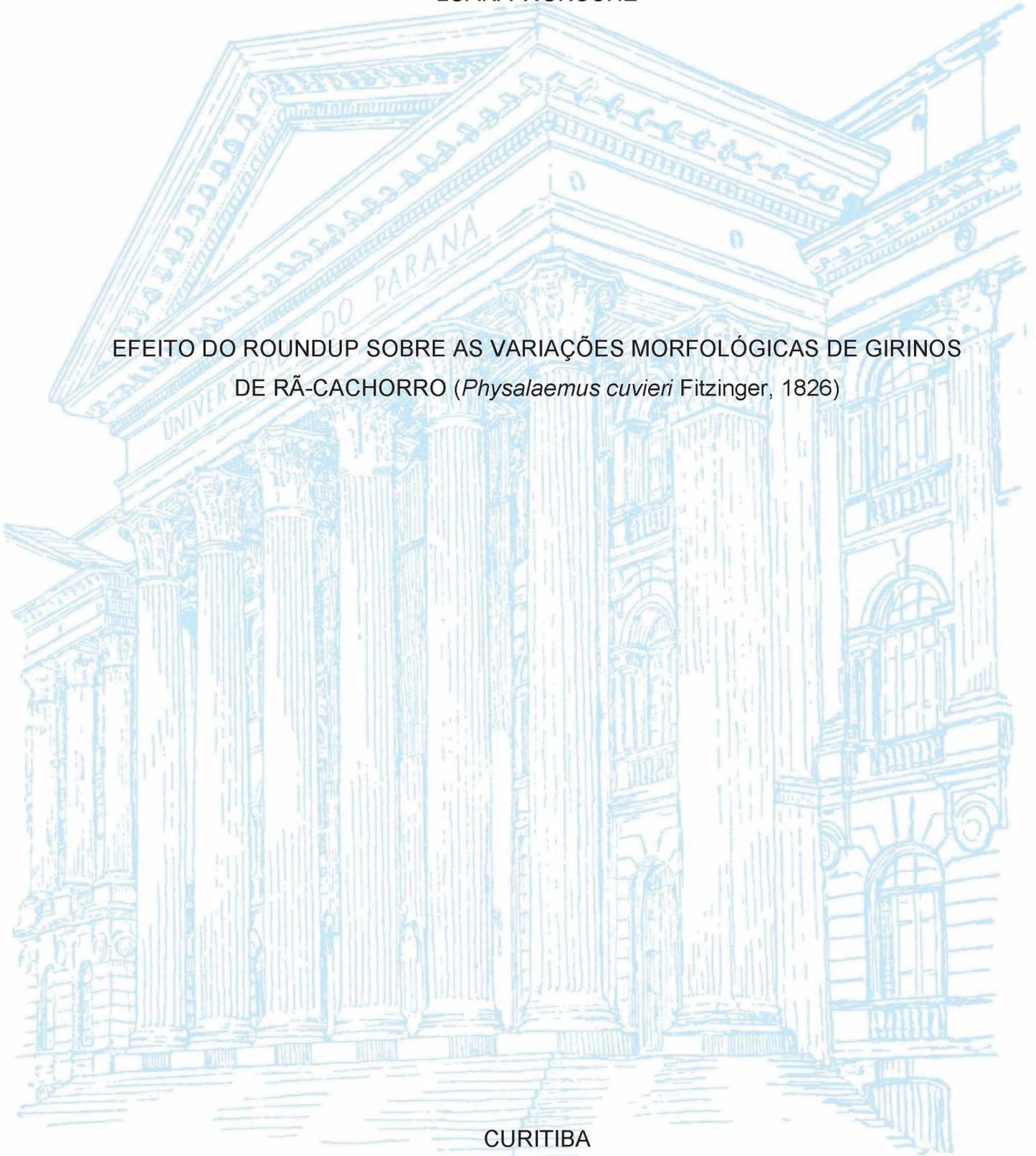


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUANA WUNSCHÉ

EFEITO DO ROUNDUP SOBRE AS VARIAÇÕES MORFOLÓGICAS DE GIRINOS
DE RÃ-CACHORRO (*Physalaemus cuvieri* Fitzinger, 1826)



CURITIBA

2020

LUANA WUNSCHÉ

EFEITO DO ROUNDUP SOBRE AS VARIAÇÕES MORFOLÓGICAS DE GIRINOS
DE RÃ-CACHORRO (*Physalaemus cuvieri* Fitzinger, 1826)

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em ecologia e conservação, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Professor Mauricio Moura

CURITIBA

2020

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Wunsche, Luana.

Efeito do Roundup sobre as variações morfológicas de girinos de rã cachorro (*Physalaemus cuvieri* Fitzinger). / Luana Wunsche. – Curitiba, 2020.

66 f. : il.

Orientador: Mauricio Moura.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação.

1. Girino. 2. Morfogênese. 3. Organogênese. 4. Anfíbio. 5. Morfometria. 6. Agroindústria – Aspectos ambientais. 7. Produtos químicos agrícolas. I. Título. II. Moura, Mauricio. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação.

CDD (20. ed.) 597.6



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ECOLOGIA E
CONSERVAÇÃO - 40001016048P6

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **LUANA WUNSCH DE ALMEIDA** intitulada: **Efeito do Roundup sobre as variações morfológicas de girinos de rã cachorro (*Physalaemus cuvieri* Fitzinger)**, sob orientação do Prof. Dr. MAURICIO OSVALDO MOURA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 26 de Março de 2020.

Assinatura Eletrônica

31/03/2020 21:47:32.0

MAURICIO OSVALDO MOURA

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

01/04/2020 14:00:25.0

EDSON ANTONIO TANHOFFER

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

31/03/2020 21:45:01.0

EMYGDIO LEITE DE ARAUJO MONTEIRO FILHO

Avaliador Externo (DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA - UFPR)

Dedico esse trabalho a todas aquelas e aqueles que sofrem as mazelas , incluindo a fome e a contaminação, geradas pelo modelo de agricultura capitalista - o agronegócio.

Dedico também aqueles seres que foram o cerne do meu ser, meu alicerce, meu refúgio, me mantendo de pé, com vida, nesse momento crítico de minha vida. Os quais amo e preso e sem os quais essa trajetória não seria possível: A Mirelle, Drika e Sara e ao Free, Edson e Marlon.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas aquelas 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, recursos, ouvidos e abraços, que confiaram e acreditaram nessa proposta.

Àqueles também, que inconscientemente tornaram esse processo objeto, pelos horizontes apresentados, pelas direções 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!

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

Vandana Shiva

“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 aos diversos ambientes. Dentre eles, o uso extensivo de agrotóxicos tem promovido a contaminação em larga escala dos diversos compartimentos da biosfera, afetando adversamente uma variedade de organismos não-alvo. Os anfíbios são um dos grupos de vertebrados mais ameaçados por esta prática agrícola, especialmente devido a atributos morfofisiológicas e de história de vida. Por passarem um período crítico do seu desenvolvimento, como a organogênese e morfogênese, em contato direto com os estressores do ambiente, os girinos apresentam uma tendência em se tornarem deformados, bem como ter seu crescimento e desenvolvimento alterado. Além disso os girinos são capazes de alterar traços morfológicos em resposta às mudanças no ambiente. Embora essa plasticidade possa ser vantajosa em ambientes heterogêneos, em casos de estressores novos na história evolutiva, ela pode se apresentar como uma resposta não adaptativa. Para abordar essas questões, nós investigamos se o agrotóxico Roundup Original induz diferentes morfologias nos girinos e se induz ou aumenta a incidência de deformações nos girinos e por fim, se o agrotóxico altera as taxas de crescimento e desenvolvimento dos indivíduos *Physalaemus cuvieri*, após exposição crônica (12d) a concentrações ambientalmente relevantes (CN: 0,00; T1: 0,28; T2: 2,8; T3: 4,0 mg i.a. L⁻¹). A variação na forma e nas taxas de crescimento foram analisadas utilizando abordagens da Morfometria Geométrica, enquanto as taxas de desenvolvimento e da incidência de malformação foram avaliadas em microscópio ótico. O Roundup foi capaz de alterar a forma dos indivíduos de maneira semelhante aquelas induzidas por predadores, possivelmente uma resposta não adaptativa. O Roundup reduziu as taxas de crescimento e desenvolvimento, aumentou a incidência de malformações do disco oral e afetou o padrão de pigmentação. Tais respostas estão supostamente relacionadas de maneira geral a mecanismos como a disrupção de eixos neuro-hormonais, estresse oxidativo, ácido retinóico e atividade metabólica, além do balanço Ca²⁺ e do pH. Por fim tais alterações encontradas podem estar relacionadas a uma menor sobrevivência e sucesso reprodutivo. Portanto, as mudanças induzidas pelo Roundup têm potencial para afetar o valor adaptativo e influenciar a dinâmica populacional.

