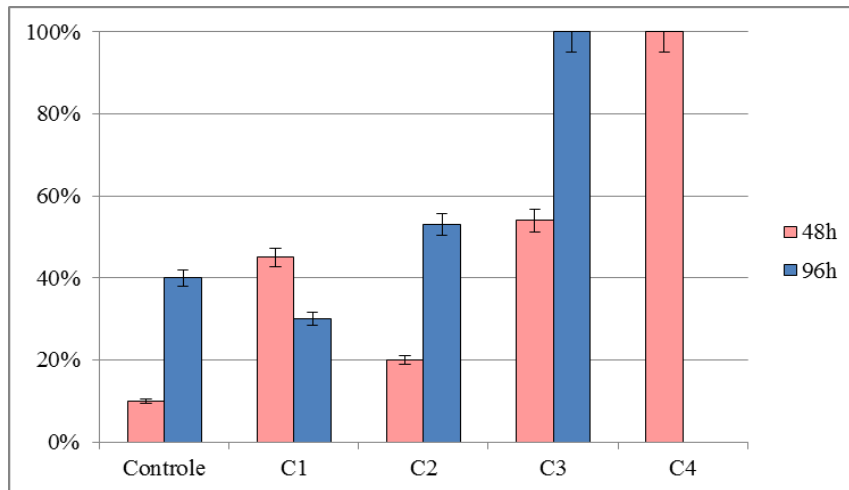


Gráfico 12 - Porcentagem de girinos de *Rhinella icterica* que apresentaram comportamento afetado nas concentrações de Roundup Original® e Controle em 48h e 96. Não foram realizadas avaliações em C5, pois todos os indivíduos já haviam morrido no teste de toxicidade aguda em ambos os tempos amostrais.

Fonte: Da autora

Para *Rhinella icterica* houve diferença significativa em relação ao comportamento afetado e o aumento da concentração no tempo de 48 horas ($p=0.01423$ e $X^2= 92.92$). Em 96 horas não houve diferença significativa entre o comportamento afetado e os tratamentos ($p=0.2208$ e $F=1,5511$). Apenas C1 se mostrou diferente significativamente, e Controle, C2, C3 e C4 se mostraram iguais estatisticamente (GRÁFICO 13).

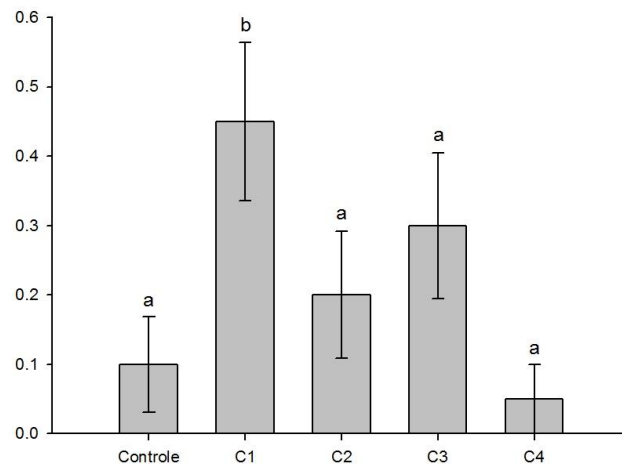


Gráfico 13 - Relação de Comportamento Afetado (média de frequência) em relação aos Tratamentos de *Rhinella icterica* no tempo amostral de 48h.

Fonte: Da autora

5.2.3 *Physalaemus cuvieri* x *Rhinella icterica*

Physalaemus cuvieri apresentou diferença significativa em relação ao comportamento afetado e o aumento da concentração no tempo de 96 horas, enquanto *Rhinella icterica* apresentou tal diferença significativa no tempo de 48 horas. Com os resultados obtidos não foi possível traçar uma relação das alterações comportamentais entre as espécies.

5.3 ANÁLISES MORFOLÓGICAS

Foram avaliados os girinos sobreviventes aos tratamentos, pois a inserção caudal alterada e/ou cauda torta podem alterar a mobilidade do animal e com isso deixa-lo suscetível ao ambiente em que está inserido; a cavidade oral quando alterada pode prejudicar a alimentação dos girinos e com isso afetar a sua capacidade de sobrevivência. De acordo com Bahia (2007), o intestino de girinos herbívoros e onívoros apresentam longos comprimentos, dispostos em dupla espiral ocupando a maior parte da cavidade visceral, e a malformação desse órgão pode comprometer o desenvolvimento adequado dos animais. Todos os indivíduos submetidos às análises morfológicas foram medidos e pesados.

5.3.1 *Physalaemus cuvieri*

A Figura 13 ilustra o padrão considerado normal de girinos de *Physalaemus cuvieri* em relação ao corpo e posição caudal.

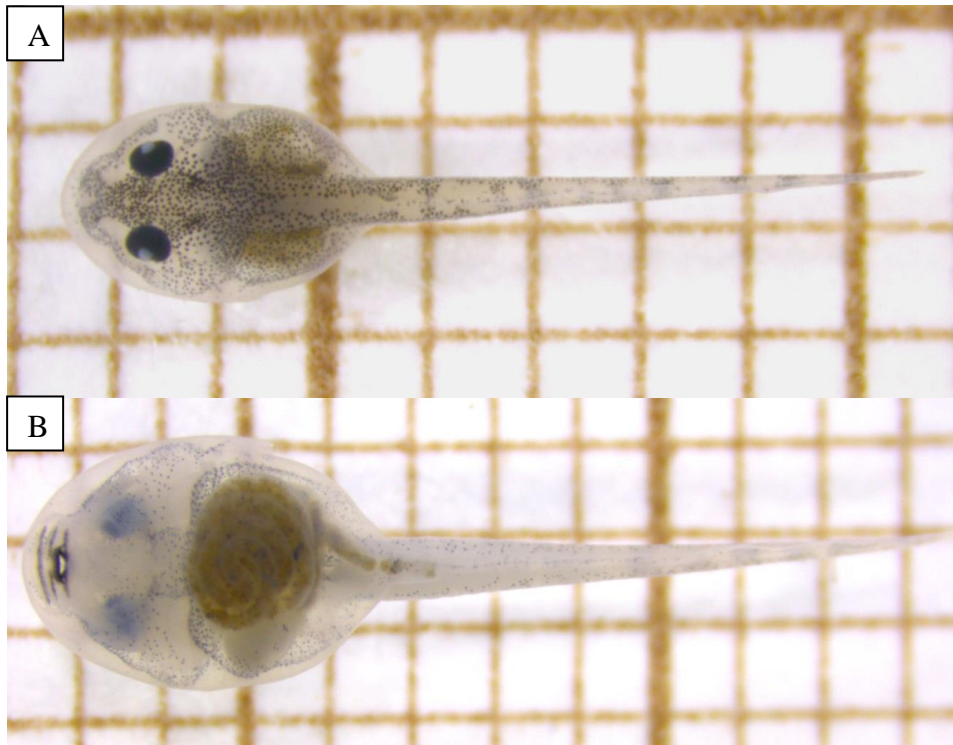


Figura 13 - Corpo e inserção caudal em visão dorsal (A) e ventral (B) de girino de *Physalaemus cuvieri* do tratamento controle considerado normal (padrão) para análise comparativa dos outros indivíduos

Fonte: Da autora

A Figura 14 ilustra o intestino considerado padrão de *P. cuvieri*, enquanto a Figura 15 ilustra a cavidade oral em perfeito estado.

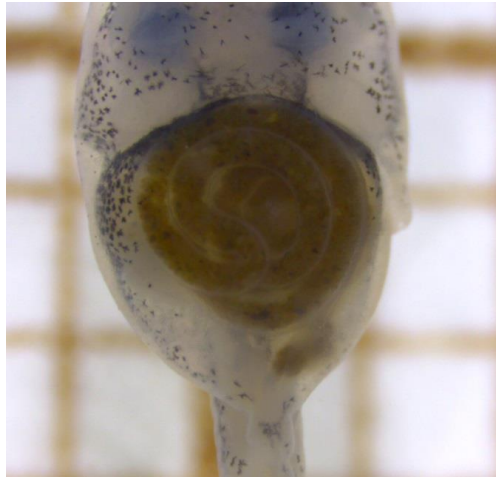


Figura 14 - Intestino de girino de *Physalaemus cuvieri* do tratamento controle considerado normal (padrão) para análise comparativa dos outros indivíduos

Fonte: Da autora

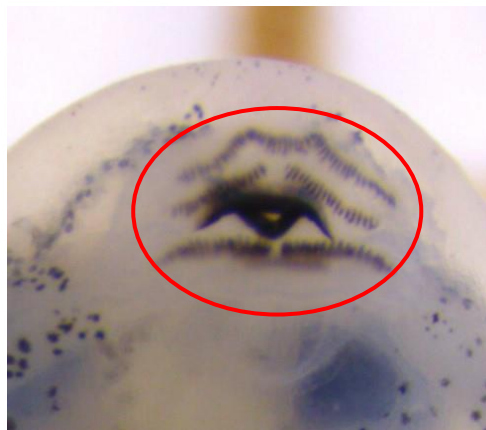


Figura 15 - Cavidade oral de girino de *Physalaemus cuvieri* (padrão 2(2)/3(1)) do tratamento controle considerado normal (padrão) para análise comparativa dos outros indivíduos

Fonte: Da autora

Physalaemus cuvieri apresentou uma pequena diferença na frequência de indivíduos que sofreram alterações morfológicas entre o Controle e C1 no tempo de 48h, sendo que 70% dos indivíduos do Controle foram considerados dentro do padrão normal e 64% dos indivíduos de C1 foram considerados normais. Houve uma redução para 57% dos indivíduos considerados normais em C2. A barra nas colunas significa a variância de erro padrão a 5%, para mais e para menos (GRÁFICO 14).

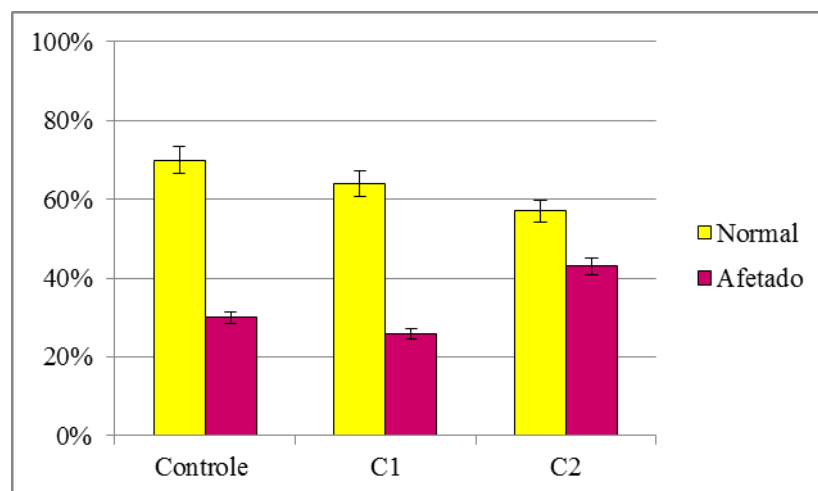


Gráfico 14 - Resposta dos indivíduos de *Physalaemus cuvieri* nas análises morfológicas no tempo de 48h, apresentando alguma malformação (afetado) ou não (normal). Não foram realizadas análises morfológicas nas concentrações a partir de C3 pois todos os indivíduos já haviam morrido no experimento de toxicidade aguda.

