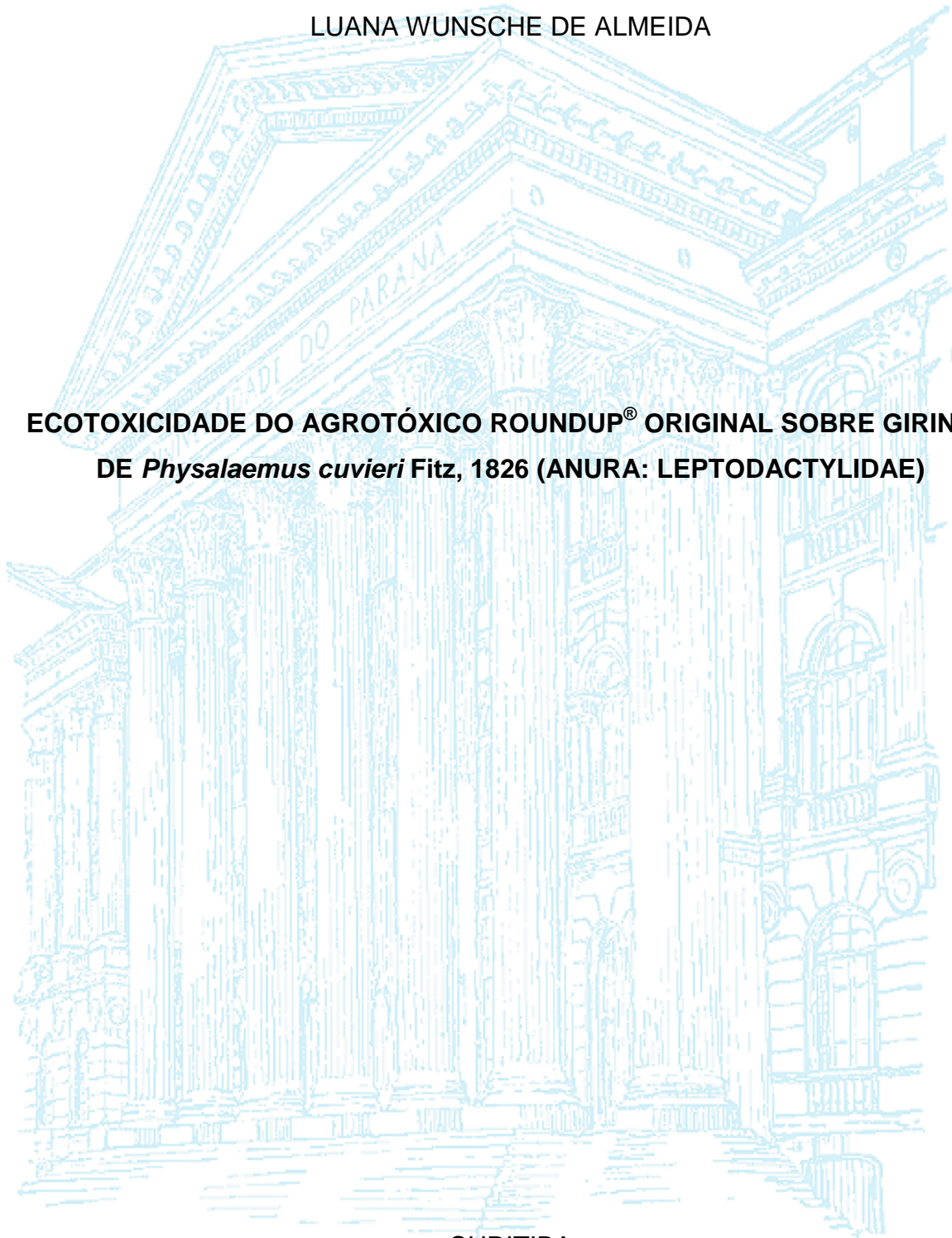


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LUANA WUNSCH DE ALMEIDA

**ECOTOXICIDADE DO AGROTÓXICO ROUNDUP® ORIGINAL SOBRE GIRINOS
DE *Physalaemus cuvieri* Fitz, 1826 (ANURA: LEPTODACTYLIDAE)**



CURITIBA

2016

LUANA WUNSCH DE ALMEIDA

**ECOTOXICIDADE DO AGROTÓXICO ROUNDUP® ORIGINAL SOBRE GIRINOS
DE *Physalaemus cuvieri* Fitz, 1826 (ANURA: LEPTODACTYLIDAE)**

Monografia apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel no Curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Mauricio Osvaldo Moura

Co-orientadora: Marta Margarete Cestari

CURITIBA

2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas e todos aqueles que de alguma forma, direta ou indiretamente, tornaram este estudo possível.

Pois, o conhecimento é patrimônio da humanidade, histórico, coletivo e inacabado. E é a partir das nossas relações que construímos nossa visão de mundo, nossos valores e utopias. E mesmo diante da inversão de valores, da mercantilização dos conhecimentos, da matéria viva e seus processos, do aprofundamento das desigualdades e da injustiça, “da vastidão do tempo e da imensidão do universo, é um imenso prazer para mim, dividir” esse “planeta e” essa “época com” vocês. Carl

Sagan

Àqueles que intencionalmente colaboraram com leituras, discussões, materiais, força física, recurso, ouvidos e abraços, que confiaram e acreditaram nessa proposta.

Àqueles também, que inconscientemente tornaram esse processo objeto, pelos horizontes apresentados, pelos nortes indicados, pelos abraços, sorrisos e olhares, pela força e companhia, lado a lado nessa caminhada, pelas experiências vividas e trocadas, pela humanidade e senso de justiça e igualdade dentro de vocês.

O meu mais profundo e sincero obrigada!

“A dúvida é se a civilização pode mesmo travar esta guerra contra a vida sem se destruir e sem perder o direito de se chamar de civilizada.” “Estamos correndo todo esse risco para quê? Precisamos urgentemente acabar com essas falsas garantias, com o adoçamento das amargas verdades. A população precisa decidir se deseja continuar no caminho atual, e só poderá fazê-lo quando estiver em plena posse dos fatos.”

- Rachel Carson

RESUMO

O modelo do agronegócio é fonte de múltiplos estressores ao meio ambiente. Dentre eles, o uso extensivo de agrotóxicos tem promovido a contaminação em larga escala dos diversos compartimentos da biosfera, e dessa forma diversos organismos não-alvo podem ser afetados adversamente. Os anfíbios são um dos grupos de vertebrados mais ameaçados por esta prática agrícola, especialmente devido a atributos morfofisiológicas e de história de vida, como a pele permeável e o ciclo de vida complexo. Embora tenham uma alta probabilidade de serem afetados pela prática agrícola hegemônica, anfíbios não são organismos teste padrão nos estudos oficiais da regulamentação de agrotóxicos. Neste estudo, nós determinamos o efeito do Roundup Original na sobrevivência de *Physalaemus cuvieri* e estimamos a CL50_{96h} para girinos em estágio inicial de desenvolvimento. O perfil cinético do glifosato nos aquários foi determinado ao longo do ensaio agudo. Determinamos também o efeito da exposição prolongada (12 dias) a concentrações ambientalmente relevantes, sobre a atividade da acetilcolinesterase (AChE). O Roundup foi capaz de afetar a sobrevivência dos girinos nas concentrações testadas, com uma CL50_{96h} estimada de 6,1 mg i.a.L⁻¹. Os resultados da química analítica sugerem a absorção completa das concentrações de glifosato pelos girinos de *P. cuvieri*, evidenciando a maior suscetibilidade dos anfíbios, provavelmente associada como a alta permeabilidade do tegumento dentro desse táxon. A exposição prolongada ao Roundup foi capaz de reduzir a atividade da AChE. A inibição desta enzima prejudica a transmissão do impulso nervoso nas sinapses colinérgicas e esta associada a alterações no repertório comportamental de muitos vertebrados, incluindo anfíbios anuros. Portanto, a exposição a concentrações ambientalmente relevantes de Roundup pode afetar a sobrevivência bem como ter impactos negativos na aptidão individual, o que num cenário de exposição crônica pode comprometer o sucesso da população, contribuindo assim significativamente para declínios locais.

Palavras-chave: AChE; Anuros; Agrotóxicos; Química analítica; Glifosato; CL50.

ABSTRACT

Industrial agriculture can change and impact natural systems in several ways. Among them, the extensive use of agrochemicals has promoted large-scale contamination of all environmental compartments, which has enabled that several non-target organisms could be adversely affected. Amphibians are one of the most threatened vertebrate groups by these agricultural practices. Its high level of susceptibility comes from specialized life history and morphophysiological traits, such as skin permeability and complex life cycles. Although it has a high probability of being affected by industrial agriculture practices, amphibians ecotoxicological studies are not required in pesticide regulation protocols. In this study, we assessed, under laboratory conditions, survival in 96h as well as acetylcholinesterase (AChE) activity in a long-term exposure (12d) of *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leptodactylidae) exposed to Roundup Original. In acute bioassays, survival was reduced when concentration of roundup rises, and the estimated LC50 was 6.1 mg a.i.L⁻¹. An analytical determination of glyphosate residues in acute assay suggests that tadpoles had completely absorbed this compound, evidencing a greater susceptibility of amphibians, probably linked to the high skin permeability. The chronic exposure reveals that sub-lethal concentrations of Roundup significantly inhibited AChE activities in tadpoles in a concentration-dependent fashion. The highest inhibition of AChE (38%) we found, were detected in tadpoles exposed to 4 mgL⁻¹. Therefore, because AChE plays an important role in neurotransmission, any changes in the activity of this particular enzyme can impair tadpole performance and decrease survival, effects that scaled up to population dynamics.

Key-words: AchE, Anura, Pesticides, Analytical determination of glyphosate; LC50.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. OBJETIVOS.....	14
2.1. OBJETIVO GERAL	14
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
3. MATERIAL E METODOS	15
3.1. SISTEMA - TESTE.....	15
3.2. AGROTÓXICO – TESTE	15
3.3. COLETA E MANUTENÇÃO	16
3.4. BIOENSAIOS.....	17
3.4.1. Exposição Aguda	17
3.4.2. Exposição crônica.....	18
3.5. ANÁLISE BIOQUÍMICA	19
3.6. ANÁLISE QUÍMICA	20
3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	20
4. RESULTADOS.....	20
4.1. BIOENSAIO AGUDO	20
4.1.1. Química analítica e perfil cinético do glifosato	21
4.1.2. Sobrevivência e estimativa da CL50.....	22
4.2. BIOENSAIO CRÔNICO	23
4.2.1. Atividade da Acetilcolinesterase	23
5. DISCUSSÃO	24
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	32
REFERÊNCIAS.....	33

1. INTRODUÇÃO

“As melhores e mais evoluídas tecnologias são aquelas que não destroem a base sobre a qual vivemos”.

- Vandana Shiva

Um fato ecológico básico é que os indivíduos produzem e reproduzem a vida a partir das suas interações com meio. E como resultado dessas relações, a atividade dos indivíduos altera, em alguma medida, os sistemas onde vivem, assim como têm suas respostas influenciadas pelas mudanças no ambiente. Entretanto, ao longo dos últimos 200 anos, a extensão e a natureza das modificações causadas pela atividade humana têm mudado substancialmente, atingindo níveis de produção e consumo extraordinários, especialmente a partir da segunda metade do século passado (VITOUSEK *et al.* 1997; STEFFEN *et al.*, 2007, 2015b). Logo, é evidente que a magnitude deste consumo de energia e materiais, implica em alterações de dimensão correspondente nos sistemas naturais.

Para se ter uma ideia, nós alteramos aproximadamente metade da superfície terrestre, mudamos a composição da atmosfera, fixamos mais nitrogênio atmosférico do que todas as fontes terrestres naturais combinadas, mais da metade da água doce disponível está sob nossas demandas, movemos mais sedimentos do que os processos naturais, perturbamos diversos ciclos biogeoquímico, bem como aceleramos significativamente as taxas de extinção (VITOUSEK *et al.* 1997; ROCKSTRÖM *et al.*, 2009; BARNOSKY *et al.*, 2001; ARTAXO, 2014; STEFFEN *et al.* 2015a). Portanto, estamos interferindo em uma variedade de processos ecológicos e históricos, que tem colocado em risco a manutenção de diversos componentes da biodiversidade e, por conseguinte, o funcionamento dos ecossistemas (CHAPIN *et al.*, 2000; HOOPER *et al.*, 2012)

Ao longo desses últimos 200 anos, houve grande desenvolvimento da tecnologia e industrialização da economia. Da mesma forma, a agricultura também assume um modelo capitalista de produção e expansão, expressivamente após a segunda guerra mundial, com a implementação do “projeto político-ideológico” chamado de “revolução verde” (CERNEIRO *et al.*, 2015). Justificada sob o argumento falacioso do “mal necessário” para aumentar a produtividade e combater

a fome no mundo (e.g. BADGLEY *et al.*, 2007; FAO, 2015; ALEXANDRATOS; BRUINSMA, 2015) a agricultura se tornou uma das atividades antrópicas mais impactantes ao meio ambiente (TILMAN *et al.*, 2001, 2002; SCHIESARI GRILLITSCH, 2011), em função da produção de commodities e ampliação do capital privado.