Palavras-chave: Roundup Original. Girinos. Morfometria Geométrica. Malformações. Desenvolvimento.

ABSTRACT

The agribusiness model is the cause of a variety of environmental stresses. For example, the extensive, large-scale, use of pesticides, fungicides, herbicides, etc. has caused the equally large-scale contamination of the environment, often affecting non-target organisms. Amphibians are often among these non-targeted animals that are threatened due to their life-histories and physiologies. As a consequence, when exposed during development, tadpoles often have external and internal deformities due to the interference in developmental pathways caused by those chemicals. Additionally, environmental influences on development can have consequences in variable morphological traits. While developmental plasticity can be advantageous in variable environments, when exposed to agROTOXINS, this plasticity may be detrimental. We will test this possibility with one of the most commonly used herbicides (Roundup Original) in an exposure experiment with tadpoles. Specifically, we will compare growth rates and morphology among tadpoles of the frog *Physalaemus cuvieri* exposed to a concentration gradient of the herbicide for 12 days. We reared tadpoles in a control group (no herbicide) and three concentrations (0.28, 2.8 and 4.0 i.a. L⁻¹) and tested the effects on morphology and growth rates using methods of geometric morphometry. The developmental rates and the number of deformities were measured and counted under a microscope. We found that Roundup induced morphological changes similar to those induced by predators, that will be detrimental to the continued survival of the tadpole or frog (a maladaptive response). Growth and development rates were reduced, while the incidence of deformities (including the oral disc and color patterns) increased with Roundup concentration. These responses suggest disruption of a variety of metabolic pathways along with oxidative stress, interference with Ca⁺⁺ and pH. Thus, these detrimental effects of Roundup are problems for growth, survival and reproduction in these frogs, which will negatively effect population dynamics and persistence.

Keywords: Roundup Original. Tadpoles. Geometric Morfometric. Malformation. Development.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	25
2.1 GERAL	25
2.2 ESPECÍFICOS	25
3 MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 AGROTÓXICO TESTE	26
3.2 ORGANISMO TESTE.....	26
3.3 COLETA E MANUTENÇÃO	27
3.4 BIOENSAIO	27
3.5 EXPOSIÇÃO CRÔNICA	28
3.6 AQUISIÇÃO DE DADOS MORFOMÉTRICOS	29
3.7 AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA	30
3.8 MORFOLOGIA E DETERMINAÇÃO FENOTÍPICA	32
3.9 AVALIAÇÃO DOS MELANÓFOROS	33
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
4 RESULTADOS	34
4.1 CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO	34
4.2 MALFORMAÇÕES E PIGMENTAÇÃO	37
4.3 AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA	40
5 DISCUSSÃO	48
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

A qualidade e a persistência dos habitats nativos têm se tornado uma questão de preocupação no cenário político e científico mundial, especialmente porque temos presenciado taxas alarmantes de perda de espécies e áreas nativas, em grande parte, devido à natureza e extensão da atividade antropogênica contemporânea (BARNOSKY *et al.*, 2011; STEFFEN *et al.*, 2015). Dentro desse contexto, o modelo agrícola do agronegócio é considerado uma das atividades mais impactantes em termos ambientais (TILMAN *et al.*, 2001, 2002; SCHIESARI; GRILLITSCH, 2011). Esse modelo se beneficia de fartos incentivos fiscais e de crédito, privilegiando a produção de commodities e a ampliação do capital privado em detrimento da preservação da natureza, da soberania e segurança alimentar das populações (e.g. BADGLEY *et al.*, 2007; FAO, 2015; ALEXANDRATOS; BRUINSMA, 2015; CARNEIRO *et al.*, 2015).

A insustentabilidade desse sistema se torna evidente quando consideramos as externalidades socioambientais decorrentes da sua prática, que, portanto, não entram nos cálculos da contribuição econômica desse setor (TILMAN *et al.*, 2001; CARNEIRO *et al.*, 2015). Dentre os estressores socioambientais podemos citar a supressão, substituição, homogeneização e fragmentação das paisagens naturais, além do alto consumo de água, combustíveis fósseis, fertilizantes e agrotóxicos. Dentre as consequências, tais estressores promovem coletivamente a degradação do solo, a contaminação e esgotamento dos recursos naturais, além da emissão de gases do efeito estufa, impactando assim 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). Dessa forma incompatível com a manutenção da integridade dos diversos ecossistemas - dos recursos naturais. Além disso é um modelo que aprofunda a desigualdade social e a marginalização das populações do campo, que aumentam a violência no campo, contaminam e colocam em estado de vulnerabilidade a saúde das populações e sua segurança a alimentar. Um modelo desnecessário do ponto de vista ecológico, econômico e de segurança e soberania alimentar. Considerando que outros modelos de produção mais harmônicos com os sistemas naturais são possíveis, entretanto, eles não sustentam as grandes corporações multinacionais da biotecnologia do

agronegócio e dessa forma não há interesse político e econômico para superar esse paradigma.

Nesse sentido o volume de agrotóxico despejado nas lavouras tem aumentado expressivamente e assimetricamente com relação à área plantada (CARNEIRO *et al.*, 2015). E nesse sentido, a contaminação do ambiente e dos alimentos por agrotóxico, devido ao seu uso massivo e a sua natureza biocida, têm se tornado objeto de preocupação no âmbito da saúde pública e coletiva, mundial. O Brasil ocupa um lugar biogeográfico e político estratégico para estudos com essa abordagem. É um dos maiores produtores e exportadores de produtos agropecuários do mundo (MAPA, 2017) com uma projeção de aumento na ordem de mais de 20% na área plantada para 2024 (OECD; FAO, 2015). É um dos países com a maior concentração de terras (IBGE, 2017). Não surpreendente, desde 2008 é considerado o maior consumidor de agrotóxicos do mundo, em valores absolutos, que inclusive permite utilizar princípios ativos proibidos na União Europeia, Estados Unidos e outros países (CARNEIRO, *et al.*, 2015). Dessa forma, viramos um país de escoamento de venenos recusados pelo resto do mundo, e em muitos casos as indústrias do veneno, as quais tem seus agrotóxicos proibidos em seus países de origem, possuem os seus meios de produção estabelecidas em países do sul, dentro da geopolítica mundial (NETTO, 2014). Logo, a fronteira agrícola no Brasil avança convertendo extensos territórios de habitats nativos em grandes latifúndios de monocultivo químico-dependente. Estas áreas incluem biomas como o Cerrado e Amazônico, de grande representatividade da biodiversidade global, que apresenta um alto grau de endemismos, e de grande importância para manutenção do clima e do funcionamento dos ecossistemas nas diversas escalas – espaço/temporal - (LEWINSOHN; PRADO, 2003; FORZZA *et al.*, 2010; SCHIESARI; GRILLITSCH, 2011). Além disso, os grandes latifundiários possuem um forte poder político, tornando o Brasil permissivo aos interesses desse setor, influenciando sobremaneira a legislação nacional (como exemplo o código florestal, a política agrária e dos agrotóxicos).