Fonte: Da autora

Nas avaliações no tempo amostral de 48 horas, em relação à cavidade oral, 67%, 100% e 67% dos indivíduos do Controle, C1 e C2, respectivamente, apresentaram malformações. Apenas os indivíduos do Controle apresentaram intestino fora do padrão considerado normal, totalizando 17% e apenas os indivíduos de C2 apresentaram corpo com inserção caudal fora de padrão, totalizando 17%. A única alteração em conjunto apresentada neste tempo amostral foi observada no intestino + inserção caudal, no Controle e C2, ambos com 16% de frequência. A barra nas colunas significa a variância de erro padrão a 5%, para mais e para menos (GRÁFICO 15).

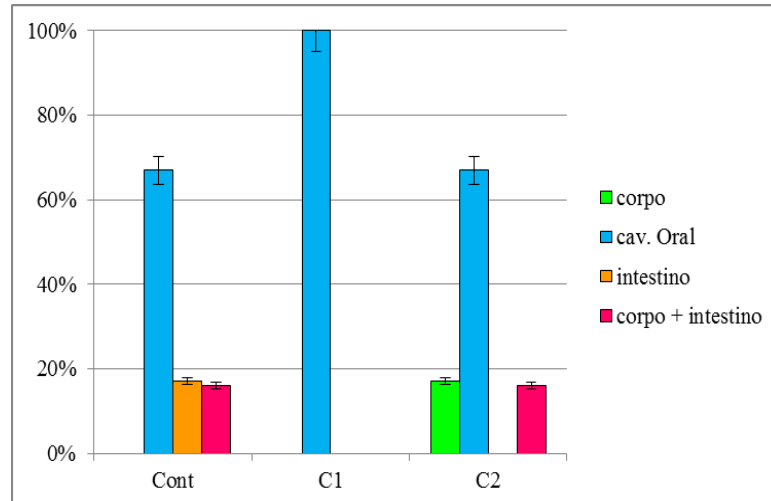


Gráfico 15 - Tipos de malformações apresentadas pelos indivíduos em 48h de exposição ao Roundup Original® e suas respectivas frequências nas concentrações C1 e C2 e Controle. Não foram realizadas análises morfológicas nas concentrações a partir de C2 pois todos os indivíduos já haviam morrido no experimento de toxicidade aguda.

Fonte: Da autora

Não houve diferença estatística significativa entre ao aumento das concentrações de Roundup Original® em relação às análises morfológicas de cavidade oral, inserção caudal e posição do intestino realizada no tempo de 48 horas (inserção caudal ($p=0.3147$ e $F= 1.18$), posição intestinal ($p= 0.1381$ $F= 2.0505$) e cavidade oral ($p=0,9139$ e $F= 0.9139$)).

Também não houve diferença estatística significativa do peso dos indivíduos em relação à concentração ($p=0.07898$ e $F= 2.6551$) em 48h, porém a diferença foi significativa para o tamanho dos indivíduos ($p= 0.04786$ e $F= 3.2074$), onde o Controle se mostrou diferente de C1 e C2, que são estatisticamente iguais (GRÁFICO 16)

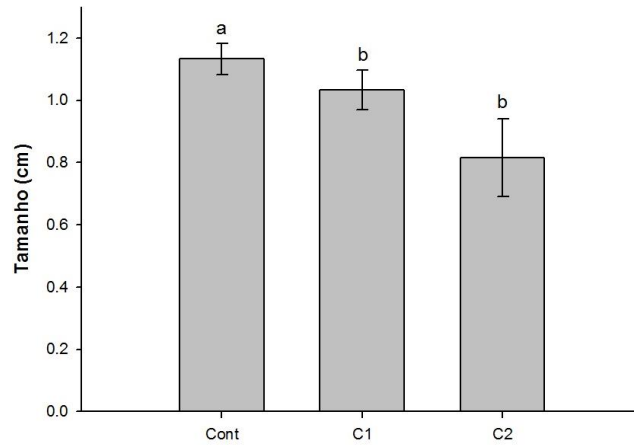


Gráfico 16 - Relação do Comprimento dos indivíduos de *Physalaemus cuvieri* em relação aos tratamentos no tempo amostral de 48h.

Fonte: da autora

Em 96h a porcentagem de indivíduos que não apresentaram alterações morfológicas reduziu a 0% na maior concentração analisada (C3), sendo 50%, 50%, 13% e 0% em Controle, C1, C2 e C3, respectivamente (GRÁFICO 17). Não houve diferença de frequência entre o Controle e C1, sendo que metade dos indivíduos de ambos os tratamentos apresentaram alguma má formação e outra metade não. A barra nas colunas significa a variância de erro padrão a 5%, para mais e para menos.

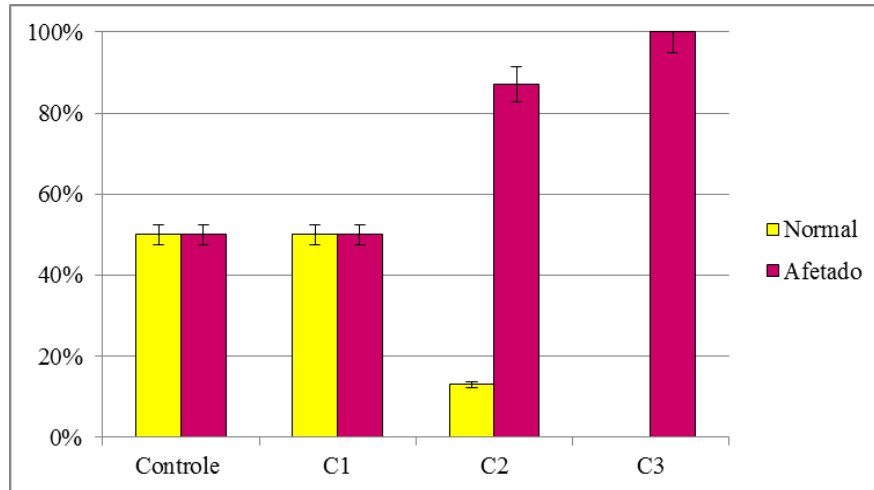


Gráfico 17 - Resposta dos indivíduos de *Physalaemus cuvieri* nas análises morfológicas no tempo amostral de 96h, apresentando alguma malformação (afetado) ou não (normal). Não foram realizadas análises morfológicas nas concentrações a partir de C3 pois todos os indivíduos já haviam morrido no experimento de toxicidade aguda.

Fonte: Da autora

As avaliações de malformações no tempo amostral de 96 horas apresentaram maior frequência de interação entre os fatores avaliados do que apresentado em 48h, onde houve interação apenas da alteração morfológica da posição caudal + intestino fora de padrão. Observou-se que, assim como em 48h, houve uma incidência maior na alteração morfológica da cavidade oral dos girinos de *P. cuvieri*, onde 50%, 34%, 39% e 34% dos indivíduos do Controle, C1, C2 e C3, respectivamente, apresentaram malformações na cavidade oral. Apenas os indivíduos de C3 não apresentaram intestino fora do padrão considerado normal (GRÁFICO 18).

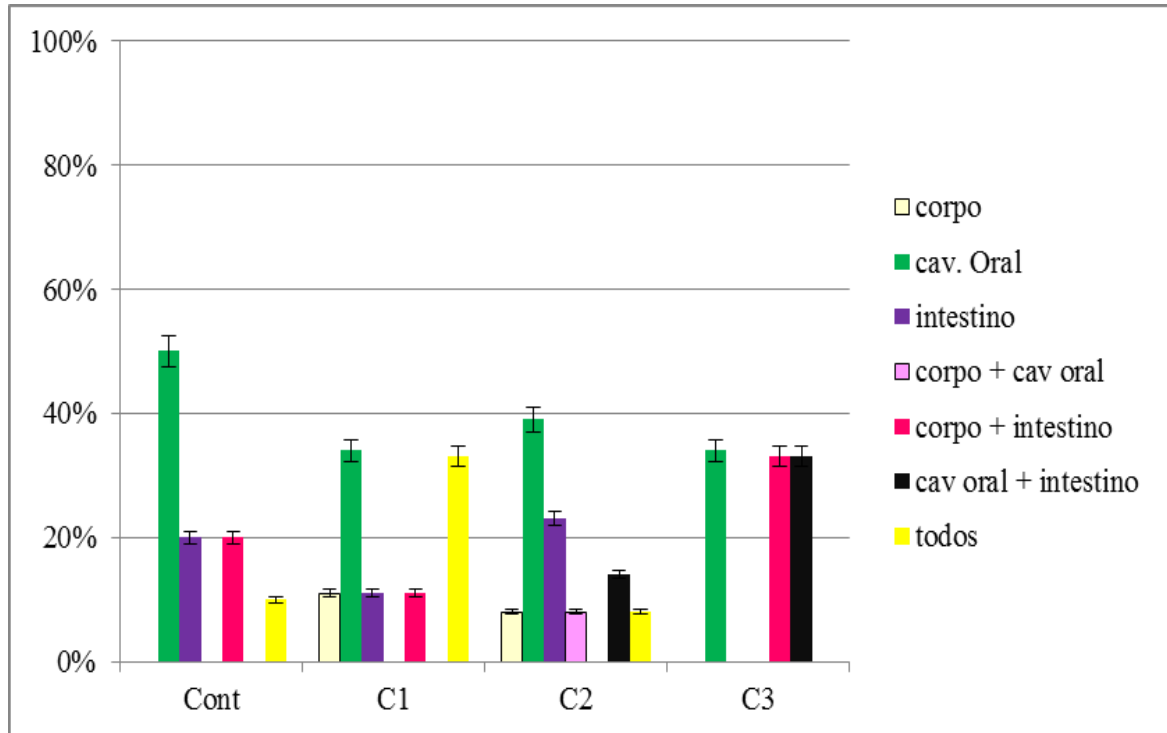


Gráfico 18 - Tipos de malformações e interações apresentadas pelos indivíduos em 96h de exposição ao Roundup Original® e suas respectivas frequências nas concentrações C1, C2, C3 e Controle. Não foram realizadas análises morfológicas nas concentrações a partir de C3 pois todos os indivíduos já haviam morrido no experimento de toxicidade aguda.

Fonte: Da autora

No tempo amostral de 96 horas não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos e malformação na inserção caudal ($p=0.2921$ e $X^2=70.466$) e na posição intestinal ($p= 0.693$ $X^2=83.852$). Porém houve diferença significativa em relação aos tratamentos e a cavidade oral ($p<0.01$ e $X^2= 83.73$), sendo que C3 se mostrou diferente estatisticamente do que Controle, C1 e C2, que são iguais (GRÁFICO 19)

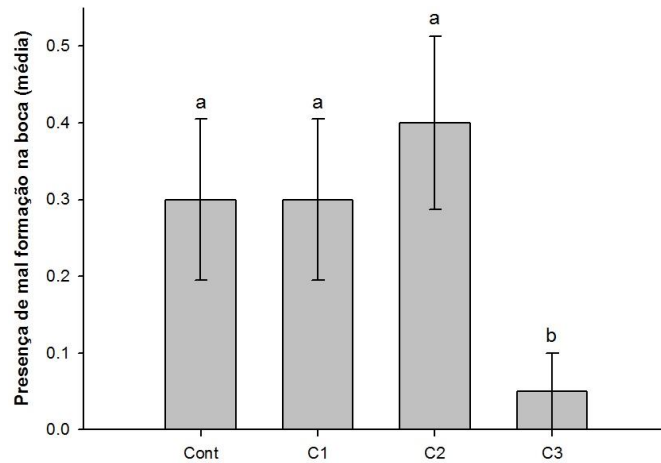


Gráfico 19 - Relação de malformação da cavidade oral de *Physalaemus cuvieri* em relação aos tratamentos em 96 horas.