A pressão imposta pelo modelo do agronegócio implica em externalidades socioambientais severas e que, portanto, não entram nos cálculos da contribuição econômica deste setor. Mas, se consideradas, revelam a insustentabilidade deste paradigma (TILMAN *et al.*, 2001; CARNEIRO *et al.*; 2015). O uso extensivo e intensivo da terra gera a perda e degradação dos recursos naturais. A expansão permanente das fronteiras agrícolas sobre os ecossistemas naturais, por meio da queimada ou corte, é o principal responsável pela perda e fragmentação dos habitats nativos (uso extensivo) (TILMAN *et al.*, 2001; SCHIESARI; GRILLITSCH, 2011). A homogeneização das culturas em grandes latifúndios cria um ecossistema artificial altamente simplificado, sem capacidade de autorregulação e manejo sustentável, tornando a utilização de fertilizantes e agrotóxicos, imperativa e crescente (uso intensivo) (THRUPP, 2000; KENNEDY, *et al.*, 2002). Logo, este modelo é uma fonte de múltiplos estressores ao meio ambiente, como a contaminação, a supressão, substituição e homogeneização das paisagens naturais, além do alto consumo de água, da degradação do solo e emissão de gases do efeito estufa, que impactam substancialmente o clima da biosfera e o funcionamento dos ecossistemas (CHAPIN *et al.*, 2000; TILMAN *et al.*, 2001, 2002; LAMBIN *et al.*, 2006; SCHIESARI; GRILLITSCH, 2011; HOOPER *et al.*, 2012).

Dentro desse contexto a contaminação do meio ambiente e dos alimentos por agrotóxico, devido ao seu uso massivo e a sua natureza biocida, tem se tornado uma preocupação mundial. Em alguns casos, estas substâncias estão em concentrações acima do que a ciência regulatória afirma ser o limite seguro de exposição, por exemplo, os resíduos de agrotóxicos nos alimentos (ANVISA, 2012; CARNEIRO *et al.*, 2015). Vale ressaltar que existem incertezas científicas no estabelecimento de tais níveis seguros de exposição, uma vez que existem claros limites metodológicos e de extrapolações de resultados nos estudos toxicológicos e de avaliação de risco. Pois, diversos fatores e mecanismos que ocorrem na natureza não podem ser integralmente reproduzidos e, assim, quantificados nos modelos experimentais e matemáticos. Logo, não são raros os resultados

controversos reportados na literatura (e.g. WILLIAMS; *et al.*, 2000; BENACHOUR; SÉRALINI, 2008). Nesse sentido, apesar dos modelos reducionistas serem úteis para isolar os fatores de interesse e dessa forma ligar os efeitos observados como resultado da ação direta dos agrotóxicos, eles não são suficientes e devem ser tomados com precaução na avaliação de questões que possam colocar em risco a saúde humana e da natureza de maneira tão difusa. Assim, grande parte dos estudos que respaldam e legitimam a liberação e utilização destas substâncias, podem estar subestimando o impacto dos agentes químicos sobre os sistemas vivos (HOPKINS, 2007; CARNEIRO *et al.*, 2015). Além do mais, os estudos que avaliam a segurança dos agrotóxicos nos processos de registro são de responsabilidade das empresas desenvolvedoras da tecnologia. E como bem observado por Smith (2009) o debate a respeito dos potenciais efeitos adversos dos agrotóxicos são obscurecidos pelas conexões de poder entre as poderosas multinacionais da biotecnologia de um lado e os governos e cientistas receptivos, de outro.

Muito embora os agrotóxicos tenham o objetivo de atingir apenas um grupo determinado de organismos de interesse agrônômico (espécies-alvo), eles podem atingir indiscriminadamente uma série de outros organismos, porque a aplicação ocorre em sistemas abertos - complexos e heterogêneos – portanto, tem potencial para se difundir e acumular pelos diversos compartimentos da biosfera, transcendendo a escala espacial e temporal em que são lançados. Assim, diversos estudos têm demonstrado o impacto dos agrotóxicos sobre organismos-não alvo, que vão desde microrganismos até vertebrados. Tais estudos demonstram efeitos sobre o crescimento, desenvolvimento, reprodução, comportamento e sobrevivência, através de diferentes mecanismos de ação que podem ser transferidos e impactar não somente os indivíduos, mas também os níveis superiores da organização biológica (conforme revisado por KÖHLER; TRIEBSKORN, 2013).

O Brasil ocupa um lugar biogeográfico e político estratégico para estudos com essa abordagem. Pois, boa parte do seu território está localizada sobre regiões tropicais, áreas de alta entrada de energia e, portanto, de produtividade primária correspondente, que sustentam uma megadiversidade biológica e um alto grau de endemismos (LEWINSOHN; PRADO, 2003; FORZA *et al.*, 2010). Apresenta ainda, um vasto território, com recursos hídricos abundantes e grande variedade de solos e climas, que são áreas potenciais para expansão do agronegócio. Além do território favorável, existem diversos incentivos fiscais e de crédito (CARNEIRO *et al.*, 2015),

uma legislação Ambiental cada vez mais flexível, com mecanismos de fiscalização inoperantes e deficientes (AB'SÁBER, 2010; CARNEIRO *et al.*; 2015).

Como exemplo desse cenário, o Brasil é um dos maiores produtores e exportadores de produtos agropecuários do mundo (MAPA, 2015) com uma projeção de aumento na ordem de mais de 30% na área plantada para 2024 (OECD e FAO, 2015). Não surpreendente, desde 2008 é considerado o maior consumidor de agrotóxicos do mundo, que inclusive permite utilizar princípios ativos proibidos na União Européia, Estados Unidos e outros países (ANVISA, 2011; CARNEIRO, *et al.*, 2015). Logo a fronteira agrícola no Brasil avança convertendo extensos territórios de habitats nativos em grandes latifúndios de mono cultivo químico-dependente. Estas áreas incluem biomas de grande representatividade da biodiversidade global e de grande importância para manutenção do clima e outros serviços ecossistêmicos em diversas escalas (SCHIESARI; GRILLITSCH, 2011)

Dentre os organismos não-alvo atingidos pela prática agrícola dominante, os anfíbios são um dos táxons de vertebrados mais vulneráveis. Boa parte das suas espécies – 32.4 % segundo a IUCN (2016) – encontram-se ameaçadas, com uma estimativa de 43% das populações enfrentando declínio, em taxas consideradas as maiores do mundo (STUART *et al.* 2004).

Apesar das causas do declínio das populações de anfíbios estarem sendo extensivamente debatidas na literatura, não são completamente compreendidas devido à complexidade dos fatores envolvidos, mas em consenso são contexto dependentes, podendo ser multifatoriais e potencialmente sinérgicas. Os fatores causais, em grande parte, se devem à ação antropogênica (HOPKINS, 2007). Entretanto, algumas populações podem apresentar acentuadas flutuações ao longo do tempo, como parte do processo natural da dinâmica populacional das espécies e, portanto, certos declínios espúrios (DUNSON, 1992). Muito embora a partição do efeito destas duas causas seja algo de difícil realização, especialmente devido à escassez de dados de estudos populacionais de longo prazo (DUNSON, 1992), é evidente a contribuição da atividade humana em promover e intensificar esses processos. Mas, de maneira geral as hipóteses levantadas com relação aos fatores particulares que se acreditam estarem envolvidos são: a perda de habitat, radiação UV, doenças infecciosas emergentes, mudanças climáticas, introdução de espécies exóticas e ação de xenobióticos (como revisado por COLLINS; STORFER, 2003).

O uso de agrotóxicos tem sido correlacionado ao declínio de populações locais (SPARLING *et al.*, 2001; DAVIDSON *et al.*, 2002; DAVIDSON, 2004; WAGNER, *et al.*, 2013a). Contudo, ainda há grandes lacunas nos estudos ecotoxicológicos com anfíbios, pois além da maioria dos desenhos experimentais serem pouco realistas, há um reduzido número de pesquisas e de espécies apreciadas nestes estudos, especialmente na região neotropical, que concentra a maior diversidade desse táxon e é também a região com as maiores taxas de declínio (SCHIESARI *et al.*; 2007). Portanto, esse viés aumenta ainda mais o grau de incerteza dos efeitos destas misturas sobre as populações de anfíbios.

Adicionalmente, existe uma grande complexidade envolvida na avaliação dos impactos da contaminação ambiental. Os agrotóxicos podem exercer efeitos detrimentalmente agindo diretamente sobre os indivíduos, bem como indiretamente, por exemplo, a partir da influência sobre as populações recurso (RELEYA, 2005a, VERA *et al.*, 2010). As interações bióticas - como competição, predação, parasitismo - e os fatores abióticos têm a capacidade de modular a toxicidade dos poluentes químicos, assim como o toxicante de influenciar a suscetibilidade dos anfíbios a estes estressores (TSUI; CHU, 2003; RELYEA, 2005b; HAYES, *et al.*, 2006; MANN *et al.*, 2009; JONES *et al.*, 2011). Por fim, os agrotóxicos podem ter efeitos sutis, de expressão tardia no desenvolvimento, ou na dinâmica populacional, por meio da redução do fitness, ao longo das sucessivas gerações (HAYES *et al.*, 2006; MANN *et al.*, 2009; SEMLITSCH *et al.*, 2000; SANCHEZ *et al.*, 2014). Estes mecanismos somam-se a falta de estudos com relação às concentrações e o comportamento dos poluentes químicos no ambiente tornando assim difícil estabelecer uma relação causal entre a contaminação e os declínios (SCHIESARI *et al.* 2007; WAGNER *et al.*, 2013b). Portanto, estes fatores dificultam as avaliações dos perigos e dos riscos associados aos diversos organismos expostos. Todavia a contaminação por agentes químicos tem sido considerada uma pressão importante às populações de anfíbios (SCHIESARI *et al.* 2007).

Os anuros possuem atributos morfofisiológicos e de história de vida que os tornam particularmente vulneráveis à contaminação química (SCHIESARI; GRILLITSCH, 2011). Dentre estes, o ciclo de vida complexo da maioria das espécies causa dependência tanto do ambiente aquático quanto terrestre (WYMAN, 1990) e, portanto, aumentam a probabilidade de exposição, que pode ocorrer em um ou em ambos os ambientes (DUNSON, 1992). Além disso, perturbações em qualquer um

destes ambientes podem interromper o ciclo de vida, o que pode afetar a dinâmica populacional (HOPKINS, 2007). A alta permeabilidade do tegumento e do revestimento dos ovos também representa um papel importante na suscetibilidade, favorecendo a entrada de substâncias químicas por oferecer uma baixa resistência a essas trocas (SCHIESARI GRILLISTSCH, 2007).

Não obstante, além do efeito letal (RELYEA, 2005c), os efeitos subletais dos agrotóxicos reportados na literatura sobre os anfíbios anuros são os mais diversos, com potencial para afetar a sobrevivência e o sucesso reprodutivo, tendo como consequência a diminuição do recrutamento de indivíduos na população em longo prazo. Pois, eles podem alterar o desenvolvimento ontogenético, atributos de história de vida e do repertório comportamental (GURUSHANKARA *et al.*, 2007; BRUNELLI *et al.*, 2009). Podem também agir como disruptores endócrinos, imunossupressores e impactar diversos aspectos reprodutivos (HAYES, *et al.* 2002, 2006, 2010). São descritos ainda malformações, alterações metabólicas e danos ao DNA (LAJMANOVICH *et al.*, 2005, 2011; PELTZER *et al.*, 2011).

As larvas dos anfíbios apresentam uma alta plasticidade fenotípica, pois são capazes de alterar características biológicas em resposta as condições ambientais (LAURILA; KUJASALO, 1999, RELEYA, 2003). Dessa forma, os efeitos dos agrotóxicos sobre os anuros são passíveis de serem avaliados a partir da observação das suas respostas comportamentais, bioquímicas, fisiológicas, morfológicas e/ ou de atributos da história de vida, tornando-os bons modelos para a avaliação dos impactos destas substâncias sobre os sistemas biológicos.

As questões retratadas acima se aliam ao fato destes organismos não estarem incluídos nos estudos exigidos pelas agências reguladoras nos processos de registro e liberação de uso dos agrotóxicos, tornado este cenário ainda mais preocupante. Portanto, dada a escassez de estudos e incertezas dos impactos destas substâncias sobre a biota nativa, torna-se necessário ampliar nossos conhecimentos sobre os efeitos adversos destas substâncias, fortalecendo assim os debates em torno da liberação de uso destas substâncias, procurando assim garantir a preservação das populações bem como dos ambientes aos quais estão associados.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo avaliar a ecotoxicidade do o agrotóxico a base de glifosato, Roundup® Original (Monsanto), para girinos de *Physalaemus cuvieri* (Fitzinger, 1826) a partir da determinação dos efeitos letais e subletais.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o efeito do Roundup na sobrevivência dos girinos e estimar a CL50, em 96h;
- Determinar os efeitos neurotóxicos do Roundup® Original por meio da quantificação da atividade da acetilcolinesterase (AChE) após 12 dias de exposição.