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, 2013; 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. Isso ocorre, 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. Dentro desse contexto de estudos experimentais reducionistas, estudos utilizando outras abordagens como dados epidemiológicos e análises correlacionais, tem demonstrado a nocividade de tais substâncias, que muitas vezes são consideradas seguras (BENÍTEZ *et al.*, 2009). Desse modo, o princípio da precaução deve ser tomado como critério *sine qua non* nos processos de registro e liberação de uso. Desse modo, 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. Portanto, evidentemente há um claro conflito de interesse. Tendo isso em vista, o debate a respeito dos potenciais efeitos adversos dos agrotóxicos são ofuscados pelas relações de poder entre as grandes multinacionais da biotecnologia de um lado e os governos e cientistas receptivos de outro, transferindo assim o discurso técnico para esfera política. E dessa forma assegurando - através de estudos manipuláveis, lobby, legislações alinhadas - os interesses corporativos das grandes empresas (SMITH, 2009; CARNEIRO *et al.*, 2015; ABRASCO, 2019).

Outro aspecto importante que deve ser considerado, é que 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. Isso ocorre devido às suas propriedades ecotoxicológicas e porque a sua aplicação se dá em sistemas abertos que são complexos e heterogêneos, portanto, com potencial para se difundir e acumular pelos diversos compartimentos da biosfera, transcendendo assim a escala espacial e temporal em que são despejados nas lavouras. Nesse sentido, diversos estudos têm demonstrado o impacto dos agrotóxicos sobre organismos-não alvo, que vão desde

microrganismos até vertebrados (conforme revisado por KÖHLER; TRIEBSKORN, 2013). 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.

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 – 41% segundo a IUCN (2020) – encontram-se ameaçadas, com uma estimativa de cerca de 43% das suas populações enfrentando declínio, em taxas consideradas as maiores do mundo (STUART *et al.* 2004). Tais declínios refletem obviamente nas altas taxas de extinção, que podem ser estimadas em cerca de quatro ordens de grandeza em relação as extinções de fundo, com predições de ao menos 6.9% (na ordem de centenas) das espécies se tornarem extintas no próximo século (ALROY, 2015). Dentre as múltiplas causas discutidas na literatura, o uso de agrotóxicos tem sido correlacionado ao declínio de algumas populações locais de anuros (RELYEA, 2005b; DAVIDSON, 2004; DAVIDSON *et al.*, 2002). Contudo, ainda há grandes lacunas nos estudos ecotoxicológicos com este grupo, ora por escassez de estudos, especialmente na Região Neotropical, ora dada a complexidade dos mecanismos associados para a avaliação dos perigos e do risco associado à exposição das diversas espécies e populações *in situ*. Portanto, estas questões tornam difícil estabelecer a relação de causa e efeito entre a contaminação e os declínios. Todavia a contaminação por agentes químicos tem sido considerada uma pressão importante às populações de anfíbios (SCHIESARI *et al.*, 2007).

A vulnerabilidade dos anuros está, também, especialmente ligada a atributos morfofisiológicos e de história de vida que os tornam particularmente suscetíveis à exposição e aos efeitos dos agrotóxicos (SCHIESARI; GRILLITSCH, 2011). Como exemplo, algumas espécies frequentemente persistem em áreas agrícolas, sobretudo na estação reprodutiva (MANN *et al.*, 2009). Estes organismos, utilizam os corpos d'água próximos ou dentro das áreas de cultivo para acasalamento e desova, para isso, muitas vezes, precisam atravessar a paisagem agrícola durante a migração sazonal (BRÜHL *et al.*, 2011). Consequentemente, ambas as fases do ciclo de vida, aquática e terrestre, estão sujeitas à exposição por agrotóxicos. Além do mais, 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 *et al.*, 2007)

Além disso, devido ao ciclo de vida complexo, com estágios larvais e metamorfose, os anfíbios apresentam consideráveis mudanças fisiológicas, anatômicas e histológicas durante o desenvolvimento, enquanto estão expostos diretamente a uma série de estressores no ambiente. Desse modo, ao longo de processos críticos da ontogenia, como a organogênese e a morfogênese, existem amplas oportunidades para interferências, tornando os girinos propensos a deformações (COOKE, 1981). Tal propensão pode ser determinada tanto por fatores genéticos quanto ambientais, mas independente da natureza causal, as mudanças morfológicas podem afetar a história de vida, o comportamento e a sobrevivência por modificar os resultados das interações ecológicas, de maneira que girinos deformados apresentam uma alta taxa de mortalidade (COOKE, 1981). Adicionalmente, há um padrão estágio-específico nos tipos de deformações, que estão relacionadas com os processos de desenvolvimento que ocorrem em determinada fase, portanto, o tipo e o nível da toxicidade de um determinado xenobiótico é influenciado pelo estágio de desenvolvimento no momento da exposição (GONZÁLEZ-DONCEL *et al.*, 2004; YUAN *et al.*, 2011; BONNE *et al.*, 2013). Por fim, os agrotóxicos podem exercer seu efeito sobre a morfologia interferindo diretamente em vias bioquímicas, ou indiretamente, aumentando a incidência de deformidades comuns devido ao estresse causado (COOKE, 1981), especialmente pelas vias relacionadas aos processos de detoxificação e reparação de danos causados pelos agrotóxicos.

Outro elemento importante, é que os agrotóxicos podem retardar as taxas de crescimento e desenvolvimento dos girinos (HOWE *et al.*, 2004), reduzindo a aptidão individual. Isto ocorre tendo em vista que o crescimento reduzido está associado com um aumento na susceptibilidade ao dessecamento das poças, uma menor sobrevivência após a metamorfose e um menor sucesso reprodutivo (SMITH, 1987; SEMLITSCH *et al.*, 1988, NEWMAN, 1988, ALTWEGG; REYER, 2003).

Em adição, os girinos possuem pigmentações na forma de melanóforos, ou seja, células que contêm grânulos de melaninas pretas ou marrons derivadas da tirosina e contidas em organelas, ou melanossomos. Essas células, os melanócitos, tem origem na crista neural, e através de movimentos ameboides se deslocam entre a derme e epiderme. A presença, tamanho, forma, densidade de células e o padrão de distribuição ou arranjo são típicas para cada espécie. Tal pigmentação tem função

protetiva sob diversos aspectos, como exemplo a camuflagem ou aposematismos, assim como a proteção do DNA contra raios UV (MCDIARMID; ALTIG, 1999). Hoje é bem conhecido, e amplamente presente nos livros texto, que os componentes do citoesqueleto como os microtúbulos e filamentos de actina são de grande importância para a divisão celular, arquitetura celular, transporte intracelular, função muscular e motilidade de flagelos. Nesse sentido, os agentes químicos como os agrotóxicos têm potencial para afetar os processos celulares, ou seja, a homeostase celular, prejudicando dessa forma o desenvolvimento e manutenção desses e outros tipos celulares. (BENACCHOUR; SÉRALINE, 2009; HEDBERG; WALLIN, 2010).

Por fim, as larvas dos anfíbios apresentam uma alta plasticidade fenotípica, pois são capazes de alterar características biológicas em resposta às condições ambientais, incluindo à presença do agrotóxico glifosato (LAURILA; KUJASALO, 1999; RELYEA, 2012). A plasticidade fenotípica é uma das respostas evolutivas que pode permitir aos organismos maximizarem sua aptidão em ambientes heterogêneos. De maneira tal que os organismos podem responder adaptativamente ou não, mudando sua forma e fisiologia em resposta a pistas ambientais. Entretanto, se o estressor é novo na história evolutiva, a maioria das variantes induzidas podem provavelmente ser casos de plasticidade não adaptativa, onde os distúrbios do desenvolvimento e ou dos processos fisiológicos resultam em fenótipos ambientalmente induzidos com um reduzido valor adaptativo em relação ao fenótipo constitutivo (GHALAMBOR *et al.*, 2007).