Fonte: Da autora

Para *Physalaemus cuvieri* em 96 horas houve diferença significativa tanto no peso quanto no comprimento dos indivíduos, sendo C3 se mostrou estatisticamente diferente de Controle, C1 e C2 em ambas variáveis (GRÁFICO 20)

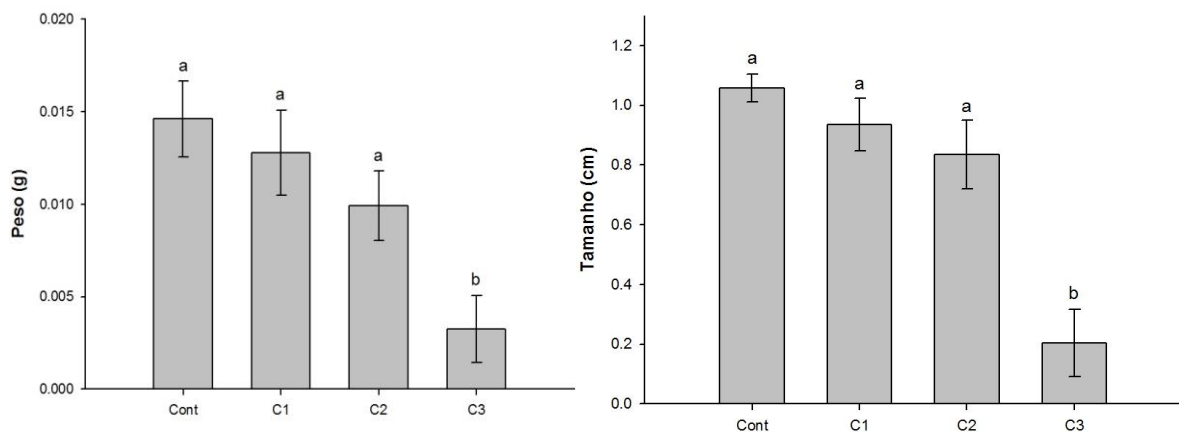


Gráfico 20 - Relação de Peso e Comprimento de girinos de *Physalaemus cuvieri* em relação aos Tratamentos em 96 horas.

Fonte: Da autora

As figuras a seguir mostram exemplos de malformações detectadas em relação ao formato do corpo e inserção caudal (FIGURA 16) e cavidade oral, cujos dentículos estavam ausentes ou a mandíbula sem completa formação (FIGURA 17).

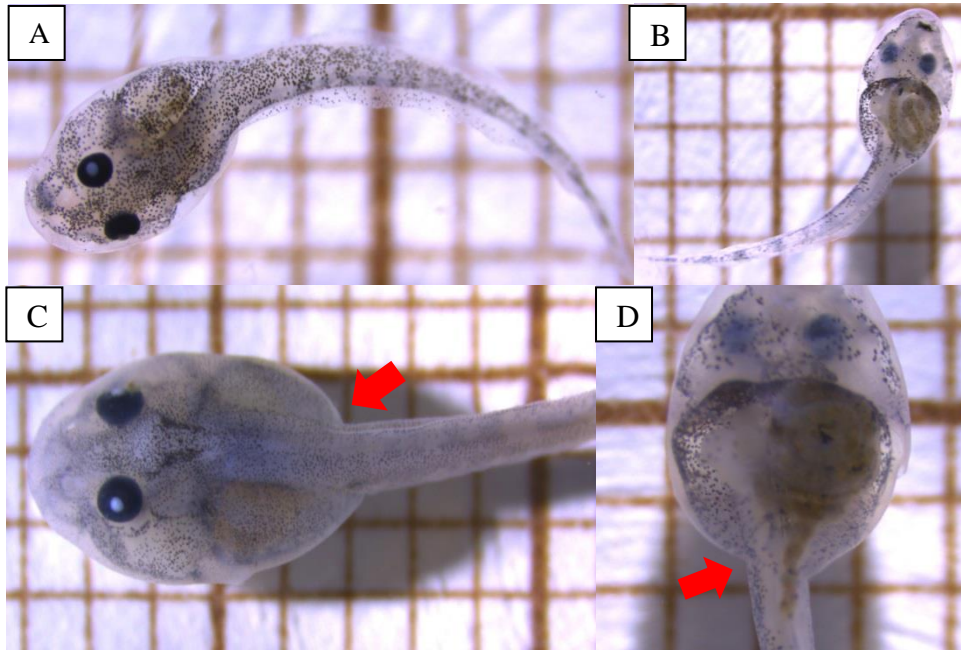


Figura 16 – *P. cuvieri* considerados fora de padrão em relação ao corpo:
 A) Corpo em posição dorsal de girino de *P. cuvieri* considerada fora do padrão;
 B) Inserção caudal, intestino e cavidade oral em posição ventral considerada fora do padrão;
 C) Inserção caudal considerada fora do padrão (seta);
 D) Intestino e Inserção caudal (seta) considerados fora do padrão.
 Fonte: Da autora

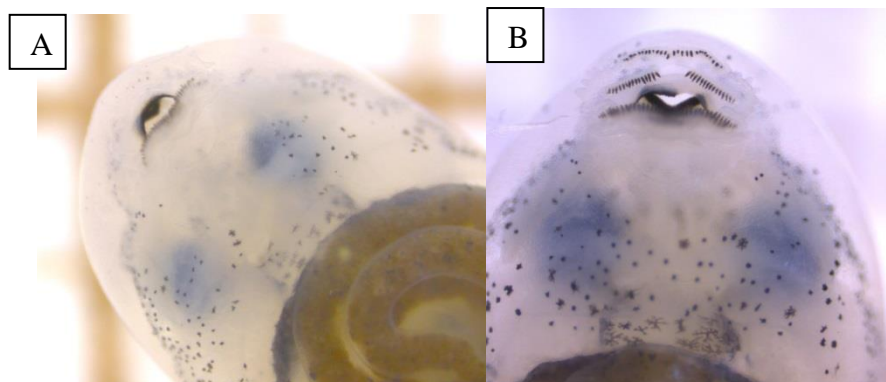


Figura 17 - *P. cuvieri* considerados fora de padrão em relação à cavidade oral:
 A) Cavidade oral de *Physalaemus cuvieri* com denticulos falhos ou ausentes;
 B) Cavidade oral com má formação da mandíbula superior.
 Fonte: Da autora

Nos girinos considerados com malformação no intestino, foi observada a proeminência do fígado e espiral mal formada (FIGURA 18).

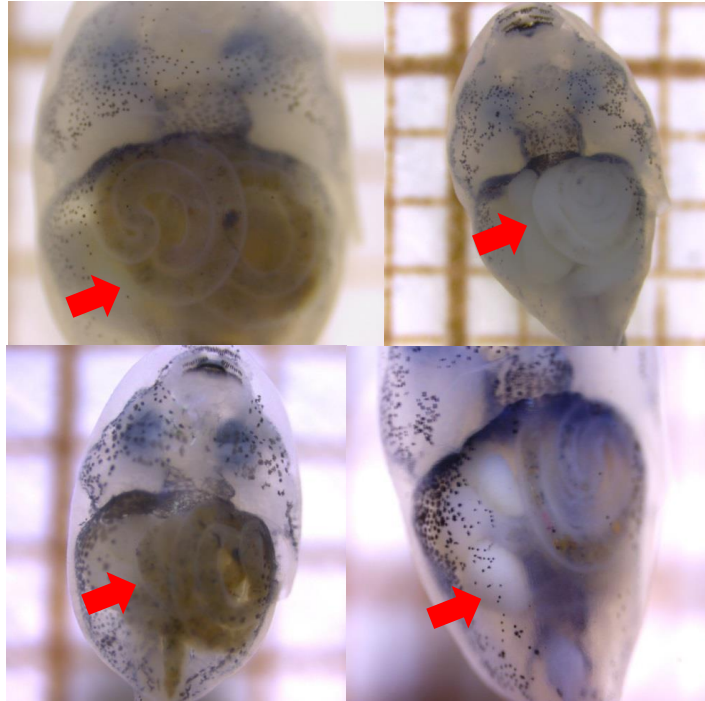


Figura 18 - Intestinos de girinos de *Physalaemus cuvieri* com padrões alterados da dupla espiral, considerados não padrão e proeminência do fígado (setas).

Fotos: Da autora

Foi observado também o que o intestino dos girinos de *Physalaemus cuvieri*, principalmente daqueles submetidos às maiores concentrações, ficou completamente vazio ou com aparência esbranquiçada (Figura 19B), o que pode ter alguma relação com o efeito produzido pelo agrotóxico. Não foi analisada a frequência com que isso ocorreu.

Mesmo não sendo realizadas análises morfológicas em animais mortos nos experimentos de toxicidade, pode-se observar que as características dos girinos mortos foram: a) alteração na coloração do animal e b) extrusão intestinal, conforme mostra a Figura 19.

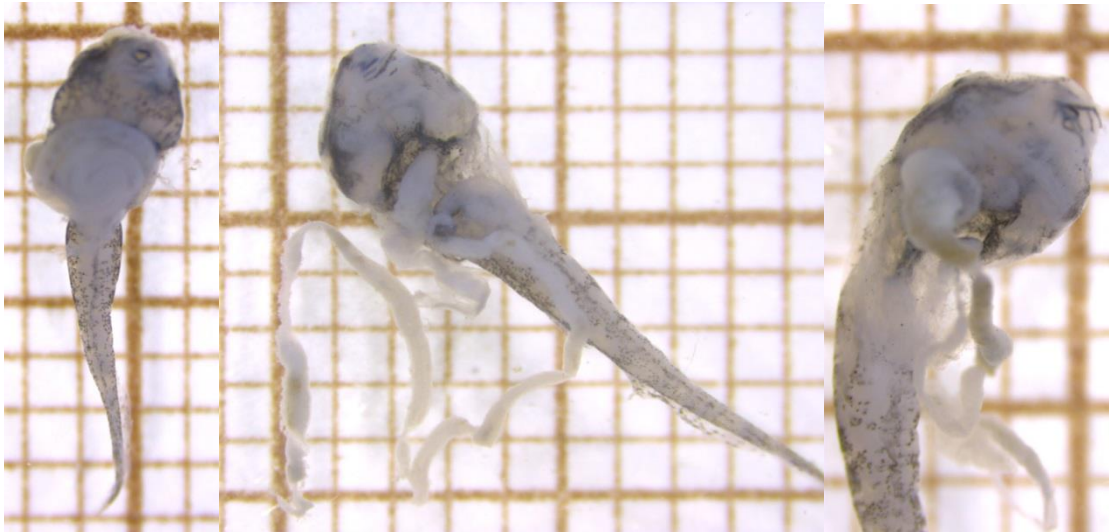


Figura 19 - Girinos de *Physalaemus cuvieri* mortos no experimento de toxicidade aguda com intestino esbranquiçado, Extrusão intestinal de girinos e esbranquiçamento dos mesmos.

Fonte: Da autora

5.3.2 *Rhinella icterica*

Não foi possível analisar a posição intestinal de *Rhinella icterica* devido a sua coloração escura, que não permitiu a visualização de sua condição. As Figuras a seguir ilustram o padrão considerado normal de girinos de *Rhinella icterica* em relação ao corpo e posição caudal (FIGURA 20) e em relação à cavidade oral (FIGURA 21).