3. MATERIAL E METODOS

3.1. SISTEMA - TESTE

Physalaemus cuvieri (FITZINGER, 1826) é uma espécie de anfíbio Anura pertencente à família Leptodactylidae, popularmente conhecida como rã-cachorro. Encontra-se amplamente distribuída na América do Sul, presente em quase todo território brasileiro, porção oriental do território paraguaio e nas regiões de Misiones e Entre Rios na Argentina (MIJARES *et al.*, 2010). É uma espécie abundante, com populações consideradas grandes e estáveis (MIJARES *et al.*, 2010; FROST, 2016). Características essas, que a torna um bom modelo biológico para estudos de ecotoxicologia.

É uma espécie de pequeno porte - em média 28,9 mm quando adulto - e hábitos noturnos. Os habitats de ocorrência vão desde áreas abertas e florestas. A estação reprodutiva se estende de Outubro a Março. As cortes, acasalamentos e posturas ocorrem principalmente em áreas abertas, tanto em poças permanentes quanto temporárias. As massas de ovos são depositadas em ninhos de espuma flutuante, frequentemente ancorados a vegetação marginal das poças (BOKERMANN, 1962; MIJARES *et al.*, 2010). As desovas contêm em média 475 ovos, com as primeiras larvas deixando o ninho de espuma cerca de 72h após a postura. Os girinos vivem no fundo dos corpos d'água e possuem uma dieta predominantemente herbívora. A fase larval dura em média de 45 a 60 dias, entretanto é bastante irregular (BOKERMANN, 1962; ANDRADE, 1995). Os corpos d'água utilizados para reprodução e desenvolvimento, podem estar associados a áreas agrícolas e, portanto, os girinos expostos a contaminação mais severa por agrotóxicos (SCHIESARI, obs. pessoais, *appud* MOUTINHO, 2013)

Os girinos são pequenos ($21,66 \pm 0,56$ mm) apresentam corpo oval em vista dorsal e globular deprimido em vista lateral, o focinho é arredondado e o disco oral é anteroventral (GONÇALVES, 2014). A fórmula dentária apresenta variações de 2(2)/3(1) (GONÇALVES, 2014) e 2/3(1) (BOKERMANN, 1962).

3.2. AGROTÓXICO – TESTE

O agrotóxico utilizado neste estudo foi o Roundup® Original (MONSANATO) contendo como ingrediente ativo 480 g L⁻¹ de glifosato (N-(fosfometil) glicina), na forma de sal de isopropilamina de glifosato (360 g L⁻¹ equivalente ácido) e 684 g L⁻¹ de ingredientes inertes. O glifosato é o agrotóxico mais utilizado no mundo e certamente o mais controverso com relação as suas propriedades toxicológicas e ecotoxicológicas. Os tratamentos foram baseados na concentração de glifosato e expressos em termos de miligramas (mg) de ingrediente ativo (i.a) por litro (L), não implicando, entretanto, que os efeitos resultantes sejam exclusivos do i.a.

3.3. COLETA E MANUTENÇÃO

Foram coletadas 6 desovas em corpos d'água lânticos, na localidade de Mandassaia no município de Campina Grande do Sul, Paraná, Brasil. Para o transporte, as desovas foram acondicionadas em sacos plásticos com um pouco de água do local. Em laboratório as desovas foram mantidas, individualizadas, em aquários de vidro com capacidade para 20 L contendo 5 L de água filtrada cada. Um pouco da água do local de coleta foi adicionado aos aquários. As larvas foram mantidas nessas condições até atingirem o estágio 25 de desenvolvimento segundo Gosner (1960). Após, os girinos foram transferidos e misturados entre as desovas, em aquários de vidro de 50 L, contendo 30 L cada, com o intuito de aumentar a área por indivíduo, reduzindo desta maneira possíveis efeitos da densidade sobre o crescimento e desenvolvimento das larvas, além de aumentar a variabilidade genética, tornando a avaliação da sensibilidade mais representativa em termos populacionais. Cerca de dois terços da água, dos tanques de criação, foram renovados a cada dois dias visando manter estáveis os parâmetros físico-químicos. Os girinos foram então mantidos sob aeração constante, fotoperíodo sincronizado ao do período de coleta – 14 h claro/10 h escuro – e alimentados a cada 24 h *ad libitum*, com uma mistura triturada de ração comercial para coelho e peixe na proporção 3:1 respectivamente. Para os indivíduos utilizados no experimento de exposição aguda, a alimentação foi interrompida 24 h antes do início da exposição. No caso dos indivíduos utilizados no experimento de exposição crônica, foram mantidos sob estas condições por 22 dias para crescimento e desenvolvimento, objetivando-se obter quantidade de material satisfatória para análise enzimática, tornando mais robusta a interpretações dos resultados.

A permissão de coleta, transporte e manutenção foi concedida pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio/IBAMA), Autorização 7745-1. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no uso Animal (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná sob protocolo 23075.128058/2016-4.

3.4. BIOENSAIOS

Os experimentos foram conduzidos em laboratório com fotoperíodo 14/10 h claro/escuro, utilizando como unidades experimentais aquários de vidro com capacidade de 20 L, contendo 7,5 L de água filtrada e aeração constante. As larvas foram selecionadas dos aquários de criação e distribuídas nos aquários experimentais aleatoriamente e aclimatadas por um período de 24h, antes do início das exposições.

Para tornar a preparação das concentrações teste mais acuradas, foram feitas soluções estoque, no mesmo dia das exposições, por diluição do produto formulado a 20 g L^{-1} (i.a) em água destilada.

Ao término dos experimentos os indivíduos sobreviventes foram removidos dos aquários e imediatamente eutanasiados em solução de benzocaína 300 mg L^{-1} . Os indivíduos sobreviventes do ensaio agudo e parte do ensaio crônico foram fixados em Formol 10%. As larvas destinadas à análise bioquímica, após a eutanásia foram evisceradas e armazenadas em freezer - 80°C , até a realização das análises.

3.4.1. Exposição Aguda

Foram utilizados girinos que se encontravam aproximadamente no estágio 25 de desenvolvimento *sensu* Gosner (1960). O desenho experimental contou com 4 grupos tratamento mais um grupo controle, replicados 6 vezes, totalizando 24 unidades experimentais com 15 indivíduos cada. As concentrações utilizadas partiram da concentração de glifosato estabelecida para águas doces de classe III no Brasil, $0,28 \text{ mg i.a. L}^{-1}$, segundo a resolução 357 do CONAMA (2005). As demais concentrações são valores crescentes e uniformes ao longo de uma escala logarítmica (0,00 - 0,28 - 2,8 - 5,6 - 8,4 mg i.a. L^{-1}). O intervalo de concentração foi

baseado em estudos prévios com anura (MANN e BIDWELL, 1999; HOWE *et al.*, 2004; COSTA e NOMURA, 2016) e incluem concentrações de Roundup Original ambientalmente relevantes (EDWARDS *et al.*, 1980; SOLOMON; THOMPSON, 2003; THOMPSON *et al.*, 2004). A duração do experimento foi de 96h, em sistema estático, período durante o qual as larvas não foram alimentadas. Ao final do experimento foi determinada a sobrevivência total.

Os parâmetros físico-químicos - pH, oxigênio dissolvido (OD), temperatura e amônia - foram aferidos no início, a cada 24 h e ao final do experimento (Tabela 1). Também a cada 24h, os aquários foram revisados e os indivíduos mortos contabilizados e retirados

3.4.2. Exposição crônica

Neste experimento foram utilizadas 18 larvas por unidade amostral, 3 grupos tratamentos e um grupo controle, replicados 5 vezes cada. O experimento foi conduzido ao longo de 12 dias em sistema semi-estático, com renovações de 2/3 da água e do contaminante, a cada 96 h e o recurso alimentar fornecido para os girinos a cada dois dias. As concentrações utilizadas foram estabelecidas a partir dos resultados obtidos para a CL50 no ensaio agudo, com o propósito de reduzir a mortalidade, permitindo assim capturar um potencial efeito do Roundup sobre a atividade enzimática. Os aquários foram revisados a cada 24 h e os indivíduos mortos retirados. A mensuração dos parâmetros físico-químicos (Ph, OD, temperatura e amônia) foi realizada no início, antes da segunda renovação e ao final (Tabela 1).

Ao termino do experimento, foram selecionados três indivíduos de cada unidade experimental para a análise bioquímica. Que foi realizada com a colaboração da professora Helena Cristina da Silva de Assis e da Doutoranda Sabrina Calado do departamento de Farmacologia do setor de Ciências Biológicas da UFPR.

TABELA 1- PARAMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA AO LONGO DOS BIOENSAIOS COM GIRINOS DE *Physalaemus cuvieri* EXPOSTOS AO ROUNDUP.

	AGUDO				CRÔNICO			
	pH	Oxigênio mg L ⁻¹	Temperatura °C	NH ₃ µg L ⁻¹	pH	Oxigênio mg L ⁻¹	Temperatura °C	NH ₃ µg L ⁻¹
E	7,35	6,99	22,71	1,5	7,13	6,75	23,96	4,0
SD	0,08	0,14	0,71	1,3	0,03	0,16	0,56	6,0
cv	1,11	2,01	3,12	-	0,48	2,36	2,33	-

E – Média;

SD – Desvio padrão;

cv – Coeficiente de variação.

3.5. ANÁLISE BIOQUÍMICA

Para a realização da análise da acetilcolinesterase (AChE) os girinos eviscerados foram homogeneizados na proporção 1:10 em tampão fosfato de potássio 0,1 pH 7,5, com auxílio de micro-homogeneizador. O homogeneizado foi centrifugado por 30 minutos a 4°C a 12.000 x g. e as frações sobrenadantes armazenadas em freezer -80 °C, para posterior determinação da concentração de proteína e quantificação da atividade da acetilcolinesterase.

A quantificação de proteínas totais foi realizada pelo método de Bradford (1976). Os homogenatos foram diluídos em uma proporção de 1:20. Após a diluição, 10 µL da amostra diluída foram pipetados em microplaca e adicionados 250 µL do reagente. A concentração de proteínas foi determinada a partir da comparação dos valores de absorbância com aqueles provenientes da curva padrão, realizada com albumina de soro bovino (BSA). A análise foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 620 nm.

Atividade da Acetilcolinesterase (AChE)

O homogenato foi diluído para obter uma concentração de 1 mg/mL de proteína. Uma alíquota de 50 µL da amostra diluída, 200 µL da solução de DTNB e 50 µL da solução de acetilcolina foram pipetadas em microplaca. A análise

enzimática foi realizada de acordo com método de Ellman *et al.* (1961) modificado para microplaca por Silva de Assis (1998) em espectrofotômetro com comprimento de onda de 415nm.

3.6. ANÁLISE QUÍMICA

O perfil cinético do Glifosato na água foi analiticamente verificado em cada réplica em todas as concentrações testadas ao longo do experimento agudo (96h), com amostras (4 ml) tomadas no início a cada 24 h e ao final. As concentrações foram determinadas por meio da espectrometria de massas, em equipamento Varian 320MS, com infusão direta a $50 \mu\text{L min}^{-1}$. A câmara foi mantida a 45°C , sob pressão de N_2 , 40 psi, e gás de secagem a 200°C . A voltagem na câmara foi de 4.000V e detector em 1.200V. A curva padrão foi elaborada com o padrão analítico de Glifosato (N-phosphonomethyl-glycin) (Glyphosate PESTANAL[®] - pureza 99,2% - Sigma-Aldrich Chemical Co.) em um intervalo de concentração entre 0,25 a 10 mgL^{-1} . Os resultados foram descritivamente expressos como média e desvio padrão.

3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A $\text{CL}_{50_{96h}}$ e seu respectivo intervalo de credibilidade, foram estimados utilizando inferência bayesiana via regressão logLogística (DELIGNETTE-MULLER *et al.*, 2016). Os dados de sobrevivência e atividade enzimática foram avaliados por meio de modelos lineares generalizados (GLM) ajustados a distribuição de probabilidades das variáveis respostas analisadas, assumindo uma distribuição gamma e função de ligação inversa para AChE e uma distribuição quasibinomial e função de ligação logit para sobrevivência. Teste de Tukey foi utilizado para as comparações *a posteriori*. O critério para significância foi $\alpha = 0,05$ e intervalo de confiança/credibilidade de 95%. Os delineamentos dos experimentos foram completamente aleatorizados.