Não obstante, além do efeito letal (RELYEA, 2005b,c), os efeitos subletais dos agrotóxicos reportados na literatura sobre os anfíbios anuros são os mais diversos, com potencial para afetar a dinâmica de uma população, através da redução do valor adaptativo ao longo das sucessivas gerações. Pois, eles podem alterar o desenvolvimento ontogenético, atributos de história de vida e do repertório comportamental (GURUSHANKARA *et al.*, 2007; BRUNELLI *et al.*, 2009; COSTA; NOMURA, 2016). 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). Portanto, tais efeitos têm potencial para afetar o sucesso reprodutivo e a sobrevivências dos indivíduos afetados. E, 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. Entretanto, nós conhecemos consideravelmente menos a respeito dos efeitos dos contaminantes sobre os traços morfológicos.

O Glifosato é o agrotóxico mais utilizado no Brasil e no mundo, e certamente o mais controverso com relação as suas propriedades toxicológicas e ecotoxicológicas. O volume de glifosato aplicado em campo tem aumentado expressivamente e assimetricamente em relação a área plantada nos últimos anos, principalmente após o desenvolvimento de cultivos transgênicos resistentes a este herbicida. Até o momento, os dados não demonstraram haver uma correlação estatística positiva entre do uso desse herbicida e o aumento da produtividade agrícola, pelo contrário, em um período de 12 anos o uso do glifosato por hectare aumentou 124% enquanto a produtividade cresceu 9.5% (BENBROOK, 2012, ABRASCO, 2019). Por outro lado, existem correlações positivas significativas em estudos epidemiológicos de casos de malformação e abortos com as áreas de aplicação do glifosato (AVILA-VAZQUEZ, *et al.* 2018; AIASSA *et al.*, 2019).

Surpreendentemente existem 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 desenvolvido originalmente em 1970 (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 muitos outros organismos (e.g. HOWE *et al.*, 2004, BENACHOUR *et al.*, 2007; BENACHOUR E SÉRALINE, 2009; DALLEGRAVE *et al.*, 2007; HOKANSON *et al.*, 2007). Com base nessas evidências, em revisão publicada a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), órgão da Organização Mundial da Saúde (OMS), reclassificou o glifosato como “provável carcinógeno em humanos”. No Brasil, o Glifosato permaneceu por mais de dez anos em reavaliação, agora como conclusão a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) apresenta um parecer favorável a

manutenção do produto no mercado brasileiro (ANVISA, 2019). E assim, a ANVISA declara indiretamente a segurança do glifosato e formulados na medida em que, ao invés do seu banimento, como sugerido por técnicos, cientistas e sociedade civil organizada de vários países, a ANVISA determinou pelo não banimento. O parecer inclui dentro do seu escopo algumas restrições e orientações, mas que não excluem, tampouco mitigam os efeitos deletérios, os riscos e perigos desse agrotóxico para a saúde humana e da natureza, como já demonstrado em uma multiplicidade de estudos. Embora alguns destes efeitos tóxicos não sejam devidos exclusivamente ao glifosato por si, na realidade seu uso não se dá de maneira isolada, e dessa forma há interações com as demais substâncias contidas nos produtos formulados que podem alterar sua toxicidade, geralmente tornando-os mais tóxicos (MESNAGE *et al.*, 2015, 2014, 2019; RICHARD *et al.*, 2005). Os formulados, os quais contêm por exemplo surfactantes, que frequentemente também possuem sua própria toxicidade em relação ao princípio ativo isolado (TSUI; CHU, 2003), são necessários para a efetividade do glifosato, ou seja, sua eficácia é reduzida expressivamente com relação a absorção do glifosato pelas plantas (GASKIN; HOLLOWAY, 1992). Desse modo os estudos que avaliam exclusivamente o glifosato não garantem sua segurança, como realizado muitas vezes pelas agências reguladoras (BENACHOUR; SÉRALINE, 2009; TSUI; CHU, 2003; BRAUSCH; SMITH, 2007). 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)]. Desse modo, em termos de respostas inconsistentes, embora estudos em laboratório e mesocosmos, em grande parte, demonstram efeitos deletérios para uma variedade de marcadores, sobre as larvas de anuros (RELYEA, 2011), em concentrações ecologicamente relevantes, - encontradas no ambiente e até mesmo consideradas seguras para o consumo humano (LANCTÔT *et al.*, 2014; WILLIAMS; SEMLITSCH, 2010 ;CHEN *et al.* 2004; EDGINTON *et al.* 2004). Por outro lado, 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).

Portanto, dada a escassez de estudos e incertezas dos impactos destes pacotes tecnológicos sobre a biota nativa, torna-se necessário ampliar nossos conhecimentos sobre os efeitos adversos destas substâncias, fortalecendo assim, através do subsídio de evidências, os debates e decisões em torno da liberação de uso destas substâncias, procurando assim garantir a preservação das populações bem como dos ambientes aos quais estão associados. Assim, para abordar essa questão nós pretendemos determinar o efeito do agrotóxico Roundup Original sobre a forma, atributos da história de vida (desenvolvimento e crescimento) e incidência de malformações de girinos de *Physalaemus cuvieri*, após exposição crônica a concentrações ambientalmente relevantes.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Determinar o efeito do agrotóxico Roundup Original sobre as variações morfológicas (forma e malformações) e de atributos da história de vida de girinos de *Physalaemus cuvieri*, após exposição crônica a concentrações ambientalmente relevantes.

2.2 ESPECÍFICOS

- 1) Determinar o efeito do Roundup sobre a forma dos girinos;
- 2) Determinar o efeito do Roundup nas trajetórias alométricas;
- 3) Determinar o efeito do Roundup sobre as taxas de crescimento e desenvolvimento dos indivíduos;
- 4) Determinar o efeito do Roundup na incidência de malformações;
- 5) Determinar o efeito do Roundup sobre a pigmentação.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AGROTÓXICO TESTE

O agrotóxico utilizado neste estudo foi o Roundup[®] Original (MONSANTO) contendo como ingrediente ativo 480 g L⁻¹ de glifosato (N-(fosfonometil) glicina), um ácido fraco, na forma de sal de isopropilamina de glifosato (360 g L⁻¹ equivalente ácido) e 684 g L⁻¹ de ingredientes supostamente inertes, segundo as empresas desenvolvedoras da tecnologia, no caso POEA (polioxietilenoamina). Mas em muitos casos são segredos industriais.

3.2 ORGANISMO 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). Portanto, não é uma espécie considerada ameaçada pela IUCN (2017). Mas, é considerada localmente ameaçada na Argentina pela destruição e contaminação do habitat do Chaco especialmente pelo agronegócio (MIJARES *et al.*, 2010).

Os corpos d'água utilizados para reprodução e desenvolvimento, podem estar associados a áreas agrícolas e, portanto, os girinos expostos à contaminação mais severa por agrotóxicos (MOURA, M. O. obs. pes.). Estudos ecotoxicológicos com *P. cuvieri* tem demonstrado sua capacidade em responder à presença de agrotóxicos alterando parâmetros da história de vida, morfológicos e bioquímicos (MOUTINHO, 2013; COSTA; NOMURA, 2016).