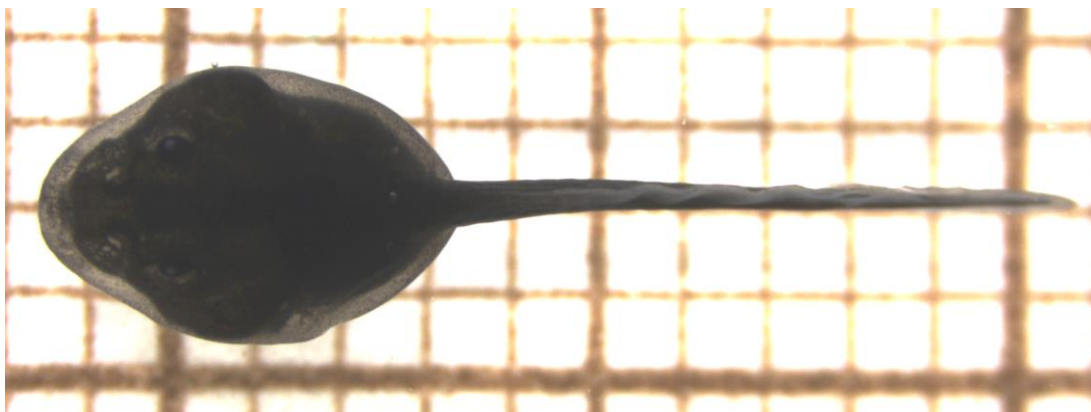


Figura 20 - Corpo e inserção caudal em visão dorsal de girino de *Rhinella icterica* considerado normal (padrão) para análise comparativa dos outros indivíduos

Fonte: Da autora

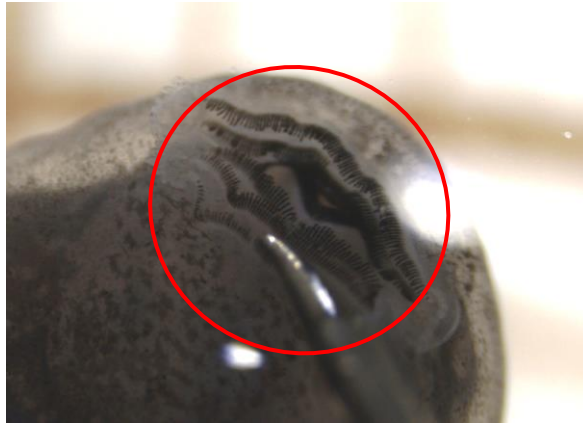


Figura 21 - Cavidade oral de girino de *Rhinella icterica* (padrão 2(2)/3) considerado normal (padrão) para análise comparativa dos outros indivíduos.

Fonte: Da autora

Rhinella icterica não apresentou um frequência crescente de malformações em relação ao aumento das concentrações no tempo de 48h. A frequência de indivíduos que apresentaram alguma alteração morfológica foi de 35%, 70%, 55% e 55% em Controle, C1, C2 e C3, respectivamente. Porém houve uma incidência de indivíduos com malformações após o Controle. A barra nas colunas representa a variação do erro padrão a 5% para mais e para menos (GRÁFICO 21).

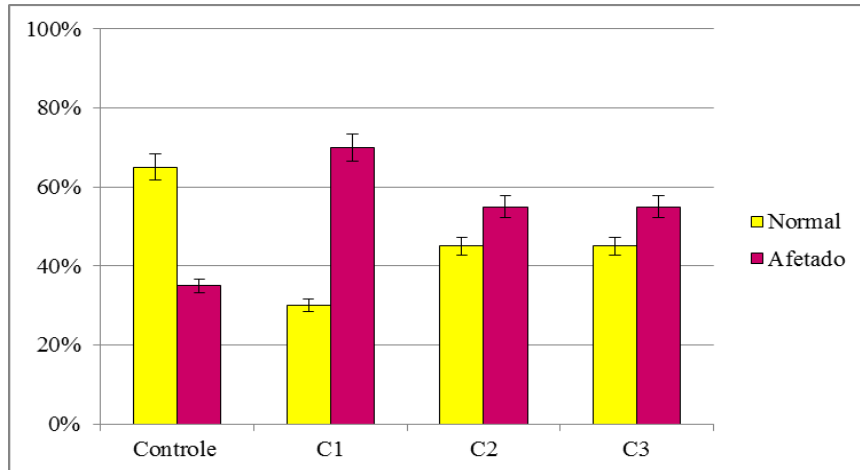


Gráfico 21 - Resposta dos indivíduos de *Rhinella icterica* no tempo de 48h à presença ou ausência de alterações morfológicas. Não foram realizadas análises a partir de C3 pois todos os indivíduos já haviam morrido no experimento de toxicidade aguda.

Fonte: Da autora

Nas avaliações no tempo amostral de 48 horas de *Rhinella icterica* houve uma predominância de malformação da cavidade oral, sendo que C1 apresentou maior frequência, em 92% dos indivíduos analisados, enquanto 57% dos indivíduos do Controle, 81% dos indivíduos de C2 e 17% dos indivíduos de C3 apresentaram malformação na cavidade oral (GRÁFICO 22).

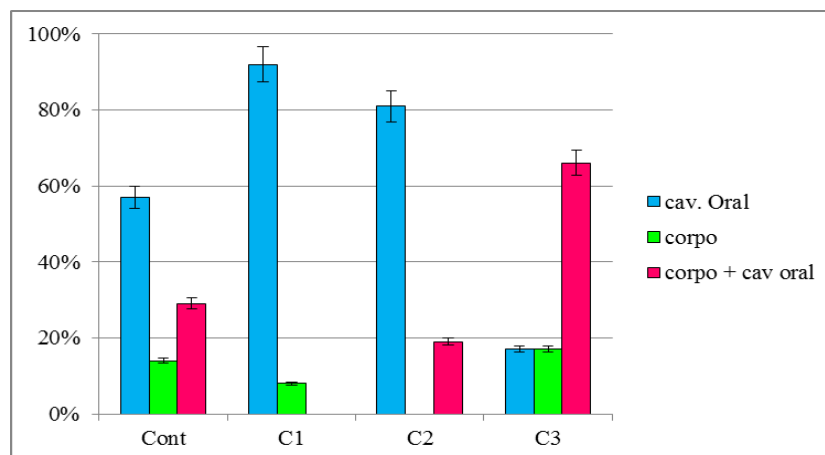


Gráfico 22 - Frequência das malformações de cavidade oral, inserção caudal (corpo) e interação entre as ocorrências em indivíduos de *R. icterica* analisados no tempo de 48h.

Fonte: Da autora

Houve diferença significativa entre as alterações morfológicas de inserção caudal (corpo) ($p=0.037$ e $F=2.6592$) e da cavidade oral ($p<0,01$ e $X^2= 100.35$) em relação aos tratamentos no tempo de 48h. Para malformações da cavidade oral, C1 se mostrou diferente dos outros tratamentos, que se mostraram iguais. Análises de malformação o corpo apresentaram que C3 se diferiu das demais, que também foram iguais estatisticamente (GRÁFICO 23).

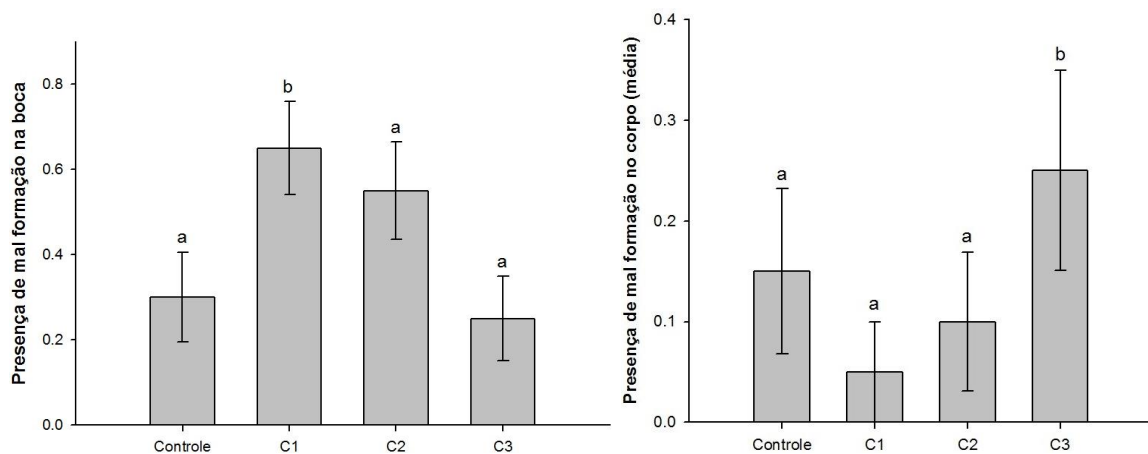


Gráfico 23 - Relação de malformação da cavidade oral e da inserção caudal (corpo) de *Rhinella icterica* em relação aos tratamentos no tempo amostral de 48 horas.

Fonte: Da autora

Houve diferença significativa do Comprimento de *Rhinella icterica* em 48h em relação aos tratamentos, onde Controle, C1 e C2 foram iguais, porém diferente de C3, que foi diferente de C4. O mesmo aconteceu com o peso dos indivíduos analisados (GRÁFICO 24)

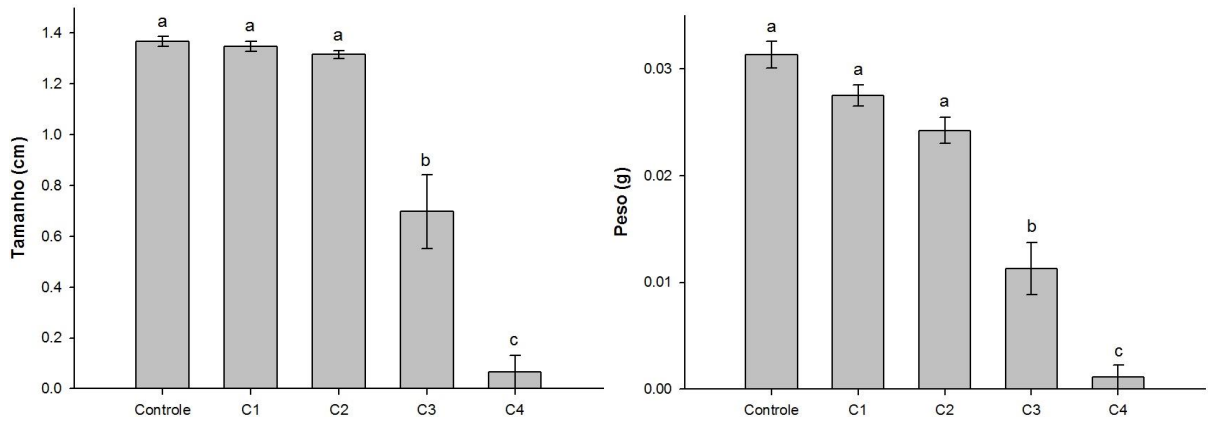


Gráfico 24 - Resposta estatística no comprimento e peso de *Rhinella icterica* para Controle e as concentrações C1, C2, C3 e C4 no tempo amostral de 48 horas.

Fonte: Da autora

No tempo amostral de 96 horas a frequência de malformações foi a mesma no Controle e em C1, totalizando 45% dos indivíduos, reduzindo para 33% em C2 e chegando a 100% em C3, não apresentando um padrão em relação ao aumento das concentrações, assim como em 48h (GRÁFICO 25).