4. RESULTADOS

4.1. BIOENSAIO AGUDO

4.1.1. Química analítica e perfil cinético do glifosato

A concentração de glifosato na água dos aquários foi determinada para o ensaio agudo no início a cada 24h e ao final (96h) da exposição. A média e desvio padrão das concentrações de glifosato mesuradas estão listadas na Tabela 2. Exceto pela menor concentração testada (110%), as soluções dosadas foram acuradas, apresentando um grau de variabilidade entre as concentrações analíticas e nominais de 3,9 a 5,5%. Portanto, as análises que seguem bem como as referências às concentrações utilizadas ao longo do texto, foram baseadas nas concentrações nominais. Nenhuma concentração de glifosato foi detectada nas amostras do grupo controle.

TABELA 2 – QUÍMICA ANALÍTICA: CONCENTRAÇÕES DE GLIFOSATO NA ÁGUA MENSURADAS NO INÍCIO DO ENSAIO AGUDO (96h) COM GIRINOS DE *Physalaemus cuvieri*.

Concentração de Glifosato (mg L ⁻¹)	
Nominal	Analítica
0,28	0,59 ± 0,11
2,8	2,90 ± 0,54
5,6	5,91 ± 1,25
8,4	7,94 ± 0,78

A concentração analítica está expressa em média ± desvio padrão.

A concentração de glifosato nos aquários com girinos diminuiu em média 65% a cada 24h de experimentação (Figura 1), de modo que em 72h nenhuma concentração testada estava acima do limite de quantificação (0,25 mg L⁻¹). Enquanto o decréscimo das concentrações nos aquários brancos foi em média de 18% ao longo de todo o período amostral (96h).

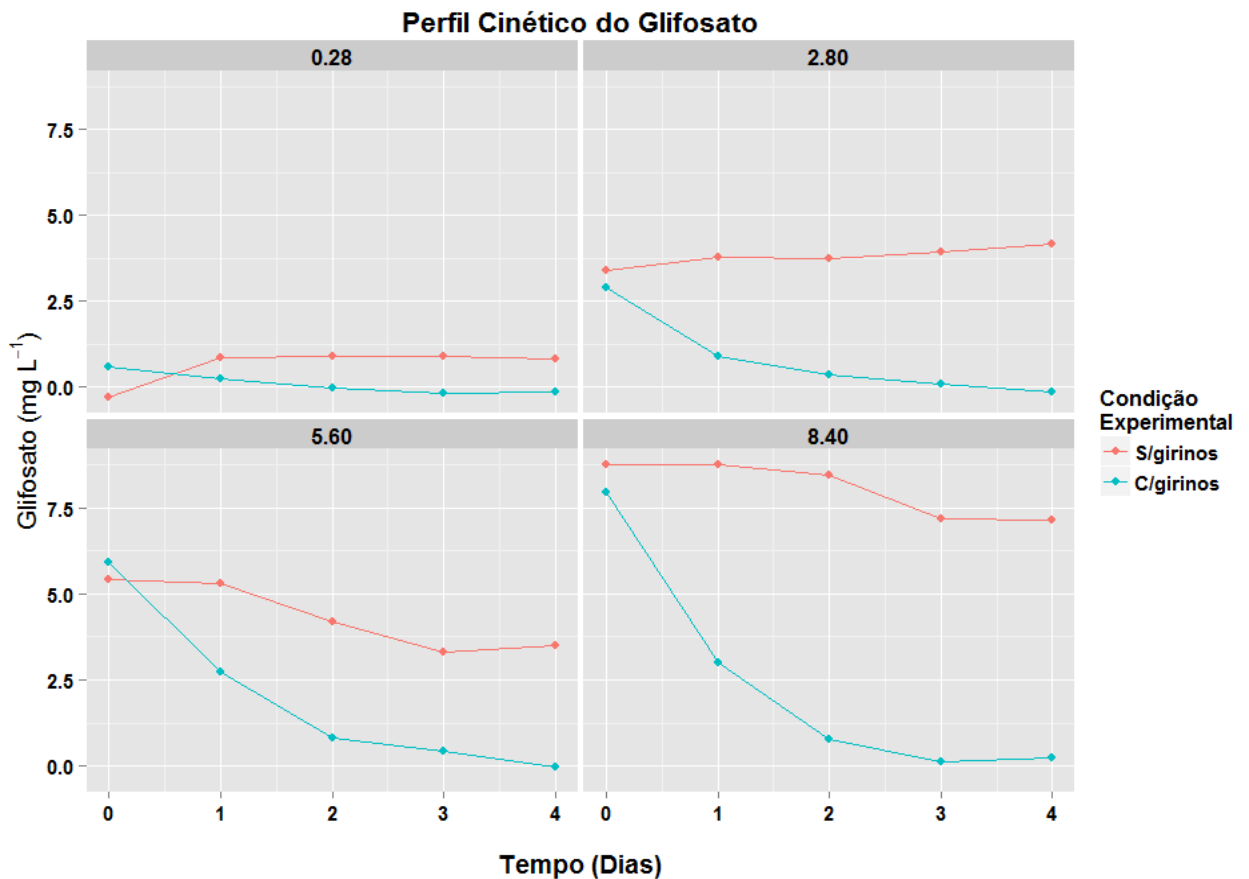


FIGURA 1: Perfil cinético do Glifosato. Cada quadrante representa uma concentração nominal de glifosato utilizada em mg L⁻¹ e as respectivas concentrações mensuradas para as diferentes condições experimentais ao longo de 96h. A linha em vermelho representa os aquários sem girinos e em azul os aquários com girinos. Os valores estão expressos como a média das réplicas. Valores abaixo de 0.25 mg L⁻¹, são aproximações uma vez que estão abaixo do limite de quantificação do método empregado.

4.1.2. Sobrevivência e estimativa da CL50

O Roundup apresentou efeito sobre a sobrevivência dos girinos (Deviance= 23,23, $\chi^2 < 0,001$, gl= 4), sendo significativo, com relação ao controle, a partir da terceira concentração testada - 5,6 mgL⁻¹ - (Figura 2). A CL50_{96h} estimada foi de 6,1 mgL⁻¹, com um intervalo de credibilidade (IC) de 95% de 5,9 a 6,4 (Figura 2). No grupo controle (0,00 mgL⁻¹) um individuo morreu, enquanto que não houve mortalidade para o grupo exposto a concentração de 0.28 mgL⁻¹ (n por grupo = 90 girinos).

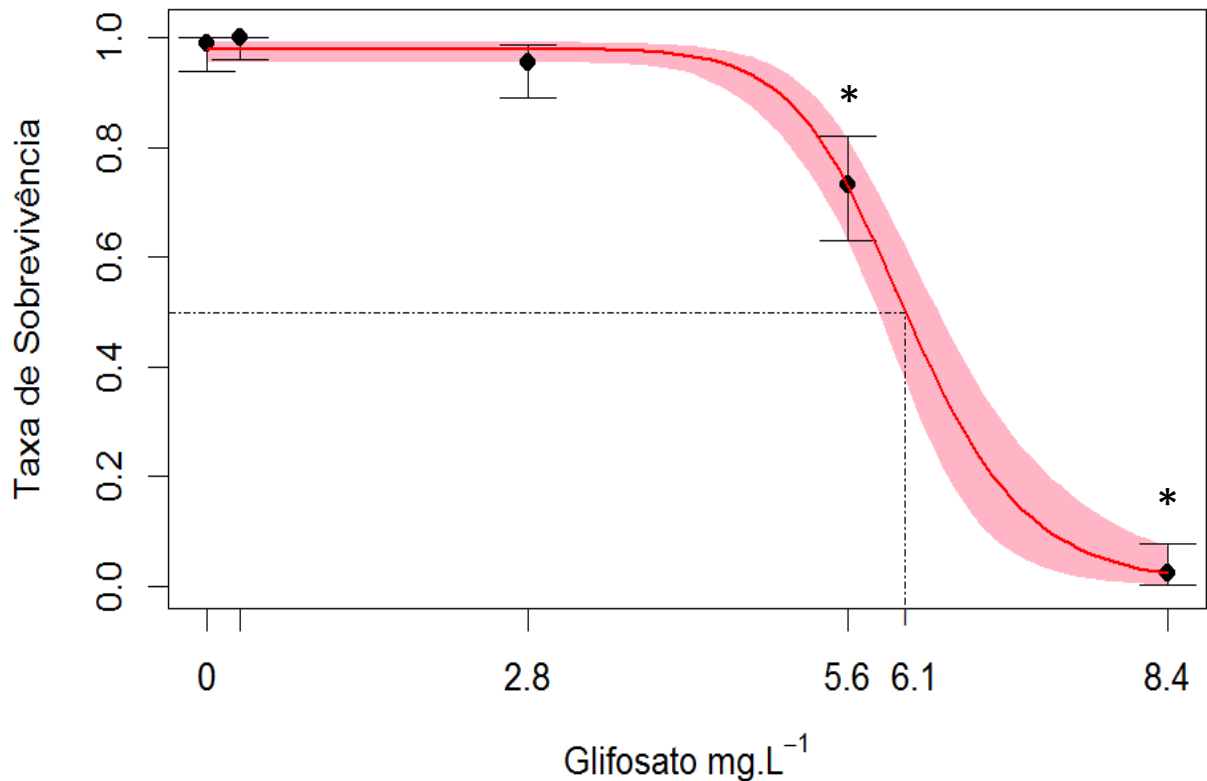


FIGURA 2 - Curva de sobrevivência de girinos de *Physalaemus cuvieri* em função da concentração de Roundup. A sobrevivência em cada tratamento está representada pela média (ponto) e intervalo de confiança (barras) de 95%. A curva em vermelho representa o modelo ajustado aos dados e em rosa o intervalo de credibilidade de 95% para os parâmetros estimados através do modelo. Diferenças significativas com relação ao controle estão indicadas por *.

4.2. BIOENSAIO CRÔNICO

4.2.1. Atividade da Acetilcolinesterase

A acetilcolinesterase teve sua atividade inibida marcadamente com o incremento da concentração de glifosato (Deviance=0.65239, $\chi^2 < 0,001$, gl=3), ou seja, de maneira concentração-dependente. As análises *a posteriori* mostraram diferenças significativas com relação ao grupo controle a partir da segunda concentração testada 2,8 mg L⁻¹ (Figura 3). O valor médio da atividade da AChE no controle foi 141,08 nmol min⁻¹ mg⁻¹ proteína, e o percentual médio máximo de inibição foi de 38%, para a maior concentração testada .

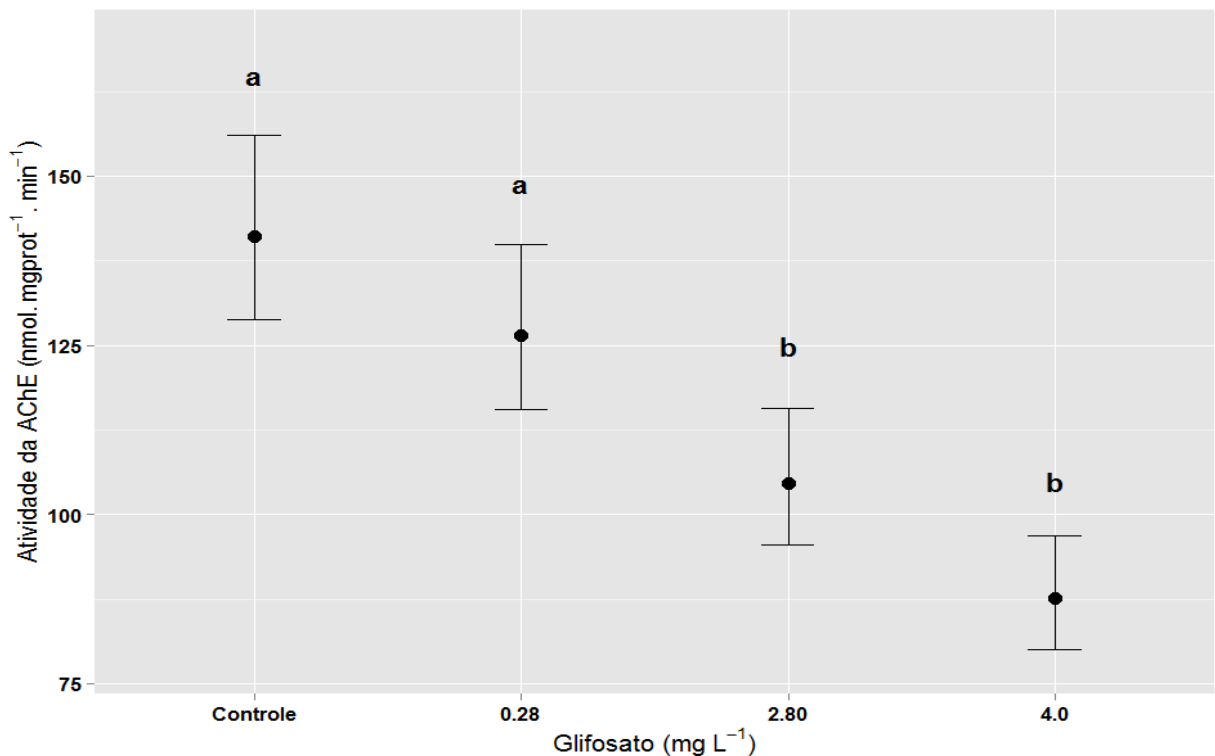


FIGURA 3: Atividade da acetilcolinesterase dos indivíduos de *Physalaemus cuvieri* após 12 dias de ensaio em sistema de renovação semi-estático. os resultados estão expressos em média (ponto) e intervalo de confiança (barras) de 95%. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais ($p < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