3.3 COLETA E MANUTENÇÃO

Foram coletadas 6 desovas em um corpo d'água lântico, na localidade de Mandassaia no município de Campina Grande do Sul, do Estado do 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 20L contendo 5L 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 50L, contendo 30L 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 – 14h claro/10h escuro – e alimentados a cada 24h *ad libitum*, com uma mistura triturada de ração comercial para coelho e peixe na proporção 3:1 respectivamente.

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 BIOENSAIO

O experimento foi conduzido em laboratório com fotoperíodo de 14/10h claro e escuro, respectivamente. Utilizamos como unidades experimentais aquários de vidro com capacidade de 20L, contendo 7,5L de água filtrada e aeração constante. As larvas permaneceram, sob as condições acima citadas, por 22 dias, visando obter girinos de tamanho satisfatório para as análises, uma vez que se tratam de espécimes

de pequeno porte (tamanho dos indivíduos após o fim da experimentação ~2mm), e por isso de difícil observação dos atributos avaliados neste estudo. Dessa maneira obtendo indivíduos maiores torna-se mais robusta a observação e interpretações dos resultados. Após esse período os indivíduos foram coletados dos aquários de criação e distribuídas nos aquários experimentais aleatoriamente e aclimatadas por um período de 24h, antes do início da exposição.

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 do experimento os indivíduos sobreviventes foram removidos dos aquários e imediatamente eutanasiados em solução de benzocaína 300 mg L^{-1} e fixados e armazenados em Formol 10% para análises posteriores.

3.5 EXPOSIÇÃO CRÔNICA

O experimento crônico foi realizado com o intuito de avaliar efeitos que possam aparecer ao longo do desenvolvimento (malformação, alterações da forma, crescimento e desenvolvimento), que em muitos casos não são passíveis de serem observadas em ensaios agudos. Neste experimento foram utilizadas 18 larvas por unidade amostral, 3 grupos tratamentos, contendo cada qual as respectivas concentrações de glifosato, 0.28 mg L^{-1} , T 2 = 2.8 mg L^{-1} e T 3 = 4 mg L^{-1} , mais um grupo controle negativo (CN). Os grupos tratamentos e o grupo controle foram replicados 5 vezes cada, totalizando 20 unidades experimentais. 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 96h e o recurso alimentar fornecido para os girinos a cada dois dias. As concentrações utilizadas partiram da concentração de glifosato estabelecida para águas doces de classe III no Brasil, $0,28 \text{ mg a.i. L}^{-1}$, segundo a resolução 357 do CONAMA (2005). As demais concentrações utilizadas foram estabelecidas a partir dos resultados obtidos para a CL50 no ensaio agudo (manuscrito em preparação), com o propósito de reduzir a mortalidade, permitindo assim capturar um potencial efeito do Roundup sobre os atributos investigados. Os aquários foram revisados a cada 24h 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).

TABELA 1: PARAMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA AO LONGO DO BIOENSAIO COM GIRINOS DE *PHYSALAEEMUS CUVIERI* EXPOSTOS AO ROUNDUP.

	pH	Oxigênio mg L ⁻¹	Temperatura °C	NH ₃ mg L ⁻¹
E	7.13	6.75	23.96	0.004
SD	0.03	0.16	0.56	0.006
cv	0.48	2.36	2.33	-

E – Média;
SD – Desvio padrão;
cv – Coeficiente de variação

3.6 AQUISIÇÃO DE DADOS MORFOMÉTRICOS

Como marcador morfológico foi utilizado o corpo inteiro do girino em vista lateral (esquerda). A escolha deste marcador foi motivada pelo conhecimento estabelecido na literatura científica com relação à capacidade dos girinos em alterar a sua morfologia externa (plasticidade fenotípica) em resposta a agentes estressores, incluindo agrotóxicos (RELYEA, 2012; KATZENBERGER *et al.*, 2014; COSTA; NOMURA, 2016).

Um total de 64 indivíduos foram gentilmente posicionados em uma cubeta, confeccionada de polimetacrilato de metila, contendo água destilada, a fim de evitar a desidratação e conseqüente deformação dos indivíduos durante o procedimento. Para captura das imagens foi utilizado uma câmera digital Canon EOS Rebel T6i equipada com lente macro de 105mm F2.8 Sigma.

A morfologia dos girinos foi caracterizada através da seleção de 14 marcos anatômicos (Tabela 02 e Figura 01) (Adaptados de VAN BUSKIRK, 2009; KATZENBERGER *et al.*, 2014). Aplicamos também o método de semi-landmarks para aumentar a acurácia da descrição da cauda dos girinos, consistindo em 4 curvas com 50 pontos equidistantes cada, cobrindo as regiões dorsal e ventral da nadadeira e musculatura. Nessa abordagem (GMM) a morfologia é representada por uma configuração de pontos em um sistema de coordenadas cartesianas. Onde, portanto,

cada marco anatômico corresponde a uma coordenada (x, y). Para isso foi utilizado o programa TPSDig (ROHLF, 2010).

TABELA 2: DESCRIÇÃO DOS MARCOS ANATÔMICOS SELECIONADOS PARA AVALIAR A VARIAÇÃO NA FORMA DOS GIRINOS DE *P. cuvieri* EXPOSTOS AO ROUNDUP.

ID	Descrição dos Marcos Anatômicos
1	Centro da pupila
2	Margem anterior da cabeça a 90° do centro da pupila
3	Extremidade do focinho (ponto extremo)
4	Centro da boca
5	Margem anteroventral do intestino
6	Junção da nadadeira ventral ao corpo
7	Intersecção da margem ventral da musculatura caudal e do corpo
8	Intersecção do eixo dos miômeros da cauda com a parede posterior do corpo
9	Intersecção da margem dorsal da musculatura caudal e do corpo
10	Margem superior da cabeça a 90° do centro da pupila
11	Margem inferior da abertura do sifão
12	Extremidade posterior da nadadeira
13	Junção da nadadeira dorsal com o corpo
14	Extremidade posterior da musculatura da cauda

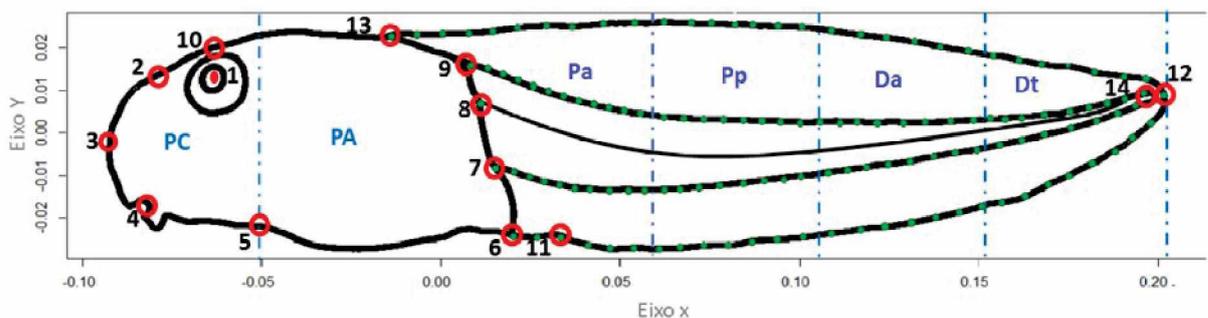


FIGURA 1: Representação esquemática da posição dos marcos anatômicos (círculos vermelhos) e semi-landmarks (círculos verdes) nos girinos de *Physalaemus cuvieri*. A descrição anatômica foi determinada conforme segue: PC=Polo Cefálico; PA= Polo Abdominal; Pa = Proximal anterior; Pp = proximal posterior; Dm=Distal anterior; Dt=Distal-terminal. Os eixos são o resultado da padronização dos indivíduos no GPA.