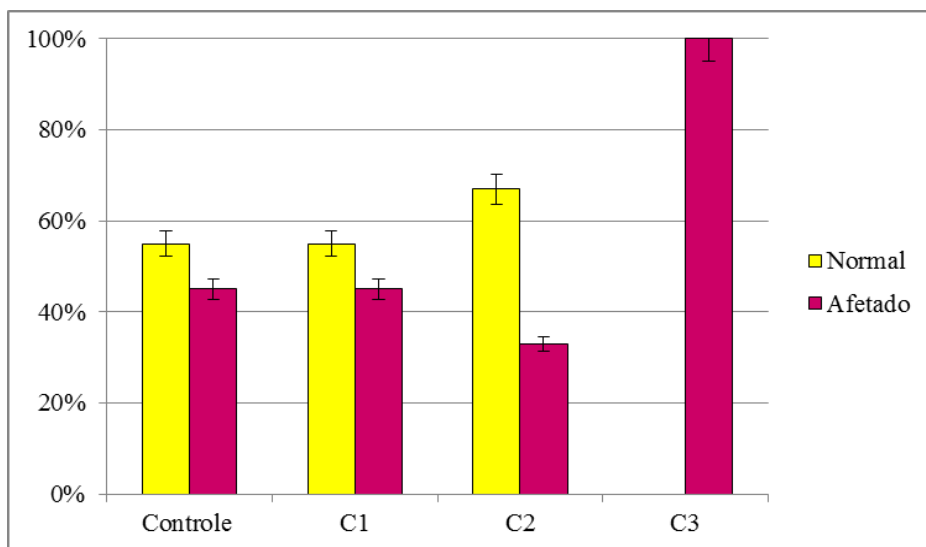


Gráfico 25 - Resposta dos indivíduos de *Rhinella icterica* às análises morfológicas no tempo de 96h. Não foram realizadas análises em C4 e C5 pois todos os indivíduos já haviam morrido no experimento de toxicidade aguda.

Fonte: Da autora

Porém, assim como em 48h, no tempo amostral de 96 horas houve predominância na malformação de cavidade oral, sendo que dos indivíduos que apresentaram malformações no Controle, C1, C2 e C3, 78%, 89%, 80% e 67%, respectivamente, foram na cavidade oral. Houve malformação na posição caudal a partir de C1 e a interação dos fatores foi observada no Controle e em C2 (GRÁFICO 26).

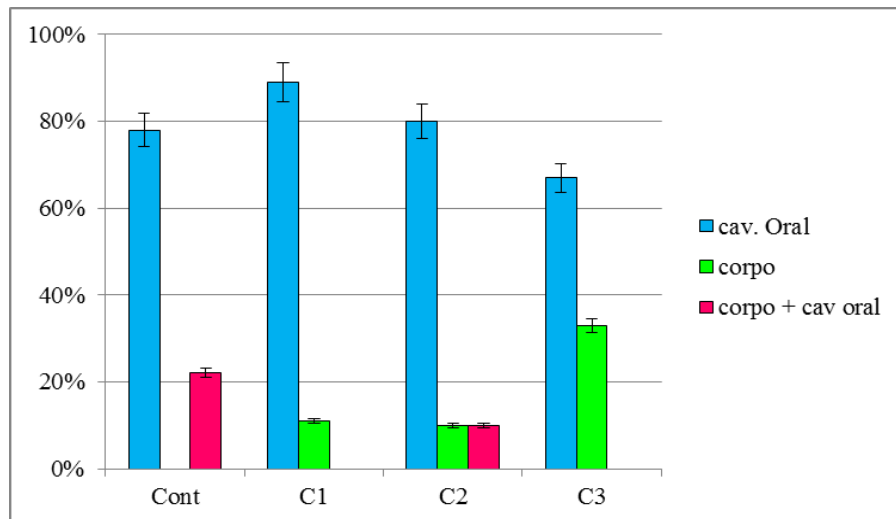


Gráfico 26 - Frequência das malformações de cavidade oral, inserção da cauda e interação entre as ocorrências em indivíduos de *R. icterica* analisados no tempo de 96h.

Fonte: Da autora

Não houve diferença estatística significativa para malformações da cavidade oral e inserção caudal em relação aos tratamentos para *Rhinella icterica* no tempo de 96h.

Houve diferença significativa entre o Comprimento de *Rhinella icterica* e os tratamentos no tempo amostral de 96h, onde Controle e C1 e C2, iguais estatisticamente, se diferiram de C2, que se diferiu de C3. O mesmo ocorreu com o Peso dos girinos em 96h (GRÁFICO 27).

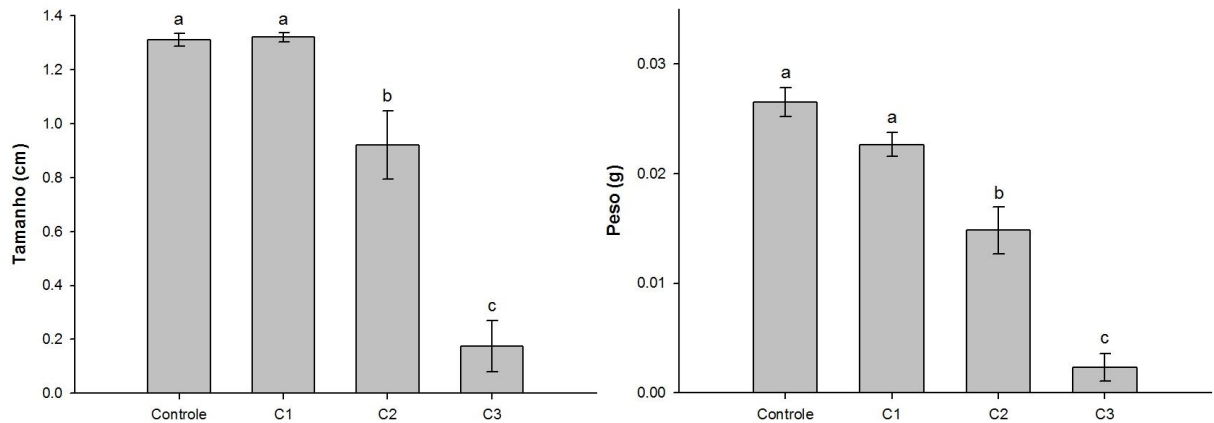


Gráfico 27 - Resposta estatística no comprimento e peso de *Rhinella icterica* para Controle e as concentrações C1, C2, C3 e C4 no tempo amostral de 96 horas.

Fonte: Da autora

As figuras a seguir mostram exemplos de malformações detectadas em relação ao formato do corpo e inserção caudal (FIGURA 22) e cavidade oral, cujos dentículos estavam ausentes ou a mandíbula sem completa formação (FIGURA 23).

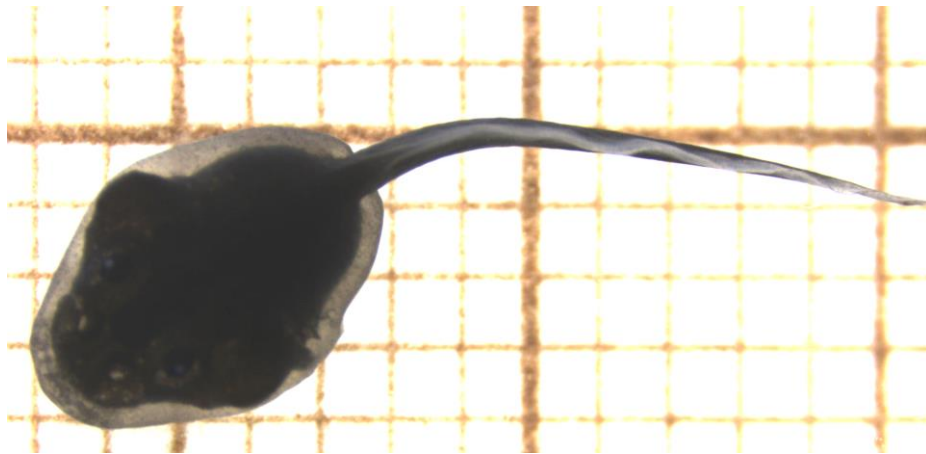


Figura 22 - Girino de *Rhinella icterica* em posição dorsal considerado com o corpo fora do padrão em análise comparativa com outros indivíduos considerados padrão.

Fonte: ALMEIDA (2014).



Figura 23: Cavidade oral de girinos de *Rhinella icterica* com denticulos ausentes e falhos.

Fonte: Da autora

O padrão de malformação detectado em relação à cavidade oral em sua grande maioria foi a ausência dos denticulos na região superior da boca, em ambos os tempos amostrais.

5.3.3 *Physalaemus cuvieri* x *Rhinella icterica*

Tanto *Physalameus cuvieri* quanto *Rhinella icterica* apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos na variável “Comprimento” em ambos os tempos amostrais, onde as maiores concentrações se diferiram ou se igualaram às antecedentes estatisticamente. A variável “Peso” foi diferente significativamente nas duas espécies no tempo amostral de 96 horas, sendo que a maior concentração analisada se mostrou diferente das demais.

Não houve uma relação semelhante entre as respostas das espécies em relação aos tipos de malformações morfológicas. Em 96 horas, *P. cuvieri* apresentou um resultado significativo para a malformação da cavidade oral, onde C3 foi estatisticamente diferente dos demais tratamentos, porém *R. icterica* não apresentou resultados com diferenças significativas em relação à cavidade oral, mas apresentou um resultado significativo para a malformação da inserção caudal no tempo amostral de 48h, onde C3 foi estatisticamente diferente dos demais tratamentos.

6 DISCUSSÃO

Este tópico apresenta a discussão baseada nos resultados apresentados e nos resultados apresentados por outros autores.

6.1 TESTES DE TOXICIDADE

Diversos trabalhos já foram realizados com testes de toxicidade aguda em organismos vivos devido a importância de se conhecer os efeitos dos compostos químicos em um contexto ecológico. A Tabela 1 sintetiza alguns resultados apresentados para diferentes organismos, princípios ativos e tempos amostrais, de diversos autores.

Tabela 1 - Alguns testes de toxicidade aguda realizados por diferentes autores, formulações de glifosato ou surfactante isolado e diferentes tempos em diferentes espécies de anfíbios anuros(*) e organismos aquáticos.

(Continua)

Espécie	Produto	Princípio ativo	Valor de LC50	Valor de LC50 AE**	Tempo	Autor
<i>Physalaemus cuvieri</i> * (presente estudo)	Roundup Original®	Glifosato	6,61 mg/L	2,37 mg/L (AE)	48h	Almeida (2014)
	Roundup Original®	Glifosato	7,12 mg/L	2,56 mg/L (AE)	96h	Almeida (2014)
<i>Rhinella icterica</i> * (presente estudo)	Roundup Original®	Glifosato	14,78 mg/L	5,32 mg/L (AE)	48h	Almeida (2014)
	Roundup Original®	Glifosato	11,11 mg/L	3,99 mg/L (AE)	96h	Almeida (2014)
<i>Litoria moorei</i> *	Roundup Original®	Glifosato	8,1 mg/L	2,9 mg/L(AE)	48h	Mann & Bidwell (1999)
	Roundup Biactive®	Glifosato	911 mg/L	328 mg/L (AE)	48h	Mann & Bidwell (1999)
<i>Crinia insignifera</i> *	Touchdown®	Glifosato	27,3 mg/L	9,0 mg/L (AE)	48h	Mann & Bidwell (1999)
	Roundup Original®	Glifosato	10 mg/L	3,6 mg/L (AE)	48h	Mann & Bidwell (1999)
	Roundup Biactive®	Glifosato	>1,1372 mg/L	>494 mg/L (AE)	48h	Mann & Bidwell (1999)
<i>Heleioporus eyrei</i> *	Touchdown®	Glifosato	48,7 mg/L	16,1 mg/L (AE)	48h	Mann & Bidwell (1999)
	Roundup Original®	Glifosato	17,5 mg/L	6,3 mg/L (AE)	48h	Mann & Bidwell (1999)

Tabela 1 - Alguns testes de toxicidade aguda realizados por diferentes autores, formulações de glifosato ou surfactante isolado e diferentes tempos em diferentes espécies de anfíbios anuros(*) e organismos aquáticos.