O Glifosato é o herbicida mais utilizado no Brasil e no mundo. O volume de glifosato aplicado em campo tem aumentado expressivamente nos últimos anos, principalmente após o desenvolvimento de cultivos transgênicos resistentes a este herbicida (BENBROOK, 2012). Existe mais de 750 formulações comerciais – empregadas tanto em áreas agrícolas e florestais, quanto em áreas urbanas e residenciais – dentre as quais o mais consumido é o Roundup®- Monsanto (GUYTON *et al.*, 2015). Portanto, seu uso é amplamente difundido e como consequência já foram registrados resíduos de glifosato em amostras do ar, da água da chuva e do abastecimento público, nos alimentos, no sangue, urina e leite humano, em várias regiões do mundo incluindo o Brasil (RUBIO *et al.*, 2014; GUYTON *et al.*, 2015; CARNEIRO, *et al.*, 2015). Embora os resultados reportados

na literatura científica (independente) e aqueles desenvolvidos pela ciência regulatória (oficial) sejam muitas vezes controversos (e.g. GASNIER *et al.*, 2009; MESNAGE *et al.*, 2016; EFSA, 2015; U.S. EPA, 2016) crescem as evidências dos efeitos adversos desta substância sobre a saúde humana e de uma diversidade de outros organismos. Com base nessas evidências, em revisão publicada em 2015, a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), órgão da Organização Mundial da Saúde (OMS), re-classificou o glifosato como “provável carcinógeno em humanos”. No Brasil o Glifosato encontra-se em reavaliação pela Anvisa desde 2008.

Da mesma maneira os efeitos do glifosato e de suas formulações sobre as espécies de anfíbios têm sido objeto de debate devido a conclusões inconsistentes - e.g. como discutido por THOMPSON *et al.*(2006) e RELYEA (2006) - . Embora estudos em laboratório e mesocosmos, em grande parte, demonstram efeitos deletérios para uma variedade de marcadores, sobre as larvas de anuros (RELYEA, 2011), não existem evidências de estudos experimentais em campo que demonstrem efeitos significativos na sobrevivência dos girinos (para formulações Vision, VisionMAX e Roundup WeatherMax) (EDGE *et al.*, 2014, EDGE *et al.*, 2012; LANCTÔT *et al.*, 2013; THOMPSON *et al.*, 2004; WOJTASZEK *et al.*, 2004). Estas incongruências, em parte, demonstram a dificuldade de se avaliar os impactos destas substâncias sobre os organismos, dada a complexidade e heterogeneidade espaço-temporal das condições bióticas e abióticas dos sistemas naturais, que podem tanto alterar as propriedades e disponibilidade das moléculas quanto a suscetibilidade dos organismos expostos, (e.g. CHEN *et al.* 2004; JONES *et al.* 2010, GANDI; CECALA, 2016). Logo, um exame exaustivo do comportamento toxicológico das substâncias sob todas as combinações possíveis de fatores influentes é praticamente impossível e certamente inviável. Assim, uma vez que estudos têm reportado efeitos adversos sobre esses organismos em concentrações ecologicamente relevantes (LANCTOT *et al.*, 2014, CHEN *et al.* 2004; EDGINTON *et al.* 2004), até mesmo em concentrações presumidamente seguras para o consumo humano, segundo a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, e comumente encontrada em rios (WILLIAMS, SEMLITSCH, 2010), dada a complexidade e incertezas associadas, os efeitos observados devem ser considerados com precaução.

No presente estudo, nós observamos efeitos letais e subletais do Roundup em girinos de *P. cuvieri*. Ambos os parâmetros avaliados responderam de maneira concentração-dependente. A taxa de sobrevivência, após exposição aguda em sistema estático, foi reduzida nos girinos em estágio inicial de desenvolvimento (25G), principalmente nos tratamentos de maior concentração. Já a atividade da AChE foi inibida após 12 dias de exposição, em sistema semi-estático, em concentrações ambientalmente relevantes.

Os anfíbios são um grupo bastante idiossincrático dentro de vertebrados e devido a atributos de história de vida, bem como de traços morfofisiológicos, estes organismos podem ser considerados particularmente suscetíveis a exposição e aos efeitos dos agrotóxicos (WAGNER *et al.*, 2013b). Dentre essas características morfológicas, a estrutura delgada e altamente permeável do tegumento, mais do que em qualquer outra ordem de vertebrado (UCHIYAMA; KONNO, 2006), permite o envolvimento em processos fisiológicos fundamentais, como a respiração, balanço osmótico e iônico (DUELLMAN; TRUEB, 1994). Dessa forma, o tegumento impõe pouca resistência à passagem de moléculas, como pode ser sugerido a partir da análise do perfil cinético do glifosato do presente trabalho, onde observamos uma redução média da concentração de glifosato de 88% em 48 h de experimentação nos aquários com girinos, tempo a partir do qual não foram mais registradas concentrações acima do limite de quantificação (0,25 mg L⁻¹). Enquanto, as concentrações nos aquários brancos se mantiveram aproximadamente estáveis ao longo de 96h. Dessa maneira, o glifosato sofreu pouca, ou nenhuma fotólise e/ou hidrólise, uma vez que a sua degradação se deve majoritariamente pela ação de microrganismos do solo e a volatilização é desprezível, devido à sua baixa pressão de vapor (GIESY *et al.*, 2000). Logo, este decréscimo nos aquários com girinos sugere a absorção do glifosato por esses indivíduos. Entretanto para confirmar esta hipótese de maneira inequívoca bem como para uma melhor compreensão da toxicocinética do glifosato nos girinos, seriam necessárias análises complementares.

Numa perspectiva comparativa, em peixes Sinhorin *et al.* (2014) observaram uma redução de aproximadamente 11% da concentração de glifosato/Roundup nos aquários experimentais ao longo de 96 h, em um ensaio conduzido em laboratório sob condições e procedimentos semelhantes ao presente trabalho. Estudos *in vivo* e *in vitro* relatam em torno de 2% de absorção percutânea do Roundup em humanos (WESTER *et al.* 1991). Embora estudos comparativos sejam escassos, Quaranta *et*

al. (2009) investigaram a absorção percutânea do glifosato entre anfíbios e mamíferos, com a difusão através da pele de um anfíbio ocorrendo de uma a duas ordens de magnitude mais rápida do que na pele dos mamíferos, indicando a maior suscetibilidade dos anfíbios. Já Widder e Bidwell (2006) utilizando outro organosfosforado, observaram uma redução de 90% na concentração do contaminante em 96 h de ensaio. Portanto, embora estas comparações sejam grosseiras, no que diz respeito às disparidades entre metodologia e condições experimentais, elas são úteis para evidenciar a contribuição da morfofisiologia da pele à maior suscetibilidade dos anfíbios, com relação aos demais vertebrados. Outro aspecto que pode influenciar a absorção, é a razão entre área de superfície e volume, que por razões históricas - como aquelas relacionadas às adaptações que permitiram à transição do ambiente aquático para o terrestre - foi otimizado em anfíbios, e pode contribuir com a alta taxa de absorção encontrada para *P. cuvieri*.

Tais observações são especialmente importantes, pois apesar do glifosato ter uma grande tendência em adsorver a matéria orgânica e as partículas de solo os girinos podem rapidamente absorve-lo antes que se torne bio-indisponível (Amarante *et al.*, 2002, TSUI; CHU, 2004; Li *et al.*, 2005; Relyea, 2005c). Ademais, além da rota de absorção cutânea, estes organismos podem absorver tais moléculas a partir da dieta, o que é potencializado nesses organismos que possuem hábitos filtradores diversos. Muito embora, ainda não se tenha clareza dos mecanismos pelos quais o glifosato adsorvido possa se tornar biodisponível após sua ingestão, Chen *et al.* (2004) nos dá evidências de que essa pode ser uma importante rota de exposição. Neste estudo, Chen *et al.* (2004) observaram que o tratamento contendo uma concentração menor de recurso alimentar, atrasou ligeiramente a mortalidade dos girinos expostos ao Roundup, quando comparado ao tratamento com alta concentração de recurso, porém, com a mesma de glifosato, o que implicaria que a sobrevivência pode ser aumentada pela redução da concentração de glifosato absorvida via sistema digestivo.

Apesar de o glifosato ser considerado praticamente não tóxico ou de baixa toxicidade para animais, incluindo anfíbios (MANN AND BIDWELL 1999; GIESY *et al.*, 2000), existem efeitos subletais importantes para larvas de anuros (RISSOLI *et al.*, 2016). Mas, muito embora o ingrediente ativo seja o principal, quando não o único alvo das agências reguladoras, ele não é o produto utilizado em campo, ao quais os diversos organismos estão em contato, e dessa forma estas conclusões

não podem ser simplesmente extrapoladas às formulações comerciais. Como exemplo, estudos prévios têm demonstrado que diferentes formulações comerciais diferem no seu potencial de toxicidade (WILLIAMS *et al.*, 2010; LAJMANOVICH *et al.*, 2011; RISSOLI *et al.*, 2016). Além disso, os formulados, principalmente com sistemas surfactantes POEA, presente no Roundup Original, podem causar efeitos adversos substanciais, letais e subletais, sobre os anfíbios em concentrações ambientalmente relevantes (TSUI; CHU, 2003; EDGINTON *et al.*, 2004; MOORE *et al.*, 2015). Entre esses efeitos estão a má-formação (LAJMANOVICH *et al.*, 2003), danos no DNA (CLEMENTS *et al.*, 1997), disrupção endócrina (PERKINS *et al.*, 2000), imunossupressão (ROHR *et al.*, 2008), alterações bioquímicas (LAJMANOVICH *et al.*, 2011), comportamentais (GANDHI; CECALA, 2016) e de história de vida (HOWE *et al.*, 2004; MANN; BIDWELL, 2000; WILLIAMS; SEMLITSCH, 2010; JONES *et al.*, 2010).

Neste trabalho observamos que o Roundup foi capaz de afetar a sobrevivência dos girinos nas concentrações testadas, com uma $CL_{50_{96h}}$ estimada de 6,1 mg i.a. L^{-1} . Esse valor de CL_{50} pode ser considerado como Moderadamente Tóxico segundo os critérios da U.S. EPA ou Muito Tóxico segundo critérios do IBAMA, para as larvas de *P. cuvieri*, em estágio inicial de desenvolvimento. As larvas de diferentes espécies de anuros, expostas a uma mesma concentração de glifosato, são conhecidas por apresentarem respostas com diferentes níveis de sensibilidade (EDGINTON *et al.*, 2004, RELYEA; JONES, 2009), que vão desde pouco tóxico até altamente tóxico para diferentes formulações de glifosato (EDGINTON *et al.*, 2004; HOWE *et al.*, 2004; RELEYA, 2005c; RELEYA; JONES, 2009). O nível da variação na sensibilidade entre diferentes espécies pode ser filogeneticamente dependente, ao nível de família (HAMMOND *et al.*, 2012). Mesmo uma única espécie pode apresentar populações com diferentes níveis de tolerância de tal forma que, em alguns casos, a variação intraespecífica pode ser maior do que a variação interespecífica (BRIDGES; SEMLITSCH, 2000; HAMMOND *et al.*, 2012). Como pode ser o caso de *Physalaemus cuvieri* quando comparamos nossos resultados com Costa & Nomura (2015), onde a $CL_{50_{96h}}$ estimada foi de 2,13 mg i.a. L^{-1} para esta mesma espécie exposta ao Roundup[®]. As diferenças na tolerância entre populações de uma mesma espécie podem ser determinadas por efeitos genéticos, ambientais, maternos (*e.g.* PIERCE; SIKAND, 1985; PIERCE; HARVEY, 1987; SEMLITSCH *et al.*, 2000) ou mesmo pela forma de operacionalização do

experimento. No caso específico de *P. cuvieri*, muito embora as condições e desenho experimental tenham sido semelhantes, especialmente com relação à temperatura e pH, elas não podem ser descartadas. De maneira geral, a única forma de determinar o padrão e os mecanismos associados com variações populacionais em características biológicas é por meio de experimentos. No entanto, estas observações de variação populacional na tolerância, possuem implicações práticas importantes para as estimativas dos parâmetros nos estudos ecotoxicológicos oficiais, como observado por Wagner *et al.* (2003b), pois usualmente são utilizados indivíduos de uma única população como representativo da sensibilidade desta espécie, que pode não refletir a resposta média das diversas populações *in situ*.