3.7 AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA

Nós utilizamos métodos da morfometria geométrica para descrever a variação na forma dos girinos de *P. cuvieri*. A forma pode ser definida como “todas as

propriedades de uma configuração de pontos que não se alteram por efeitos de tamanho, posição e orientação” (BOOKSTEIN, 1989 *apud* MONTEIRO; REIS 1999, p. 2). Deste modo, para se comparar exclusivamente a forma é necessário retirar tais efeitos indesejáveis, através da padronização destas variáveis. Para realizar estes procedimentos nós utilizamos a Análise Generalizada de Procrustes (GPA). Nesta abordagem, as configurações de marcos de cada girino são superpostas pelo centroide a uma configuração de referência (configuração média), de forma que a soma dos quadrados das distâncias entre pontos correspondentes nas duas configurações (alvo e referência) seja a menor possível (MONTEIRO; REIS, 1999). Para isso, as configurações de marcos iniciais dos girinos são transformadas por translação, de maneira que os centroides de cada configuração se tornem superpostos, o que retira o efeito da posição. Posteriormente, o efeito do tamanho é retirado por proporcionalização, que é realizada igualando o tamanho do centroide de todas as configurações a um (1). Por fim, as configurações são rotacionadas de modo a minimizar a soma dos quadrados das distâncias entre pontos correspondentes, retirando assim o efeito da orientação. Portanto, as configurações resultantes dessa transformação dizem respeito somente a forma dos girinos (MONTEIRO; REIS, 1999). As coordenadas de forma resultantes do GPA foram utilizadas como descritores da forma nas análises que seguem.

Outra variável de forma obtida pela GPA é o tamanho do centroide. No contexto da morfometria geométrica, o tamanho geral de uma estrutura é estimado pelo tamanho do centroide, que é caracterizado como o ponto médio ou centro de massa de uma configuração de marcos. O tamanho do centroide é obtido calculando a raiz quadrada da soma das distâncias quadradas de um grupo de pontos até o seu centroide (MONTEIRO; REIS, 1999).

A descrição e subsequente interpretação dos resultados desta investigação dependem essencialmente da visualização das alterações morfológicas de superfície da espécie modelo, contudo, a literatura não apresenta uma análise da anatomia de superfície que permita uma padronização suficientemente objetiva, sendo assim sugerimos, agora, uma nomenclatura que nos remeta com a precisão requerida para esta metodologia. As mudanças na forma foram então descritas de acordo com a seguinte determinação anatômica: O corpo foi dividido em polo cefálico e abdominal entendendo como cefálico a região localizada à margem anterior do intestino; A cauda

onde ocorrem modificações críticas para a análise de nossos resultados sugerimos que seja dividida em 2 grandes segmentos de igual tamanho, proximal (P) e distal (D), entendendo como proximal o vizinho ao polo abdominal, e cada segmento é novamente subdividido da seguinte forma; proximal anterior (Pa) e posterior (Pp) e distal anterior (Da) e distal terminal (Dt) (FIGURA 1).

3.8 MORFOLOGIA E DETERMINAÇÃO FENOTÍPICA

Para o estudo de malformações um total de 80 girinos foram posicionados em placa de petri contendo água destilada, a fim de evitar a desidratação e consequente deformação dos indivíduos durante o procedimento, e analisados sob estereomicroscópio binocular. Gel de ultrassom foi utilizado, devido as suas propriedades físicas (ópticas e mecânicas), com o objetivo de apoiar os indivíduos e mantê-los em posição estática dentro da placa de petri. Para a caracterização e avaliação da morfologia do disco oral (Figura 2), foi tomado como referência a descrição do padrão morfológico do disco oral dos girinos da rã-cachorro (*P. cuvieri*), bem como padrões previamente descritos, envolvendo indução de fenótipos malformados por xenobióticos (e.g. HOPKINS *et al.*, 2000; GONZÁLEZ-DONCEL *et al.*, 2004; YUAN *et al.*, 2011; BONNE *et al.*, 2013; DEVI *et al.*, 2016).

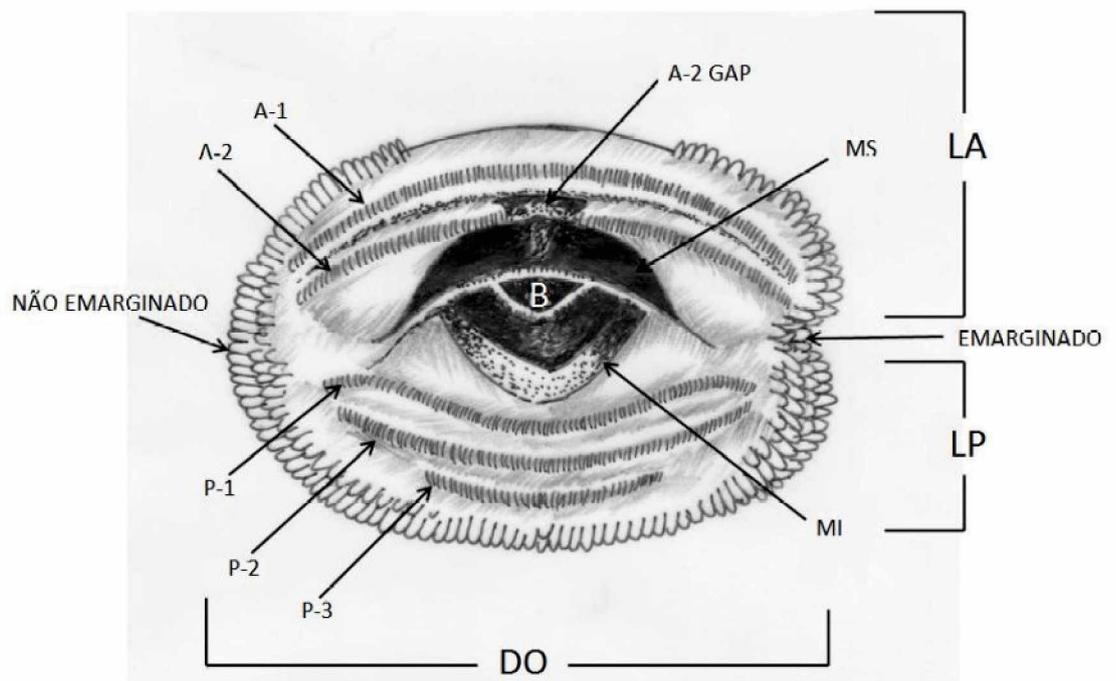


FIGURA 2 : Representação esquemática do disco oral (DO) de um girino hipotético demonstrando as possíveis condições emarginada (lado direito) e não emarginado (lado esquerdo). Abreviação para a terminologia descritiva: LA = lábio anterior (superior); A-1 e A-2= primeira e segunda fileiras de denticulos anteriores; A-2 GAP = interrupção medial da segunda fileira de denticulos anterior; MS = revestimento da maxila; B = boca; MI= revestimento da mandíbula; LP = lábio posterior (inferior); P-1, P-2 e P-3 = primeira, segunda e terceira linha de denticulos. Adaptado de Devi *et al.*, 2016.

O desenvolvimento dos girinos foi determinado de acordo com Gosner (1960). Nesse esquema, são atribuídos 46 estágios ao desenvolvimento dos anura [Estágios de Gosner (Gs)], que compreendem o desenvolvimento a partir do ovo fertilizado (1G) até a completa metamorfose dos indivíduos (46 G).