(Continuação)

Espécie	Produto	Princípio ativo	Valor de LC50	Valor de LC50 AE**	Tempo	Autor	
<i>Limnodynastes dorsalis</i> *	Roundup Oroginal®	Glifosato	8,3 mg/L	3,0 mg/L (AE)	48h	Mann & Bidwell (1999)	
	Touchdown®	Glifosato	36,2 mg/L	12,0 mg/L (AE)	48h	Mann & Bidwell (1999)	
	Roundup Biactive®	Glifosato	>1,111 mg/L	>400 mg/L (AE)	48h	Mann & Bidwell (1999)	
<i>Scinax nasicus</i> *	Glyfos®	Glifosato	3,62 mg/L		48h	Lajmanovich et al. (2003)	
	Glyfos®	Glifosato	2,64 mg/L		96h	Lajmanovich et al. (2003)	
<i>Rana pipiens</i> *	Roundup Original®	Glifosato	11,9 mg/L	3,7 mg/L (AE)	24h	Howe et al. (2004)	
	Roundup Original®	Glifosato	9,2 mg/L	2,9 mg/L(AE)	96h	Howe et al. (2004)	
<i>Rana sylvatica</i> *	Roundup Original®	Glifosato	18,1 mg/L	5,6 mg/L (AE)	24h	Howe et al. (2004)	
	Roundup Original®	Glifosato	16,5 mg/L	5,1 mg/L (AE)	96h	Howe et al. (2004)	
<i>Bufo americanos</i> *	Roundup Original®	Glifosato	13,5 mg/L	4,2 mg/L (AE)	24h	Howe et al. (2004)	
<i>Rana clamitans</i> *	Roundup Original®	Glifosato	6,6 mg/L	2,0 mg/L (AE)	24h	Howe et al. (2004)	
	Roundup Original®	Glifosato	6,5 mg/L	2,0 mg/L (AE)	96h	Howe et al. (2004)	
	POEA	-	1,1 mg/L	2,4 mg/L (AE)	24h	Howe et al. (2004)	
	POEA	-	1,1 mg/L	2,2 mg/L (AE)	96h	Howe et al. (2004)	
	Glyfos®	Glifosato	29,1 mg/L	9,0 mg/L (AE)	24h	Howe et al. (2004)	
	Glyfos®	Glifosato	28,6 mg/L	8,9 mg/L (AE)	96h	Howe et al. (2004)	
	Roundup Transorb®	Glifosato	7,4 mg/L	2,3 mg/L (AE)	24h	Howe et al. (2004)	
	Roundup Transorb®	Glifosato	7,2 mg/L	2,2 mg/L (AE)	96h	Howe et al. (2004)	
	<i>Selenastrum capricornutum</i>	Roundup®	Glifosato	-	5,81 mg/L (AE)	96h	Tsui e Chu (2003)
	(microalga)	POEA	-	-	3,92 mg/L (AE)	96h	Tsui e Chu (2003)
<i>Skeltonema costatum</i>	Roundup®	Glifosato	-	1,85 mg/L (AE)	96h	Tsui e Chu (2003)	

Tabela 1 - Alguns testes de toxicidade aguda realizados por diferentes autores, formulações de glifosato ou surfactante isolado e diferentes tempos em diferentes espécies de anfíbios anuros(*) e organismos aquáticos.

(Conclusão)

Espécie	Produto	Princípio ativo	Valor de LC50	Valor de LC50 AE**	Tempo	Autor
(microalga)	POEA	-	-	3,35 mg/L (AE)	96h	Tsui e Chu (2003)
<i>Euplotes vannus</i>	Roundup®	Glifosato	-	23,5 mg/L (AE)	48h	Tsui e Chu (2003)
(protozoário)	POEA	-	-	5,0 mg/L (AE)	48h	Tsui e Chu (2003)
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Roundup®	Glifosato	-	5,39 mg/L (AE)	48h	Tsui e Chu (2003)
(crustáceo)	POEA	-	-	1,15 mg/L (AE)	48h	Tsui e Chu (2003)
<i>Acartia tonsa</i>	Roundup®	Glifosato	-	1,77 mg/L (AE)	48h	Tsui e Chu (2003)
(crustáceo)	POEA	-	-	0,57 mg/L (AE)	48h	Tsui e Chu (2003)

** AE = Equivalente ácido – valor de LC50 da porcentagem de princípio ativo presente no composto químico

Fonte: Da autora

No presente estudo *Physalaemus cuvieri* se apresentou mais sensível ao Roundup Original® do que *Rhinella icterica*, assim como em relação às espécies de anfíbios *Litoria moorei*, *Crinia insignifera*, *Heleioporus eyrei* e *Limnodynastes dorsalis*, (MANN; BIDWELL, 1999) em 48h, *Rana pipiens*, *R. sylvatica* e *Bufo americanus* em 96h, e menos sensível apenas do que *R. clamitans*, também no tempo amostral de 96h (HOWE et al., 2004). Já *Rhinella icterica* se mostrou menos sensível do que *Litoria moorei* e *Crinia insignifera* em 48 horas e mais sensível do que *Heleioporus eyrei* e *Rana sylvatica*.

Em relação a outros organismos avaliados por Tsui e Chu (2003), tanto *Physalaemus cuvieri* quanto *Rhinella icterica* se mostraram mais sensíveis ao Roundup® do que a microalga *Selenastrum capricornutum*, o protozoário *Euplotes vannus* e o crustáceo *Ceriodaphnia dubia*, e menos sensíveis do que a microalga *Skelotonema costatum* e o crustáceo *Acartia tonsa*, provando a diferença de sensibilidade entre diferentes grupos e a necessidade de conhecer os efeitos de compostos químicos em cada grupo animal.

No presente estudo LC50 de *Physalaemus cuvieri*, em 48 horas se mostrou menor do que em 96 horas, aparentemente significando maior toxicidade em menor tempo. Na margem de 5% de confiança, os valores se encontram entre os valores de LC50 de 7,53 (máxima de LC50_{48h}) e 6,21 (mínima de LC50_{96h}), apresentando igual toxicidade. Tal resultado pode ter sido influenciado pela adsorção do composto químico do tratamento, pela renovação da água em 72 horas sugerido por Walker et al. (2006), influenciando em algum aspecto que não foi possível estimar, devendo ser melhor analisado em testes posteriores, de preferência sem renovação da água. Outro fator que pode ter influenciado é a carga genética dos indivíduos, que vieram de três diferentes desovas, diferente de *Rhinella icterica*, que todos os indivíduos utilizados nos experimentos foram provenientes de uma única desova. *Rhinella icterica* apresentou LC50 em 48 horas maior do que em 96 horas, confirmando toxicidade mais alta em maior tempo de exposição ao toxicante, porém não houve renovação de água no experimento realizado com esta espécie. Um fator que pode ter influenciado a diferença de sensibilidade entre as espécies é a diferença no tamanho das mesmas, sendo a maior espécie mais resistente às perturbações.

A concentração do composto químico utilizada foi menor do que a indicada na bula, porém o ambiente de desenvolvimento dos girinos é muito diversificada, podendo pequenas poças de áreas agrícolas ser responsáveis pelo sítio reprodutivo, onde a concentração do composto químico será superior àquelas apresentadas em pesquisas em grandes rios e lagos.

Relyea (2005a) reuniu comunidades de 3 espécies de girinos norte americanos em mesocosmos de lagoas naturais contendo diferentes tipos de solos (que poderiam absorver o pesticida) e aplicou o Roundup® pulverizado. Após 3 semanas o Roundup® foi letal para 96% a 100% dos girinos. Foi realizado o mesmo com anfíbios pós-metamórficos em recipientes terrestres em laboratório, e após um dia o Roundup® foi letal para 68-86% dos anfíbios, que sugere que o Roundup® pode causar altas taxas de mortalidade de anfíbios, contribuindo fortemente para o declínio populacional global.

Mann e Bidwell (1999) testaram os valores de LC50 em 48h para diversos formulados de glifosato em girinos australianos e os valores para o Roundup Original® variaram entre 8.1 e 32.2 mg/L, apresentando-se levemente mais tóxico que o herbicida Touchdown®. O Roundup Biactive® foi considerado o único agrotóxico a base de glifosato testado que poderia

ser utilizado dentro da margem de segurança necessário para a proteção da vida aquática na Austrália, e como consequência, foi a única formulação registrada para o controle de ervas daninhas aquáticas.

Estudos sugerem que, sob condições laboratoriais, concentrações relevantes de Roundup® podem causar mortalidade de várias espécies de girinos e que esta mortalidade é principalmente devido ao surfactante POEA (GIESY et al., 2000; HOWE et al., 2004; LAJMANOVICH et al., 2003; MANN; BIDWELL, 1999; RELYEA, 2005b).

Em teste realizado com POEA isolado em *Rana clamitans*, a LC50_{24h} e LC50_{96h} foi de 1.1mg/L em ambos os tratamentos (HOWE et al., 2004) e considerado como “altamente tóxico”, de acordo com a ANVISA (2014), por apresentar LC50 superior a 0.2mg/L até 2mg/L. Howe et al. (2004) concluiu que o surfactante POEA isolado foi o mais tóxico e que as formulações que utilizam este surfactante se apresentaram mais tóxicas do que aquelas que continham outras formulações de glifosato.

Relyea e Jones (2009) encontraram LC50 (96h) entre 0.8 – 1.9 mg/L AE para 9 espécies de anfíbios utilizando o produto Roundup Original Max®. Aparentemente um valor abaixo dos apresentados por outros testes, porém o surfactante de Roundup® Original Max não foi divulgado, sendo difícil traçar um comparativo entre os produtos e espécies analisadas.

Entretanto vários autores afirmam que, sob uso indicado, o herbicida Roundup Original® não apresenta perigo em ambiente aquático e fauna aquática, pois tanto o surfactante quanto o glifosato seriam suficientemente diluídos em grandes corpos d’água ou em ambientes aquáticos lóticos, não constituindo um perigo tóxico (GIESY et al., 2000; MANN; BIDWELL, 1999). Porém, Mann e Bidwell (1999) alegam que em ambientes aquáticos lênticos, rasos e lagoas temporárias, em taxas de aplicação normais, a concentração do agrotóxico pode atingir altos níveis tóxicos, sugerindo estudos mais aprofundados nestas situações. Considerando que muitos anfíbios anuros são dependentes de corpos d’água temporários, estes compostos químicos podem de fato atingir níveis prejudiciais a estes organismos (LAJMANOVICH et al., 2003).

Conforme mostra a Tabela 1 apresentada, o trabalho apresentado por Tsui e Chu (2003) mostra que diferentes grupos de seres vivos apresentam diferentes sensibilidades em relação ao Roundup® e ao seu surfactante, sendo assim necessária a realização de testes com

diferentes grupos para definir toxicidade de um composto químico. Além disso, espécies australianas apresentaram diferente sensibilidade em relação às espécies apresentadas aqui, reforçando ainda mais essa necessidade.

Para alguns resultados que se apresentaram diferentes do esperado sugere-se que pode ser em decorrência de uma série de diferenças importantes entre os experimentos que podem afetar o efeito do glifosato sobre os anfíbios, incluindo a formulação aplicada, o local experimental utilizado, a espécie e a população de anfíbios selecionada.