Estudos recentes têm centrado esforços em elucidar os mecanismos de toxicidade do glifosato e suas formulações, com relação aos efeitos não alvos, alguns mecanismos têm sido descritos, contudo as bases moleculares ainda são pouco conhecidas. Todavia, compostos organofosforados são amplamente conhecidos na literatura como tendo atividade biológica anticolinesterásica, principalmente por meio da interação eletrofílica com um resíduo de serina, presente no sítio ativo esterásico da acetilcolinesterase (O'BRIEN, 1963). A AChE é uma enzima amplamente conservada em metazoários triploblásticos, surgindo junto com o desenvolvimento do sistema colinérgico neste clado (PEZZEMENTI; CHATONNET, 2010). Esta enzima é responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina na fenda sináptica e placa motora, controlando assim, a concentração da acetilcolina e interrompendo a sinalização dos receptores (nicotínicos/muscarínicos) ativados. Portanto, possui um papel fundamental para o desempenho normal das atividades dos sistemas nervoso, tanto periférico quanto central, e motor. Conseqüentemente, sua inibição prejudica a transmissão do impulso nervoso nas sinapses colinérgicas. Em adição, evidências sugerem um importante papel da AChE na proliferação e diferenciação neural e no desenvolvimento da musculatura (BRIMIJOIN, 2005; BEHRA *et al.*, 2002). Com relação a sua conservação evolutiva, há uma grande variação na afinidade destas enzimas aos organofosforados entre os diferentes grupos de animais, e o nível desta variação entre os táxons, está associada ao grau de história evolutiva compartilhada (WIESNER *et al.*, 2007; WANG; MURPHY, 1982).

Diferentemente dos demais compostos organofosforados, inseticidas, o glifosato foi desenhado para ser um herbicida e, portanto, a inibição da AChE não

seria um efeito alvo. Entretanto, diversos estudos têm demonstrado o potencial do glifosato e formulados para inibir a atividade da AChE em vertebrados como peixes (MENÉNDEZ-HELMAN *et al.*, 2012), anfíbios (LAJMANOVICH *et al.*, 2011) e aves (OSTEN *et al.*, 2005). Portanto, a redução concentração dependente na atividade da AChE encontrada no presente trabalho, é consiste com um efeito produzido por glifosato.

Como esta enzima atua nas sinapses do sistema nervoso periférico e central, sua inibição pode alterar parâmetros fisiológicos e comportamentais. A maioria dos estudos com anfíbios que avaliam os efeitos de agrotóxico inibidores de colinesterase foca exclusivamente nas respostas bioquímicas, como neste estudo, sendo poucos os trabalhos que abordam de maneira integrada as respostas bioquímicas e a transferência dos efeitos aos níveis de organização biológica mais elevados. Contudo, embora pouco se saiba das implicações da inibição da AChE sobre processos ecológicos, a partir do seu efeito sobre a atividade dos organismos, reduções na atividade da AChE, bem como a exposição à inibidores de colinesterase como organofosforados e carbamatos, estão associadas a alterações na performance e repertório comportamental de muitos vertebrados (GRUE *et al.*, 1997), incluindo anfíbios (WIDDER; BIDWELL, 2008; GANDHI; CECALA, 2016). Estas alterações estão relacionadas a atividades essenciais dos indivíduos como forrageio (ROBLES-MENDONZA *et al.*, 2011), consumo de alimento (GURUSHANKARA *et al.*, 2007) natação (WIDDER; BIDWELL, 2008), respostas antipredatórias (BRIDGES, 1999, GANDHI; CECALA, 2016) e frequência respiratória (SINHORIN *et al.*, 2014), logo, essas alterações tem impactos negativos sobre a aptidão individual e, portanto, potencial em afetar a dinâmica de uma população. Por exemplo, Gandhi e Cecala (2016) reportam alterações no comportamento natatório e antipredatório em larvas de salamandra expostas ao Roundup, em concentrações inferiores as utilizadas no presente trabalho. Gandhi e Cecala (*op. cit*) sugerem a existência de efeitos indiretos do glifosato sobre a sobrevivência destes organismos, a partir do aumento da probabilidade de predação e/ou do arraste pela correnteza devido à fadiga muscular que levaria os girinos a habitats onde a sobrevivência seria reduzida. Da mesma forma, a exposição de girinos a um inseticida a base de carbamato afetou a habilidade natatória, o comportamento antipredatório e todos os níveis de atividade avaliados (BRIDGES, 1997, 1999). Em outro estudo larvas de anuro expostas ao endosulfan, um organofosforado, alterou todos os parâmetros

comportamentais observados, como a velocidade média do nado além de deprimir diferentes características relacionadas à atividade e ao uso do espaço. O nível destas alterações no repertório comportamental apresentadas após 48 h de exposição foram negativamente correlacionadas com a probabilidade de sobrevivência nos 18 dias subsequentes de observação (DENOËL *et al.*, 2013). Uma vez que os traços avaliados são dependentes da eficiência da musculatura, sua depressão pode ser hipotetizada como relacionada à redução da atividade da acetilcolinesterase (DENOËL *et al.*, 2013). Entretanto, muito embora estes compostos sejam conhecidamente inibidores de colinesterases, a atividade da AChE não foi quantificada nestes estudos (BRIDGES, 1997, 1999; DENOËL *et al.*, 2013; GANDHI; CECALA, 2016).

Nossos resultados indicam uma inibição máxima na maior concentração (4 mgL⁻¹) de 38%. Esse valor é inferior a inibição usualmente observada em vertebrados, ≥50%, como produzindo respostas como mortalidade ou alterações etológicas (GRUE *et al.*, 1997; WIDDER; BIDWELL, 2008, ROBLES-MENDONZA *et al.*, 2011). Entretanto, até onde sabemos, não existem estudos que avaliem essa relação para girinos e Roundup.

Nós escolhemos o cenário de exposição utilizado na tentativa de aproximar às condições de uma poça efêmera inserida dentro de uma área de cultivo, que recebeu doses em pulsos a partir da aplicação direta, deriva e/ou escoamento superficial devido a consecutivos eventos de chuva. As concentrações utilizadas podem ser realistas considerando a aplicação direta de concentrações recomendadas para uso em campo (moda das concentrações remendadas na bula do Roundup 1920 g/ha, maior concentração recomendada 5760 g/ha), em uma poça de 9 cm de profundidade com um volume de 7.5L (concentrações esperadas 2,06 mgL⁻¹ e 6,17 mgL⁻¹ para a moda e maior concentração respectivamente), portanto nesse cenário seria razoável esperar concentrações maiores que estas se somadas as entradas devido ao escoamento superficial e deriva.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Poças temporárias, próximo e/ou dentro de sistemas agrícolas são comuns, e representam um importante habitat de reprodução para *Physalaemus cuvieri* e de muitas outras espécies de anfíbios anuros. Considerando o baixo poder de diluição, devido ao volume pequeno, desses ambientes, as concentrações utilizadas refletem um cenário provável de exposição. Pois estes sistemas podem receber doses de agrotóxicos a partir do escoamento superficial, deriva e aplicações diretas. Portanto, nossos resultados demonstram que o Roundup tem potencial para afetar a sobrevivência e o funcionamento do sistema nervoso dos girinos. A partir disso, se consideramos as implicações fisiológicas envolvidas na disfunção do sistema colinérgico descritas na literatura, esse efeito pode afetar diversos aspectos da ecologia desta espécie, o que em um cenário de exposição crônica, pode prejudicar o sucesso da população, contribuindo assim significativamente para declínios locais.

REFERÊNCIAS

- AB'SÁBER, A. N. Do Código Florestal para o Código da Biodiversidade. **Biota Neotropica**, v. 10, n. 4, 2010.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Amostras analisadas por cultura e resultados insatisfatórios, 2011-2012. 2012.** Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a6ec1e8041a2bd0c9b969fde61db78cc/PARA+2011-2012.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 28 fev. 2016.
- ALEXANDRATOS, N.; BRUINSMA, J. World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision. **Global Perspective Studies Team FAO Agricultural Development Economics. 2012.** Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/016/ap106e/ap106e.pdf>>. Acesso em: 04 Mar 2016.
- AMARANTE JR. O. P., DOS SANTOS, T. C. R., BRITO, N. M., RIBEIRO, M. L. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Quim. Nova**, v. 25, n. 4, p. 589-593, 2002.
- ANDRADE, G. V. **A história de vida de *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leptodactylidae) em um ambiente temporário.** Tese de Doutorado, Campinas, Universidade Estadual de Campinas, p.185, 1995.
- ARTAXO, P. Uma nova era geológica em nosso planeta: o Antropoceno? **Revista USP**, n. 103, p. 13-24, 2014.
- BADGLEY, C.; MOGHTADER, J.; QUINTERO, E.; ZAKEM, E.; CHAPPELL, M. J.; AVILES-VAZQUEZ, K., .; SAMULON, A.; PERFECTO, I. Organic agriculture and the global food supply. **Renewable agriculture and food systems**, v. 22, n. 02, p. 86-108, 2007.
- BARNOSKY, A. D., MATZKE, N., TOMIYA, S., WOGAN, G. O., SWARTZ, B., QUENTAL, T.; *et al.* Has the Earth's sixth mass extinction already arrived? **Nature**, v. 471, n. 7336, p. 51-57, 2011.
- BEHRA, M., Cousin, X., Bertrand, C., Vonesch, J. L., Biellmann, D., Chatonnet, A., & Strähle, U. Acetylcholinesterase is required for neuronal and muscular development in the zebrafish embryo. **Nature neuroscience**, v. 5, n. 2, p. 111-118, 2002.
- BENACHOUR, N.; SÉRALINI, G. E. Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic, and placental cells. **Chemical Research in Toxicology**, v. 22, n. 1, p. 97-105, 2008.
- BENBROOK, C. M. Impacts of genetically engineered crops on pesticide use in the US--the first sixteen years. **Environmental Sciences Europe**, v. 24, n. 1, p. 1, 2012.
- BOKERMANN, W. C. A. Observações biológicas sobre *Physalaemus cuvieri* Fitz., 1826 (Amphibia, Salientia). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 22, n. 4, p. 391-399, 1962.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, n. 1, p.248-254, 1976.
- BRIDGES, C. M. Effects of a pesticide on tadpole activity and predator avoidance behavior. **Journal of Herpetology**, v. 33, n. 2, p. 303-306, 1999.

BRIDGES, C. M. Tadpole swimming performance and activity affected by acute exposure to sublethal levels of carbaryl. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, n. 9, p. 1935-1939, 1997.

BRIDGES, C. M.; SEMLITSCH, R. D. Variation in pesticide tolerance of tadpoles among and within species of Ranidae and patterns of amphibian decline. **Conservation Biology**, v. 14, n. 5, p. 1490-1499, 2000.

BRIMIJOIN, S. Can cholinesterase inhibitors affect neural development? **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 19, n. 3, p. 429-432, 2005.

BRUNELLI, E.; BERNABÒ, I.; BERG, C.; LUNDSTEDT-ENKEL, K.; BONACCI, A.; TRIPEPI, S. Environmentally relevant concentrations of endosulfan impair development, metamorphosis and behaviour in *Bufo bufo* tadpoles. **Aquatic Toxicology**, v. 91, n. 2, p. 135-142, 2009.

CARNEIRO, F. F.; RIGOTTO, R. M.; AUGUSTO, L. G. D. S.; FRIEDRICH, K.; BURIGO, A. C. (Org). **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015.

CHAPIN III, F. S.; ZAVALETA, E. S.; EVINER, V. T.; NAYLOR, R. L.; VITOUSEK, P. M.; REYNOLDS, H. L.; HOOPER, D. U.; LAVOREL, S.; SALA O. E.; HOBBIE S. E.; MACK, M. C.; DÍAZ, S. (2000). Consequences of changing biodiversity. **Nature**, v.405, n. 6783, p.234-242, 2000.

CHEN, C. Y.; HATHAWAY, K. M.; FOLT, C. L. Multiple stress effects of Vision[®] herbicide, pH, and food on zooplankton and larval amphibian species from forest wetlands. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, n. 4, p. 823-831, 2004.

CLEMENTS, C.; RALPH, S.; PETRAS, M. Genotoxicity of select herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using the alkaline single-cell gel DNA electrophoresis (comet) assay. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 29, n. 3, p. 277-288, 1997.

COLLINS, J. P.; STORFER, A. Global amphibian declines: sorting the hypotheses. **Diversity and Distributions**, v. 9, n. 2, p. 89-98, 2003.

CONAMA 357. 2005. Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA). nº 357 de 17 de Março de 2005. Publicada no DOU nº 053, de 18/03/2005. p.58-63.

COSTA, R. N.; NOMURA, F. Measuring the impacts of Roundup Original[®] on fluctuating asymmetry and mortality in a Neotropical tadpole. **Hydrobiologia**, v. 765, n. 1, p. 85-96, 2016.

DAVIDSON, C.; SHAFFER, H. B.; JENNINGS, M. R. Spatial tests of the pesticide drift, habitat destruction, UV-B, and climate-change hypotheses for California amphibian declines. **Conservation Biology**, v. 16, n. 6, p. 1588-1601, 2002.