3.9 AVALIAÇÃO DOS MELANÓFOROS

Os melanóforos são um atributo importante para ecologia de muitos girinos, como, por exemplo, a camuflagem e o aposematismo. Para a análise os indivíduos foram lateralmente fotografados e avaliamos a cobertura de células e as expansões dendríticas celulares na base da cauda. Às análises foram feitas considerando o padrão dos melanócitos dos indivíduos do controle negativo e a partir disso categorizamos os indivíduos como alteração presente ou ausente.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A visualização da variação na forma no espaço tangente ao espaço de forma foi realizada via análise das variáveis canônicas (CVA) com a projeção das coordenadas de forma sobre os escores dos eixos canônicos (ZELDITCH *et al.* 2012). A acurácia da discriminação dos grupos descrita pelos eixos da CVA foi realizada através da análise discriminante por validação cruzada, que particiona o espaço multivariado em regiões pré-definidas (tratamentos) e testa a alocação dos indivíduos a esses grupos conhecidos a priori utilizando a função canônica resultante da CVA. A visualização da variação da forma entre os espécimes associados aos quadrantes positivos e negativos em cada eixo será feita através do método de deformações em placas finas (TPS) (ZELDITCH *et al.* 2012). Essa função produz uma imagem (grids de deformação, vetores ou outlines) das deformações necessárias para transformar a espécie referência (configuração média) na espécie alvo (extremos dos CVs),

facilitando assim a interpretação dos padrões biológicos da variação na forma expressa pelas coordenadas de forma (Monteiro; Reis, 1999).

As diferenças na forma e de alometria entre os tratamentos foram testadas através de uma Análise de Covariância Multivariada (MANCOVA). Para analisar a variação no tamanho do centroide entre os tratamentos foi realizado uma Análise de Variância (ANOVA). As análises foram feitas usando um procedimento de permutação baseado na aleatorização dos resíduos (COLLYER; ADANS, 2018) para determinar a probabilidade da hipótese nula e o tamanho do efeito das variáveis preditoras (variável Z). Foi usando um número de permutações igual a 1000, a soma dos quadrados mínimos ordinários (OLS) como método de estimação dos parâmetros do modelo e a soma dos produtos cruzados do tipo I como forma de particiona a variância (COLLYER; ADANS, 2018).

Para testar se o desenvolvimento e a incidência de malformação variam em função dos tratamentos, foram ajustados modelos lineares generalizados (GLM), assumindo uma distribuição quasipoisson e função de ligação log para a análise do desenvolvimento e, uma distribuição binomial com função de ligação logit para a análise das malformações. Os testes a posteriori foram feitos com a comparação dos contrastes a posteriori estimados pelo método da média dos mínimos quadrados (médias marginais). Todas as análises foram realizadas em ambiente R versão 3.2.1 (R CORE TEAM, 2016), considerando alfa = 0,05 como critério para significância e intervalo de confiança de 95%.

4 RESULTADOS

4.1 CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO

Um total de 80 girinos foram analisados (20 por grupos experimental), sobre os quais o Roundup foi capaz de afetar igualmente as taxas de desenvolvimento ($F_{3,76}=6.84$, $p<0,01$, FIGURA 3) e crescimento ($F_{3,60}=8.54$, $P = 0.001$, FIGURAS 4 e 5). Os indivíduos do grupo controle, ao final do experimento, atingiram em média o estágio 31 de Gosner, com um tamanho médio de $17.72 \pm 1.90\text{mm}$, enquanto os girinos tratados com Roundup tiveram o tempo de desenvolvimento mais lento (FIGURA 3) e o crescimento reduzido (FIGURAS 4 E 5). Os primeiros sinais de efeito do tratamento com Roundup apareceram a partir da segunda concentração, com

indivíduos no estágio 29 e tamanho de $15.59 \pm 2.24\text{mm}$ para $2,8 \text{ mg}^{-1}$ (hipótese linear com o controle $p < 0,05$) e estágio 28 e tamanho $14.69 \pm 2.29\text{mm}$ para 4 mg^{-1} (hipótese linear com o controle $p < 0,001$). Já, quando avaliamos o tamanho, através do método de procrustes, ou seja, por meio do centroide, as diferenças entre os tratamentos se tornam um pouco diferentes, mas de igual forma com os primeiros sinais de efeito do Roundup ocorrendo a partir da segunda concentração (FIGURAS 4 E 5)

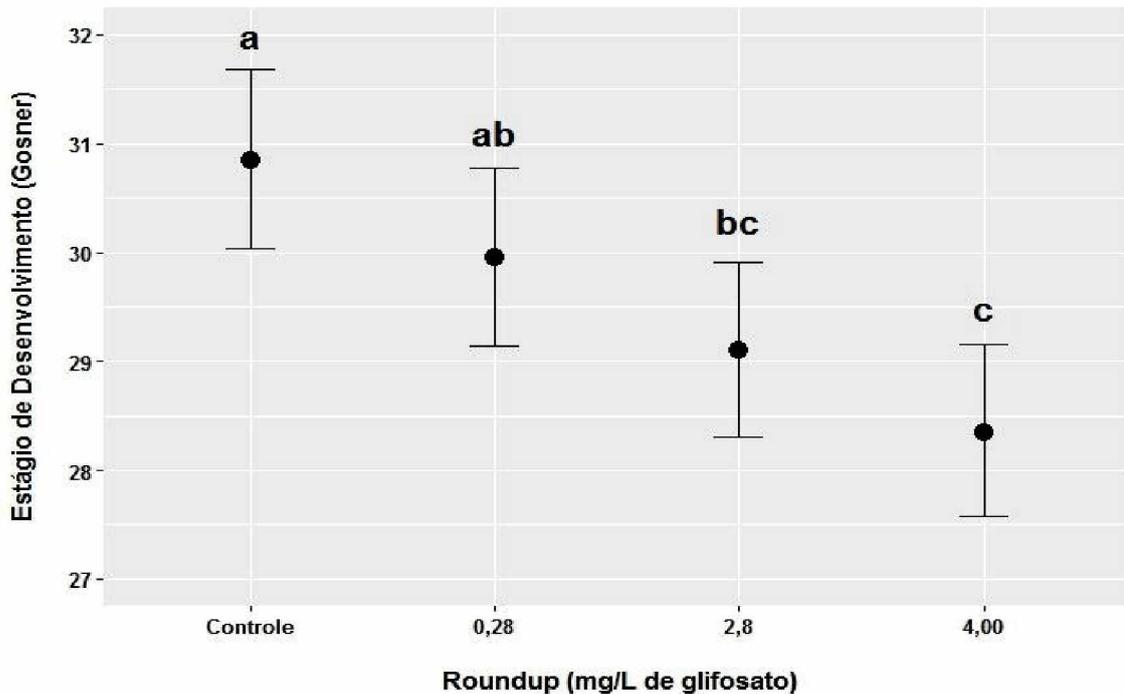


FIGURA 3: Estágio de desenvolvimento dos indivíduos de *Physalaemus cuvieri* após 12 dias de ensaio em sistema de renovação semi-estático. Os resultados estão expressos em média (ponto) e intervalo de confiança (barras) de 95%. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais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