6.2 ANÁLISES MORFOLÓGICAS E COMPORTAMENTAIS

O estágio larval dos girinos parece ser um fator responsável pela variação da sensibilidade à toxicidade aguda (DAVID et al., 2012; MANN; BIDWELL, 1999; SEIXAS FILHO et al., 2003). Em estudo sobre desenvolvimento de girinos em diferentes salinidades, Seixas Filho et al. (2003) concluíram que girinos nos estágios menos desenvolvidos são mais sensíveis do que aqueles em estágios mais avançados, apresentando menor capacidade de ajuste, não resistindo ao intenso trabalho metabólico, necessário para a adaptação ao meio, assim como a preparação para mudança de uma respiração branquial para uma respiração pulmonar.

Porém outros fatores como a idade, peso, dieta, diferenças no manuseio e variações naturais são parâmetros importantes para determinar a diferenças de sensibilidade entre os animais, porém são pequenas as diferenças entre diferentes espécies. Adultos e imagos também foram menos sensíveis ao Roundup® do que os girinos (MANN; BIDWELL, 1999).

Brunelli et al. (2009) e colaboradores, analisando outros estudos, apresentaram que a inibição do crescimento larval é um dos mais sensíveis indicadores de toxicidade no desenvolvimento. Em ambientes naturais, o crescimento larval reduzido pode aumentar a suscetibilidade da predação, atraso na metamorfose ou resultar em adultos de tamanho reduzido, com negativos efeitos no desenvolvimento futuro e sobrevivência.

Tanto *Physalameus cuvieri* quanto *Rhinella icterica* apresentaram no presente trabalho diferenças significativas entre os tratamentos na variável “Comprimento” e “Peso”, o que sugere a toxicidade e a influência da exposição de Roundup Original® nestas espécies.

Não é possível afirmar que a exposição ao Roundup Original® foi a responsável pela diferença estatística significativa de *R. icterica* na malformação da inserção caudal no tempo de 48h pois o mesmo não foi observado no tempo amostral de 96h. Porém, sugere-se que tenha alguma influência na malformação na cavidade oral de girinos de *P. cuvieri* em altas concentrações, pois houve diferença significativa no tempo amostra de 96h.

De acordo Lajmanovich et al. (2003), as malformações larvais (principalmente deformações do disco oral e cranial, anomalias nos olhos e curvatura da cauda) ocorreram em todos os tratamentos e aumentaram em relação à concentração de glifosato e tempo de exposição, porém as malformações foram mínimas nas menores concentrações do composto químico.

De acordo com Brunelli et al. (2009), em girinos de *Bufo bufo* submetidos ao Endosulfan, as deformidades foram observadas a partir do 8º dia de exposição, sendo as mais frequentes: inchaço da cabeça, despigmentação da pele de preto a castanho claro, focinho e boca ásperas, cauda assimétrica ou curvada e malformações ósseas. Sendo assim, os resultados apresentados no presente trabalho poderiam ser diferentes caso tivesse sido realizado testes de toxicidade crônica nas espécies experimentais.

Porém, as análises de malformações apresentadas no presente trabalho estão de acordo com algumas apresentadas por outros autores, como deformações no disco oral, alterações no nado, despigmentação e cauda curvada. Foi observada alguma alteração em relação ao fígado, que se mostrou proeminente em *Physalaemus cuvieri* quando houve alteração intestinal. Porém, estudos histológicos não foram realizados no presente trabalho e devem ser realizados para concluir que houve efeito provocado pelo agrotóxico em que os animais estavam submetidos.

Características comportamentais são grandes indicadores de sensibilidade a substâncias tóxicas. David et al. (2012) observaram que o comportamento e malformações morfológicas são sinais típicos de toxicidade. Porém, estatisticamente os indivíduos de *Physalaemus cuvieri* sobreviventes submetidos à maior concentração (C3) apresentaram, em 96 horas de exposição, comportamento igual aos indivíduos do Controle, onde não houve adição de contaminante. *Rhinella icterica* apresentou diferença estatística apenas em C1, e Controle, C2, C3 e C4 se mostraram iguais.

O habitat natural dos anfíbios é quimicamente e fisicamente complexo em geral, e os testes de toxicidade aguda realizados em laboratório podem não replicar as transformações químicas e mudanças associadas à toxicidade que provavelmente ocorrem em ecossistemas complexos, assim como os efeitos subletais à exposição dos pesticidas a longo prazo (MANN; BIDWELL, 1999).

Não foi detectado um comportamento natatório dose-dependente porém alterações comportamentais foram detectadas de forma diferentes nas concentrações, podendo ser provocadas pela presença do contaminante.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo sugere que a aplicação de Roundup Original® contendo em sua formulação glifosato e o surfactante POEA tem o potencial de causar mortalidade significativa em girinos de *Physalaemus cuvieri* e *Rhinella schneideri*. *R. schneideri* se mostrou menos sensível do que *P. cuvieri*, porém alterações subletais foram detectadas.

No presente estudo o surfactante POEA não foi analisado isoladamente, sendo assim, não é possível determinar qual componente do Roundup® causa mortalidade nos girinos.

Sugere-se com o presente trabalho que Roundup Original foi responsável pelas alterações morfológicas em Peso e Comprimento dos girinos de *P. cuvieri* e *R. schneideri*. Sugere-se também que em elevado tempo de exposição, pode afetar a cavidade oral de girinos de *Physalaemus cuvieri*.

Alterações comportamentais significativas foram observadas em *Physalaemus cuvieri* e *Rhinella ictérica* expostas a C1 e a C2, no entanto não observadas relações dose-resposta para estas alterações, visto que nas maiores alterações não houve efeito significativo.

REFERÊNCIAS

ALVARENGA, G. P. **Batata no Sul de Minas**. Associação Brasileira da Batata. Disponível em: <http://www.abbabatatabrasileira.com.br/revista18_009.htm>. Acesso em: 12 maio 2014.

AMARANTE JUNIOR, O. P. et al. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Quim. Nova**, v. 25, n. 4, p. 589-593, 2002.

ANDRADE, R. G. R. de. **A expansão da cafeicultura em Minas Gerais: da intervenção do estado à liberalização do mercado**. 1994. 173 f. Dissertação (Mestrado em Economia) - Faculdade de Ciências Econômicas da Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, 1994.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Critérios para a classificação toxicológica**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/anvisa+portal/anvisa/inicio/agrotoxicos+e+toxicologia/publicacao+agrotoxico+toxicologia/criterios+para+a+classificacao+toxicologica>>. Acesso em: 03 fev. 2014.

ASTM. **Standard guide for conducting acute toxicity tests on test materials with fishes, macroinvertebrates and amphibians**. Designation: E-729 – 96. 2002.

BAHIA, V. R. L. de O. **Morfologia e enzimologia do sistema digestório dos girinos de 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.

BESTEN, P. J. den; MUNAWAR, M. **Ecotoxicological testing of marine and freshwater ecosystems: emerging techniques, trends and strategies**. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2005.

BLAUSTEIN, A. R.; KIESECKER, J. M. Complexity and conservation: lessons for the global decline of amphibian populations. **Ecology Letters**, v. 5, p. 577-608, 2002.

BLAUSTEIN, A. R.; WAKE, D. B.; SOUSA, W. P. Amphibian declines: judging stability, persistence and susceptibility of populations to local and global extinctions. **Conservation Biology**, v. 8, n. 1, p. 60-71, 1994.

BRAGUINI, W. L. **Efeitos da deltametrina e do glifosato, sobre parâmetros do metabolismo energético mitocondrial, sobre membranas artificiais e naturais e exterimento *in vivo***. 2005. 193 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Pós Graduação em Ciências Bioquímicas, Universidade Federal do Paraná, UFP, Curitiba, 2005.

BRUNELLI, E. et al. Environmentally relevant concentrations of endosulfan impair development, metamorphosis and behaviour in *Bufo bufo* tadpoles. **Aquatic Toxicology**, v. 91, p. 135–142, 2009.

CAMARGO, A. C. M. Perspective for pharmaceutical innovation in Brazil – center for applied toxinology (CEPID – center for research, innovation and dissemination – FAPESP). **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, v. 11, n. 4, p. 384-390, 2005.

CARBONARI, C. A. et al. Alterações dos níveis de aminoácidos aromáticos em plantas de milho expostas ao glyphosate. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS NA ERA DA BIOTECNOLOGIA, 28, 2012, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas, 2012. p. 357-361.

CARDOSO, A. J. **Utilização de recursos para a reprodução em comunidade de anuros no sudeste do Brasil**. 1986. 200 f. Tese (Doutorado em Ecologia) - Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, 1986.

CONDEZ, T. H.; SAWAYA, R. J.; DIXO, M. Herpetofauna dos remanescentes de mata atlântica da região de Tapiraí e Piedade, SP, sudeste do Brasil. **Biota Neotrop.**, v. 9, n. 1, p. 157-185, 2009.

DAVID, M. et al. Behavioral, morphological deformities and biomarkers of oxidative damage as indicator of sublethal cypermethrin intoxication on tadpoles of *D. melanostictus* (Schneider, 1799). **Elsevier**, Pesticide Biochemistry and Physiology, v. 103, p. 127-134, 2012.

DAVIDSON, C.; SHAFFER, H. B.; JENNINGS, M. R. Declines of the California red-legged frog: climate, UV-B, habitat and pesticides hypotheses. **Ecological Applications**, v. 11, n. 2, 2001.

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

DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. **Biology of amphibians**. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 1994.

FROST, D. R. **Amphibian species of the world: an online reference**. Version 6.0. American Museum of Natural History, New York, USA. Disponível em: <<http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia>>. Acesso em: 15 jun. 2014.

GAIGA, R. [**Physalaemus cuvieri (Fitzinger, 1826) adulto**]. 2014. 2. fots., color, 10 cm x 15 cm.

GASQUES, J. G. BASTOS, E. T.; VALDEZ, C.; BACCHI, M. R. **Produtividade e crescimento – algumas comparações**. 2012. Disponível em:

<http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/0tabelas/Produtividade%20e%20Crescimento%20-%20Artigo%2031%2001%2013%20_2_.pdf>. Acesso em: 29 dez. 2014.

GIARETTA, A. A. & SAZIMA, I. Nova espécie de *Proceratophrys* mir. rib. do sul de Minas Gerais, Brasil (amphibia, anura, leptodactylidae). **Rev. Brasil Biol.**, v. 53, n. 1, p. 13-19, 1993.

GIESY, J. P.; DOBSON, S.; SOLOMON, K. R. Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide. **Rev Environ Contam Toxicol**, v. 167, p. 35-120, 2000.

GOSNER, K. L. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. **Herpetological**, v. 16, p. 183-190, 1960.

HAYES, T. B.; FALSO, P.; GALLIPEAU, S.; STICE, M. The cause of global declines: a developmental endocrinologist's perspective. **J Exp Biol.**, v. 213, n. 6, p. 921–933, 2010.

HERPETO.ORG. *Physalaemus cuvieri*. Disponível em:

<<http://br.herpeto.org/anfibios/anura/physalaemus-cuvieri/>>. Acesso em: 12 mar. 2012.

_____. *Rhinella icterica*. Disponível em: <<http://br.herpeto.org/anfibios/anura/rhinella-icterica/>>. Acesso em: 2 jan. 2015.

HERZFELD, D.; SARGENT, K. **Private pesticide applicator safety education manual**. 19 ed. University of Minnesota, Extension, 2011.

HEYER, W. R.; et al. Frogs of Boracéia. **Arq. Zool.**, v. 31, n. 4, p. 231-410, São Paulo, 1990.

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.

ITHO, S. de F. **Toxicologia. módulo XII: intoxicações por agrotóxicos. herbicidas**

Glifosato. Disponível em: <<http://ltc.nutes.ufrj.br/toxicologia>>. Acesso em: 23 jun. 2014.