DAVIDSON, C. Declining downwind: amphibian population declines in California and historical pesticide use. **Ecological Applications**, v. 14, n. 6, p. 1892-1902, 2004.

DELIGNETTE-MULLER, M. L.; RUIZ, P.; CHARLES, S.; DUCHEMIN, W.; LOPES, C.; KON-KAM-KING, G.; VEBER, P. morse: MOdelling Tools for Reproduction and Survival Data in Ecotoxicology. R package version 2.1.1. 2016. <https://CRAN.R-project.org/package=morse>

DENOËL, M., LIBON, S., KESTEMONT, P., BRASSEUR, C., FOCANT, J. F., DE PAUW, E. Effects of a sublethal pesticide exposure on locomotor behavior: a video-tracking analysis in larval amphibians. **Chemosphere**, v. 90, n. 3, p. 945-951, 2013.

DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. **Biology of Amphibians**. JHU press, 1994.

DUNSON, W. A.; WYMAN, R. L.; CORBETT, E. S. A symposium on amphibian declines and habitat acidification. **Journal of Herpetology**, p. 349-352, 1992.

EDGE, C. B. THOMPSON, D. G., HAO, C., HOULAHAN, J. E. A silviculture application of the glyphosate-based herbicide VisionMAX to wetlands has limited direct effects on amphibian larvae. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 31, n. 10, p. 2375-2383, 2012.

EDGE, C. B., THOMPSON, D., HAO, C., HOULAHAN, J. The response of amphibian larvae to exposure to a glyphosate-based herbicide (Roundup WeatherMax) and nutrient enrichment in an ecosystem experiment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 109, p. 124-132, 2014.

EDGINTON, A. N., SHERIDAN, P. M., STEPHENSON, G. R., THOMPSON, D. G., BOERMANS, H. J. Comparative effects of pH and Vision® herbicide on two life stages of four anuran amphibian species. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, n. 4, p. 815-822, 2004.

EDWARDS, W. M.; TRIPLETT, G. B.; KRAMER, R. M. A watershed study of glyphosate transport in runoff. **Journal of Environmental Quality**, v. 9, n. 4, p. 661-665, 1980.

EFSA (European Food Safety Authority). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. **EFSA Journal**, v. 13 n.11, p. 107, 2015

ELLMAN, G. L.; COUTNEY, K. O.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88-95, 1961.

FAO, IFAD and WFP. 2015. **Achieving Zero Hunger: the critical role of investments in social protection and agriculture**. Rome, FAO. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i4951e.pdf>>. Acesso em: 05 Mar 2016.

FORZZA, R.C., org., et al. Catálogo de plantas e fungos do Brasil. Introdução: síntese da diversidade brasileira. Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, p. 19-42. Vol. 1, 2010. Disponível em: <<http://books.scielo.org/id/z3529/pdf/forzza-9788560035083-04.pdf>> acesso em: 05 Mar 2016.

FROST, D. R. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0. American Museum of Natural History, New York, USA, 2016. Disponível em: <<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>>. Acesso em: 06 Mar 2016.

GANDHI, J. S.; CECALA, K. K. Interactive effects of temperature and glyphosate on the behavior of blue ridge two-lined salamanders, *Eurycea wilderae*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 2016.

GASNIER, C., DUMONT, C., BENACHOUR, N., CLAIR, E., CHAGNON, M. C., SÉRALINI, G. E Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. **Toxicology**, v. 262, n. 3, p. 184-191, 2009.

GIESY, J. P.; DOBSON, S.; SOLOMON, K. R. Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide. In: **Reviews of environmental contamination and toxicology**. Springer New York, 2000. p. 35-120.

GONÇALVES, D. S. **Diversidade e chave de identificação para girinos ocorrentes em áreas de floresta com Araucária**. Dissertação de Mestrado, Curitiba, Universidade Federal do Paraná, 2014.

GOSNER, K. L. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. **Herpetologica**, v. 16, n. 3, p. 183-190, 1960.

GRUE, C. E.; GIBERT, P. L.; SEELEY, M. E. Neurophysiological and behavioral changes in non-target wildlife exposed to organophosphate and carbamate pesticides: thermoregulation, food consumption, and reproduction. **American Zoologist**, v. 37, n. 4, p. 369-388, 1997.

GURUSHANKARA, H. P.; KRISHNAMURTHY, S. V.; VASUDEV, V. Effect of Malathion on survival, growth, and food consumption of Indian cricket frog (*Limnonectes limnocharis*) tadpoles. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 52, n. 2, p. 251-256, 2007.

GUYTON, K. Z. et al. International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group ILF. Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. **Lancet Oncol**, v. 16, p. 490-491, 2015.

HAMMOND, J. I., JONES, D. K., STEPHENS, P. R., RELYEA, R. A. Phylogeny meets ecotoxicology: evolutionary patterns of sensitivity to a common insecticide. **Evolutionary Applications**, v. 5, n. 6, p. 593-606, 2012.

HAYES, T.; HASTON, K.; TSUI, M.; HOANG, A.; HAEFFELE, C.; VONK, A.. Herbicides: feminization of male frogs in the wild. **Nature**, v. 419, n. 6910, p. 895-896, 2002.

HAYES, T. B.; CASE, P.; CHUI, S.; CHUNG, D.; HAEFFELE, C.; HASTON, K.; *et al.* Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: are we underestimating the impact?. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, p. 40, 2006.

HAYES, T. B.; KHOURY, V.; NARAYAN, A.; NAZIR, M.; PARK, A.; BROWN, T.; *et al.* Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 10, p. 4612-4617, 2010.

HOOPER, D. U., ADAIR, E. C., CARDINALE, B. J., BYRNES, J. E., HUNGATE, B. A., MATULICH, K. L., GONZALES, A.; DUFFY, J. E.; GAMFELDT, L.; O'Connor, M. I. A global synthesis reveals biodiversity loss as a major driver of ecosystem change. **Nature**, v. 486, n. 7401, p. 105-108, 2012.

HOPKINS, W. A. Amphibians as models for studying environmental change. **Ilar Journal**, v. 48, n. 3, p. 270-277, 2007.

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.

JONES, D. K.; HAMMOND, J. I.; RELYEA, R. A. Roundup® and amphibians: the importance of concentration, application time, and stratification. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 29, n. 9, p. 2016-2025, 2010

JONES, D. K.; HAMMOND, J. I.; RELYEA, R. A. Competitive stress can make the herbicide Roundup® more deadly to larval amphibians. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, n. 2, p. 446-454, 2011.

KENNEDY, T. A.; NAEEM, S.; HOWE, K. M.; KNOPS, J. M.; TILMAN, D.; REICH, P. Biodiversity as a barrier to ecological invasion. **Nature**, v. 417, n. 6889, p. 636-638, 2002.

KÖHLER, H. R.; TRIEBSKORN, R. Wildlife ecotoxicology of pesticides: can we track effects to the population level and beyond?. **Science**, v. 341, n. 6147, p. 759-765, 2013.

LAJMANOVICH, R. C.; SANDOVAL, M. T.; PELTZER, P. M. Induction of mortality and malformation in *Scinax nasicus* tadpoles exposed to glyphosate formulations. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 70, n. 3, p. 0612-0618, 2003.

LAJMANOVICH, R. C. CABAGNA, M., PELTZER, P. M., STRINGHINI, G. A., ATTADEMO, A. M. Micronucleus induction in erythrocytes of the *Hyla pulchella* tadpoles (Amphibia: Hylidae) exposed to insecticide endosulfan. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 587, n. 1, p. 67-72, 2005.

LAJMANOVICH, R. C.; ATTADEMO, A. M.; PELTZER, P. M.; JUNGES, C. M.; CABAGNA, M. C. Toxicity of four herbicide formulations with glyphosate on *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) tadpoles: B-esterases and glutathione S-transferase inhibitors. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 60, n. 4, p. 681-689, 2011.

LAMBIN, E.F., GEIST, H.J., RINDFUSS, R.R.; Introduction: local processes with global impacts. In: LAMBIN, E.F., GEIST, H.J. (Eds.), **Land-Use and Land-Cover Change: Local Processes and Global Impacts**. The IGBP Series. **Springer-Verlag**, Berlin, Heidelberg, pp. 1–8, 2006.

LANCTÔT, C. ROBERTSON, C., NAVARRO-MARTÍN, L., EDGE, C., MELVIN, S. D., HOULAHAN, J., & TRUDEAU, V. L. Effects of the glyphosate-based herbicide Roundup WeatherMax® on metamorphosis of wood frogs (*Lithobates sylvaticus*) in natural wetlands. **Aquatic toxicology**, v. 140, p. 48-57, 2013.

LANCTÔT, C., NAVARRO-MARTÍN, L., ROBERTSON, C., PARK, B., JACKMAN, P., PAULI, B. D., TRUDEAU, V. L. Effects of glyphosate-based herbicides on survival, development, growth and sex ratios of wood frog (*Lithobates sylvaticus*) tadpoles. II: Agriculturally relevant exposures to Roundup WeatherMax® and Vision® under laboratory conditions. **Aquatic Toxicology**, v. 154, p. 291-303, 2014.

LAURILA, A.; KUJASALO, J. Habitat duration, predation risk and phenotypic plasticity in common frog (*Rana temporaria*) tadpoles. **Journal of Animal Ecology**, v. 68, n. 6, p. 1123-1132, 1999.

LEWINSOHON, T. M.; PRADO, P. I. **Biodiversidade Brasileira: Síntese do Estado Atual do Conhecimento**. 2003. Disponível em: <http://www2.mma.gov.br/sitio/index.php?ido=conteudo.monta&idEstrutura=72&idMenu=3516> Acesso em: 05 Mar 2016.

LI, F., WANG, Y., YANG, Q., EVANS, D. G., FORANO, C., & DUAN, X. Study on adsorption of glyphosate (N-phosphonomethyl glycine) pesticide on MgAl-layered double hydroxides in aqueous solution. **Journal of Hazardous Materials**, v. 125, n. 1, p. 89-95, 2005.

MANN, R. M., HYNE, R. V., CHOUNG, C. B., WILSON, S. P. Amphibians and agricultural chemicals: review of the risks in a complex environment. **Environmental Pollution**, v. 157, n. 11, p. 2903-2927, 2009.

MANN, R. M.; BIDWELL, J. R. Application of the FETAX protocol to assess the developmental toxicity of nonylphenol ethoxylate to *Xenopus laevis* and two Australian frogs. **Aquatic Toxicology**, v. 51, n. 1, p. 19-29, 2000.

MANN, R. M.; BIDWELL, J. R. The toxicity of glyphosate and several glyphosate formulations to four species of southwestern Australian frogs. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 36, n. 2, p. 193-199, 1999.

MENÉNDEZ-HELMAN, R. J., FERREYROA, G. V., DOS SANTOS AFONSO, M., & SALIBIÁN, A. Glyphosate as an acetylcholinesterase inhibitor in *Cnemidophorus maculatus*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 88, n. 1, p. 6-9, 2012.

MESNAGE, R. D., N., DE VENDOMOIS, J. S., SERALINI, G. E. Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. **Food and Chemical Toxicology**, v. 84, p. 133-153, 2015.

MIJARES, A.; RODRIGUES, M. T.; BALDO, D. *Physalaemus cuvieri*. **The IUCN Red List of Threatened Species 2010**. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/details/57250/0>> Acesso em: **06 Mar 2016**.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Exportação. Brasília DF, 2016. Disponível em:< <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/exportacao>>. Acessado em 12 out 2016.

MOORE, H.; CHIVERS, D. P.; FERRARI, M. CO. Sub-lethal effects of Roundup™ on tadpole anti-predator responses. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 111, p. 281-285, 2015.

MOUTINHO, M. F. **Ecotoxicidade comparativa dos herbicidas da cana-de-açúcar para larvas de anfíbios**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2013.

OECD, FAO. **Perspectivas agrícolas no Brasil: Desafios da Agricultura Brasileira 2015-2014**. 2015. Disponível em:<<https://www.fao.org.br/download/PA20142015CB.pdf>>. Acesso em:28/out/2016

OSTEN, J. R.; SOARES, A. M. V. M; GUILHERMINO, L. Black-bellied whistling duck (*Dendrocygna autumnalis*) brain cholinesterase characterization and diagnosis of anticholinesterase pesticide exposure in wild populations from Mexico. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n. 2, p. 313-317, 2005.

PELTZER, P. M.; LAJMANOVICH, R. C.; SANCHEZ, L. C.; ATTADEMO, A. M.; JUNGES, C. M.; BIONDA, C. L.; *et al.* MORPHOLOGICAL ABNORMALITIES IN AMPHIBIAN POPULATIONS. **Herpetological Conservation and Biology**, v. 6, n. 3, p. 432-442, 2011.

PERKINS, P. J.; BOERMANS, H. J.; STEPHENSON, G. R. Toxicity of glyphosate and triclopyr using the frog embryo teratogenesis assay—*Xenopus*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 19, n. 4, p. 940-945, 2000.

PEZZEMENTI, L.; CHATONNET, A. Evolution of cholinesterases in the animal kingdom. **Chemico-biological Interactions**, v. 187, n. 1, p. 27-33, 2010.

- PIERCE, B. A.; SIKAND, N. Variation in acid tolerance of Connecticut wood frogs: genetic and maternal effects. **Canadian journal of zoology**, v. 63, n. 7, p. 1647-1651, 1985.
- PIERCE, B. A.; HARVEY, J. M. Geographic variation in acid tolerance of Connecticut wood frogs. **Copeia**, p. 94-103, 1987.
- QUARANTA, A., BELLANTUONO, V., CASSANO, G., LIPPE, C. Why amphibians are more sensitive than mammals to xenobiotics. **PLoS One**, v. 4, n. 11, p. e7699, 2009.
- RELYEA, R. A. Predators come and predators go: the reversibility of predator-induced traits. **Ecology**, v. 84, n. 7, p. 1840-1848, 2003.
- RELYEA, R. A. The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. **Ecological Applications**, v. 15, n. 2, p. 618-627, 2005a.
- RELYEA, R. A. The lethal impacts of Roundup and predatory stress on six species of North American tadpoles. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 48, n. 3, p. 351-357, 2005b
- RELYEA, R. A. The lethal impact of Roundup on aquatic and terrestrial amphibians. **Ecological applications**, v. 15, n. 4, p. 1118-1124, 2005c.
- RELYEA, R. A. The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities: response. **Ecological applications**, v. 16, n. 5, p. 2027-2034, 2006.
- RELYEA, R. A.; JONES, D. K. The toxicity of Roundup Original Max[®] to 13 species of larval amphibians. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 28, n. 9, p. 2004-2008, 2009.
- RELYEA, R. A. Amphibians are not ready for Roundup[®]. In: **Wildlife Ecotoxicology**. Springer New York, p. 267-300, 2011.
- RISSOLI, R. Z., ABDALLA, F. C., COSTA, M. J., RANTIN, F. T., MCKENZIE, D. J., & KALININ, A. L. Effects of glyphosate and the glyphosate based herbicides Roundup Original[®] and Roundup Transorb[®] on respiratory morphophysiology of bullfrog tadpoles. **Chemosphere**, v. 156, p. 37-44, 2016.
- ROBLES-MENDOZA, C., ZÚÑIGA-LAGUNES, S. R., DE LEÓN-HILL, C. A. P., HERNÁNDEZ-SOTO, J., VANEGAS-PÉREZ, C. Esterases activity in the axolotl *Ambystoma mexicanum* exposed to chlorpyrifos and its implication to motor activity. **Aquatic toxicology**, v. 105, n. 3, p. 728-734, 2011.
- ROCKSTROM, J.; STEFFEN, W.; NOONE, K.; PERSSON, A.; CHAPIN III, F. S.; LAMBIN, E.; LENTON, T. M.; SCHEFFER, M.; FOLKE, C.; SCHELLNHUBER, H.; NYKVIST, B.; DE WIT, C. A.; HUGHES, T.; VAN DER LEEUW, S.; RODHE, H.; SORLIN, S.; SNYDER, P. K.; COSTANZA, R.; SVEDIN, U.; FALKENMARK, M.; KARLBERG, L.; CORELL, R. W.; FABRY, V. J.; HANSEN, J.; WALKER, B.; LIVERMAN, D.; RICHARDSON, K.; CRUTZEN, P.; FOLEY, J.. Planetary boundaries: exploring the safe operating space for humanity. **Ecology and Society**, 2009. Disponível em: <<http://www.ecologyandsociety.org/vol14/iss2/art32/>>. Acessado em: 26 fev. 2016.
- ROHR, J. R., RAFFEL, T. R., SESSIONS, S. K., & HUDSON, P. J. Understanding the net effects of pesticides on amphibian trematode infections. **Ecological Applications**, v. 18, n. 7, p. 1743-1753, 2008.

RUBIO, F., GUO, E. Survey of glyphosate residues in honey, corn and soy products. **Journal of Environmental & Analytical Toxicology**, v. 2015, 2015.

SANCHEZ, L. C., LAJMANOVICH, R. C., PELTZER, P. M., MANZANO, A. S., JUNGES, C. M., ATTADEMO, A. M. First evidence of the effects of agricultural activities on gonadal form and function in *Rhinella fernandezae* and *Dendropsophus sanborni* (Amphibia: Anura) from Entre Rios Province, Argentina. **Acta Herpetologica**, v. 9, n. 1, p. 75-88, 2014.

SCHIESARI, L.; GRILLITSCH, B.; GRILLITSCH, H. Biogeographic biases in research and their consequences for linking amphibian declines to pollution. **Conservation Biology**, v. 21, n. 2, p. 465-471, 2007.

SCHIESARI, L.; GRILLITSCH, B. Pesticides meet megadiversity in the expansion of biofuel crops. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 9, n. 4, p. 215-221, 2011.

SEMLITSCH, R. D.; BRIDGES, C. M.; WELCH, A. M. Genetic variation and a fitness tradeoff in the tolerance of gray treefrog (*Hyla versicolor*) tadpoles to the insecticide carbaryl. **Oecologia**, v. 125, n. 2, p. 179-185, 2000.

SILVA DE ASSIS, H. **HC Der Einsatz von Biomarkern zur Summarischen Erfassung von Gewässerverschmutzungen**. Tese de Doutorado apresentada na Universidade Técnica de Berlim, Alemanha. 99f, 1998.

SINHORIN, V. D. G., SINHORIN, A. P., TEIXEIRA, J. M. S., MILÉSKI, K. M. L., HANSEN, P. C., MOELLER, P. R., MOREIRA, P. S. A., BAVIERA, A. M., LORO, V. L. Metabolic and Behavior Changes in Surubim Acutely Exposed to a Glyphosate-Based Herbicide. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 67, n. 4, p. 659-667, 2014.

SMITH, J. M. **Roleta genética: riscos documentados dos alimentos transgênicos sobre a saúde**. João de Barro, 2009.

SOLOMON, K.; THOMPSON, D. Ecological risk assessment for aquatic organisms from over-water uses of glyphosate. **Journal of Toxicology and Environmental Health Part B: Critical Reviews**, v. 6, n. 3, p. 289-324, 2003.

SPARLING, D. W.; FELLERS, G. M.; MCCONNELL, L. L. Pesticides and amphibian population declines in California, USA. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, n. 7, p. 1591-1595, 2001.

STEFFEN, W.; CRUTZEN, P. J.; MCNEILL, J. R. The Anthropocene: are humans now overwhelming the great forces of nature. **AMBIO: A Journal of the Human Environment**, v. 36, n. 8, p. 614-621, 2007.

STEFFEN, W.; RICHARDSON, K.; ROCKSTRÖM, J.; CORNELL, S. E.; FETZER, I.; BENNETT, E. M.; BIGGS, R.; CARPENTER S. R.; DE VRIES, W.; WIT, C. A.; FOLKE, C.; GERTEN, D.; HEINKE, J.; MACE, G. M.; PERSSON L. M.; RAMANATHAN, V.; REYERS, B.; SORLIN, S.; Planetary boundaries: Guiding human development on a changing planet. **Science**, v. 347, n. 6223, p. 1259855, 2015.a.

STEFFEN, W.; BROADGATE, W.; DEUTSCH, L.; GAFFNEY, O.; LUDWIG, C. The trajectory of the Anthropocene: the great acceleration. **The Anthropocene Review**, v. 2, n. 1, p. 81-98, 2015.b.

STUART, S. N.; CHANSON, J. S.; COX, N. A.; YOUNG, B. E.; RODRIGUES, A. S.; FISCHMAN, D. L.; WALLER, R. W. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. **Science**, v. 306, n. 5702, p. 1783-1786, 2004.

THOMPSON, D. G. SOLOMON, K. R., WOJTASZEK, B. F., EDGINTON, A. N., & STEPHENSON, G. R. The Impact of Insecticides and Herbicides on the Biodiversity and Productivity of Aquatic Communities. The Impact of Insecticides and Herbicides on the Biodiversity and Productivity of Aquatic Communities. **Ecological Applications**, v.16, p.2022- 2027, 2006.

THOMPSON, D. G., WOJTASZEK, B. F., STAZNIK, B., CHARTRAND, D. T., & STEPHENSON, G. R. Chemical and biomonitoring to assess potential acute effects of Vision® herbicide on native amphibian larvae in forest wetlands. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 23, n. 4, p. 843-849, 2004

THRUPP, L. A. Linking agricultural biodiversity and food security: the valuable role of agrobiodiversity for sustainable agriculture. **International Affairs**, v. 76, n. 2, p. 283-297, 2000.

TILMAN, D.; FARGIONE, J.; WOLFF, B.; D'ANTONIO, C.; DOBSON, A.; HOWARTH, R.; SCHINDLER, D.; SCHLESINGER, W. H.; SIMBERLOF, D.; SWACKHAMER, D. Forecasting agriculturally driven global environmental change. **Science**, v. 292, n. 5515, p. 281-284, 2001.

TILMAN, D. et al. Agricultural sustainability and intensive production practices. **Nature**, v. 418, n. 6898, p. 671-677, 2002.

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, n. 7, p. 1189-1197, 2003.

TSUI, M. T. K; CHU, L. M. Comparative toxicity of glyphosate-based herbicides: aqueous and sediment porewater exposures. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 46, n. 3, p. 316-323, 2004.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). Glyphosate Issue Paper: Evaluation of Carcinogenic Potential EPA's Office of Pesticide Programs. Washington, DC, 2016. Disponível em: <goo.gl/4vhY7n>. Acesso em: 12 nov 2016

UCHIYAMA, M.; KONNO, N. Hormonal regulation of ion and water transport in anuran amphibians. **General and Comparative Endocrinology**, v. 147, n. 1, p. 54-61, 2006.

VERA, M. S., LAGOMARSINO, L., SYLVESTER, M., PÉREZ, G. L., RODRÍGUEZ, P., MUGNI, H. SINISTRO, R., FERRARO, M., BONETTO, C., ZAGARESE, H., PIZARRO, H. New evidences of Roundup® (glyphosate formulation) impact on the periphyton community and the water quality of freshwater ecosystems. **Ecotoxicology**, v. 19, n. 4, p. 710-721, 2010.

VITOUSEK, P. M.; MOONEY, H. A.; LUBCHENCO, J.; MELILLO, J. M. Human domination of Earth's ecosystems. **Science**, v. 277, n. 5325, p. 494-499, 1997.

WAGNER, N.; LÖTTERS, S. Possible correlation of the worldwide amphibian decline and the increasing use of glyphosate in the agrarian industry. **Bundesamt für Naturschutz (BfN), Federal Agency for Nature Conservation**, p. 202, 2013a.

WAGNER, N., REICHENBECHER, W., TEICHMANN, H., TAPPESER, B., & LÖTTERS, S. Questions concerning the potential impact of glyphosate-based herbicides on amphibians. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 32, n. 8, p. 1688-1700, 2013b.

WANG, C.; MURPHY, S. D. Kinetic analysis of species difference in acetylcholinesterase sensitivity to organophosphate insecticides. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 66, n. 3, p. 409-419, 1982.

WESTER, MELENDRES, J., SARASON, R., MCMASTER, J., MAIBACH, H. I. Glyphosate skin binding, absorption, residual tissue distribution, and skin decontamination. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 16, n. 4, p. 725-732, 1991.

WIDDER, P. D.; BIDWELL, J. R. Cholinesterase activity and behavior in chlorpyrifos-exposed *Rana sphenocephala* tadpoles. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, n. 9, p. 2446-2454, 2006.

WIDDER, P. D.; BIDWELL, J. R. Tadpole size, cholinesterase activity, and swim speed in four frog species after exposure to sub-lethal concentrations of chlorpyrifos. **Aquatic Toxicology**, v. 88, n. 1, p. 9-18, 2008.

WIESNER, J., KRÍŽ, Z., KUČA, K., JUN, D., & KOČA, J. Acetylcholinesterases – the structural similarities and differences. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 4, p. 417-424, 2007.

WILLIAMS, G. M.; KROES, R.; MUNRO, I. C. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 31, n. 2, p. 117-165, 2000.

WILLIAMS, B. K.; SEMLITSCH, R. D. Larval responses of three Midwestern anurans to chronic, low-dose exposures of four herbicides. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 58, n. 3, p. 819-827, 2010.

WOJTASZEK, B. F. STAZNIK, B., CHARTRAND, D. T., STEPHENSON, G. R., THOMPSON, D. G. Effects of Vision[®] herbicide on mortality, avoidance response, and growth of amphibian larvae in two forest wetlands. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, n. 4, p. 832-842, 2004.

WYMAN, R. L. What's happening to the amphibians? **Conservation Biology**, v. 4, n. 4, p. 350-352, 1990.