IUCN Red List – **The IUCN Red List of Threatened Species**, Version 2013.2. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em: 22 ago. 2013.

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.

LAVORATO, M. et al. Endosulfan effects on *Rana dalmatina* tadpoles: quantitative developmental and behavioural analysis. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 64, p. 253-262, 2013.

LEDERMAN, M. R.; PADOVAN, M. P. **Conservação da mata atlântica no estado do Espírito Santo: cobertura florestal e unidades de conservação**. Programa Centros para Conservação da Biodiversidade-Conservação Internacional do Brasil / IPEMA, 2005.

LOIOLA, R. C. **Herpetofauna da Fundação Jardim Botânico de Poços de Caldas, sul de Minas Gerais**. 2010. 23 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL, Alfenas, 2010.

LORENZO, J. S. **Regeneração natural de uma área minerada de bauxita em Poços de Caldas, MG**. 1991. 151 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) - Universidade Federal de Viçosa, UFV, Viçosa, 1991.

MANN, R. M.; BIDWELL, J. R. The toxicity of glyphosate and several glyphosate formulations to four species of southwestern australian frogs. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 36, p. 193–199, 1999.

McDIARMID, R. W; ALTIG, R. **Tadpoles: The Biology of Anuran Larvae**. Chicago and London: The University of Chicago Press, 1999.

MESNAGE, R.; BERNAY, B.; SÉRALINI, G. E. Ethoxylated adjuvants of glyphosate-based herbicides are active principles of human cell toxicity. **Toxicology**, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2012.09.006>>.

MIJARES, A.; RODRIGUES, M. T.; BALDO, D. **Physalaemus cuvieri**. 2010. IUCN Red List. Versão 2014.2. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em: 23 mar. 2014.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Brasil projeções do agronegócio 2011/2012 a 2021/2022**. Brasília, 2012.

MONTEIRO-LEONEL, A. C. **Herpetofauna do planalto de Poços de Caldas, sul de Minas Gerais**. 2004. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências, na área de Zoologia) - Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, 2004.

MONSANTO. Disponível em: <<http://www.monsanto.com>>. Acesso em: 04 abr. 2013.

MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000.

PMISBPPC – Plano de manejo integrado de sub-bacias do planalto de Poços de Caldas (Rio Lambari). **Diretrizes e estratégias**. Prefeitura Municipal de Poços de Caldas, 2010.

PREFEITURA MUNICIPAL DE POÇOS DE CALDAS. Disponível em: <<http://www.pocosdecaldas.mg.gov.br/site/>>. Acesso em: 2 maio 2014.

RELATÓRIO TÉCNICO DA COMISSÃO DAS ÁGUAS. **Avaliação da qualidade da água e sedimentos das microbacias do Ribeirão das Antas e do Ribeirão de Caldas no planalto de Poços de Caldas**. 52 f., 2012.

RELYEA, R. A. The lethal Impacts of Roudup and predatory stress on six species of north american tadpoles. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 48, p. 351-357, 2005a.

_____. The letal impact of Roundup on aquatic and terrestrial amphibians. **Ecological Applications**, v. 15, n. 4., p. 1118-1124, 2005b.

RELYEA, R. A.; JONES, D. K. The toxicity of Roundup Original Max® to 13 species of larval amphibians. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 13, n. 9, p. 2004-2008, 2009.

ROSSA-FERES, D. de C.; NOMURA, F. Characterization and taxonomic key for tadpoles (Amphibia: Anura) from the northwestern region of São Paulo State, Brazil. **Biota Neotropica**, v. 6, n. 1, p. 1-26 , 2006.

ROSSA-FERES, D. de C. et al. Anfíbios do estado de São Paulo, Brasil: conhecimento atual e perspectivas. **Biota Neotropica**, v. 11, n. 1, p. 1-19, 2011.

SEIXAS FILHOS, J. T. et al. Efeito de diferentes salinidades da água sobre o desempenho de girinos de *Rana catesbeiana* (Shaw, 1802). **Augustus**, v. 8, n. 16, p. 14-23, 2003.

SILVA, H. S. V. P. et al. Toxicidade aguda e genotoxicidade do agrotóxico comercial Folisuper 600BR a girinos de *Physalaemus cuvieri* (anura: leiuperidae). **Pesticidas: r.ecotoxicol. e meio ambiente**, Curitiba, v. 23, p. 1-10, 2013.

SILVANO, D. et al. *Rhinella icterica*. 2010. IUCN Red List. Versão 2014.2. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em: 2 jan. 2015.

TOLEDO, L. F. et al. A revisão do código florestal brasileiro: impactos negativos para a conservação dos anfíbios. **Biota Neotropica**, v. 10, n. 4, p. 35-38, 2010.

TSK. **Trimmed Spearman-Kärber**. Version 1.5. Cincinnati: Environmental Protection Agency, 1991.

TSUI, M. T. K.; CHU, L. M. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. **Chemosphere**, v. 52, p. 1189-1197, 2003.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. **R.E.D FACTS: Glyphosate**. EPA-738-F93-011, 1993.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. **Toxicity assessment**. Chapter 7. Disponível em: <http://www.epa.gov/oswer/riskassessment/ragsa/pdf/rags_ch7.pdf>. Acesso em: 5 ago. 2014.

VIEIRA, W. L. da S.; ARZABE, C. Descrição do girino de *Physalaemus cicada* (Anura, Leiuperidae). **Iheringia, Sé. Zool.**, Porto Alegre, v. 98, n. 2, p. 266-269, 2008.

WALKER, C. H. Alternative approaches and tests in ecotoxicology: a review of the present position and the prospects for change, taking into account ECVAM's duties, topic selection and test Criteria. **ATLA**, v. 26, p. 649-677, 1998.

WALKER, C. H. et al. **Principles of ecotoxicology**. 3. ed. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2006.

















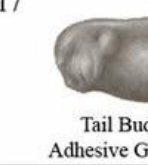
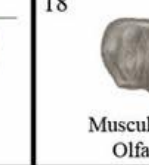
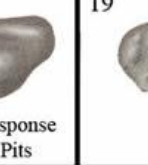
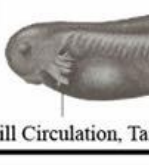
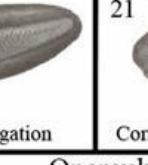
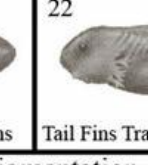



WOEHL Jr.; G.; WOEHL, E. N. **Cartilha: Anfíbios da Mata Atlântica**. Jaraguá do Sul: Instituto Rã-Bugio para Conservação da Biodiversidade, 2008.

YAMADA, T.; CASTRO, P. R. de C. e. **Glifosato, herbicida com singular modo de ação: Efeitos secundários e implicações fisiológicas e agronômicas**. Disponível em: <[http://www.ipni.net/ppiweb/pbrazil.nsf/1c678d0ba742019483256e19004af5b8/425d07bd384d51950325704a004dbe75/\\$FILE/Anais%20Yamada%20e%20Paulo%20Castro.pdf](http://www.ipni.net/ppiweb/pbrazil.nsf/1c678d0ba742019483256e19004af5b8/425d07bd384d51950325704a004dbe75/$FILE/Anais%20Yamada%20e%20Paulo%20Castro.pdf)>. Acesso em: 13 jul. 2014.

ANEXO A – Tabela de Gosner (1960) de desenvolvimento larval de Anfíbios Anuros

(Continua)

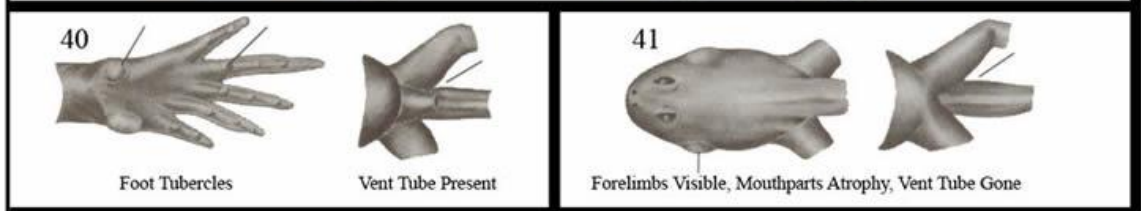
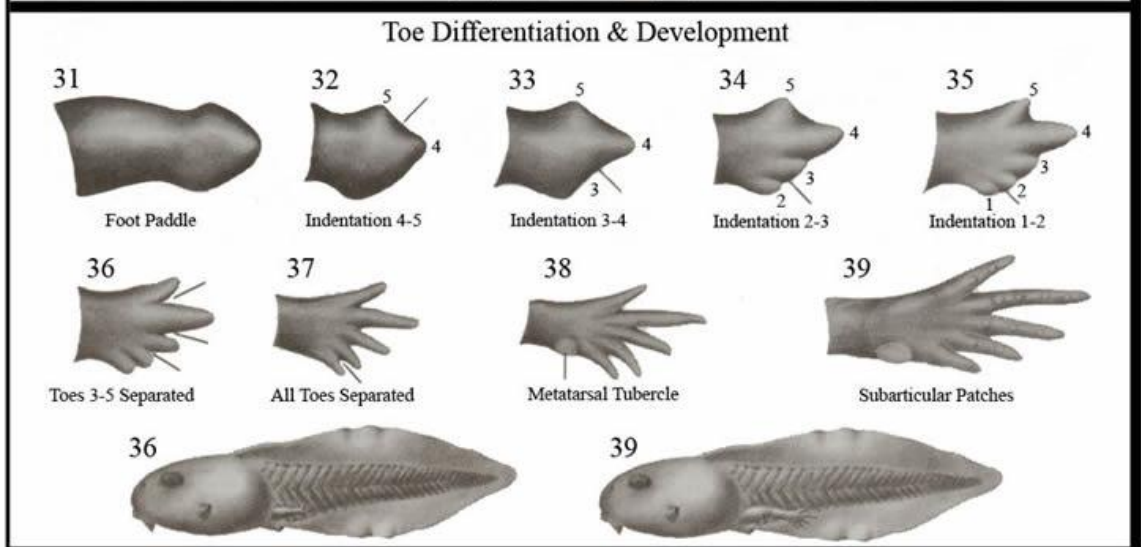
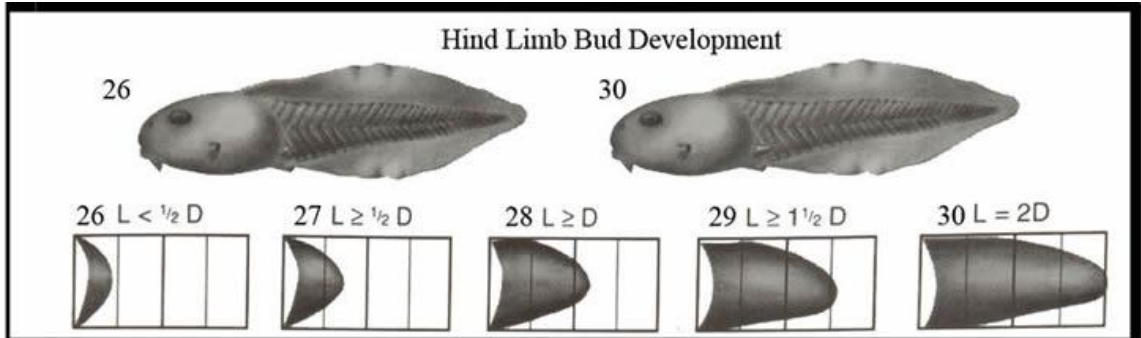
EMBRYOS

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

HATCHLINGS

(Conclusão)

L
A
R
V
A
E



M
E
T
A
M
O
R
P
H
S