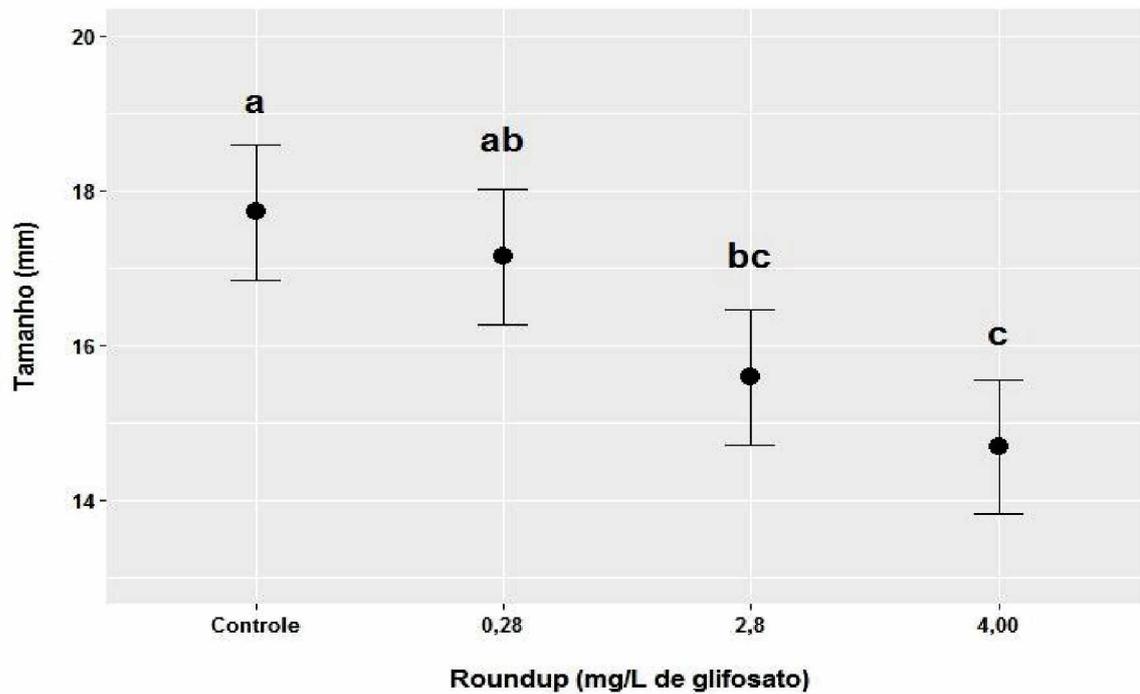


FIGURA 4: Tamanho total do corpo dos indivíduos de *Physalaemus cuvieri* após 12 dias de ensaio em sistema de renovação semi-estático. Os resultados estão expressos em média (ponto) e intervalo de confiança (barras) de 95%. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais ($p < 0,05$).

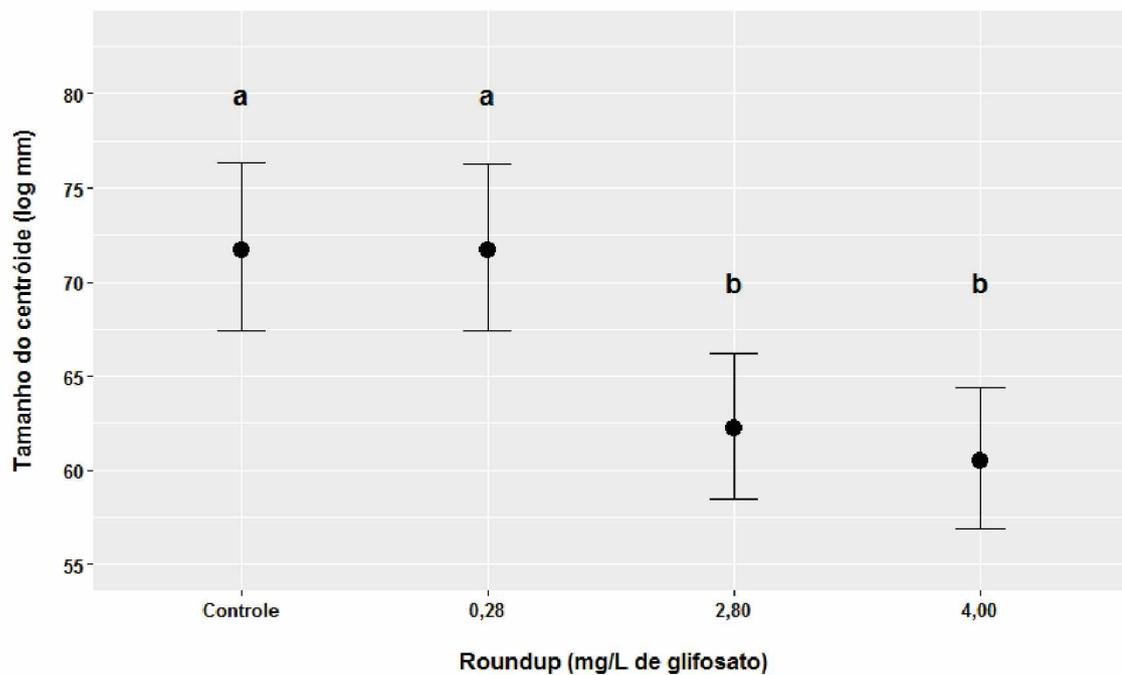


FIGURA 5: Tamanho do centróide dos indivíduos de *Physalaemus cuvieri* após 12 dias de ensaio em sistema de renovação semi-estático. Os resultados estão expressos em média (ponto) e intervalo de confiança (barras) de 95%. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais ($p < 0,05$).

4.2 MALFORMAÇÕES E PIGMENTAÇÃO

Dentre as alterações morfológicas descritas na literatura, nós observamos malformação no aparato bucal e no desenvolvimento dos melanóforos em todos os grupos experimentais.

Os girinos apresentaram um aumento na incidência de deformidades no disco oral, como por exemplo dequeratinização, fusão de lábios, ausência de lábios, ausência de dentículos e papilas. Tais respostas foram expressas de maneira concentração-dependente, após exposição ao Roundup ($F_{3,76} = 3,02$, $p=0,03$) (FIGURAS 6 e 7). Entretanto, apenas a terceira concentração testada exibiu valores significativos em relação ao controle (hipótese linear $p=0.032$) (FIGURA 6).

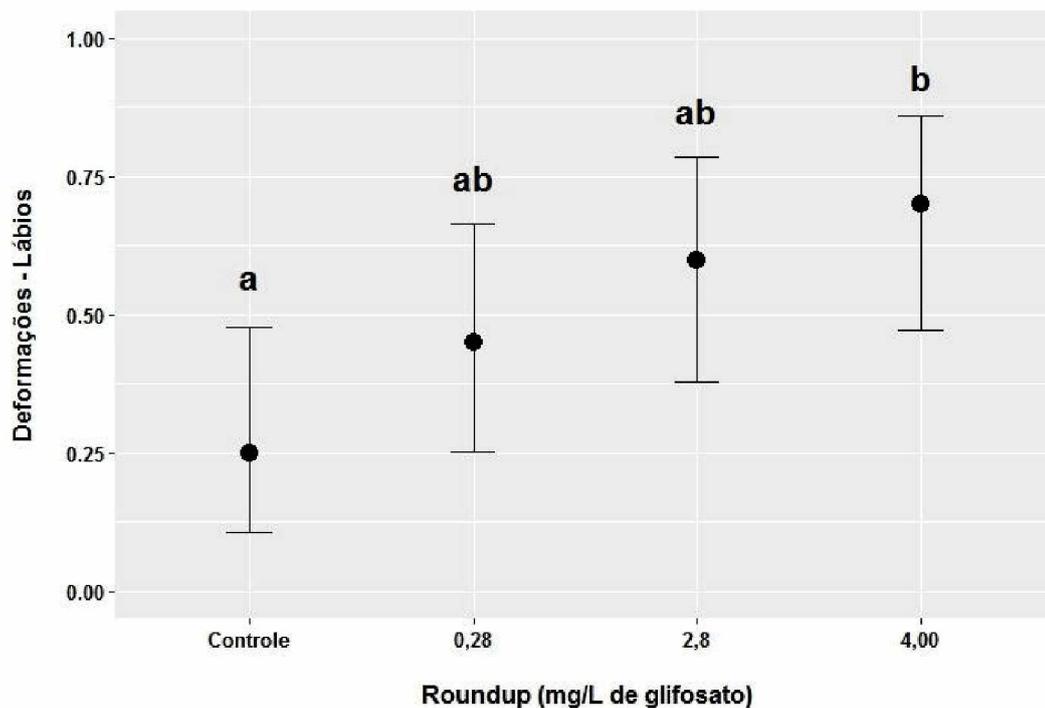


FIGURA 6: Probabilidade de ocorrência (log odds ratio) de malformação labial nos indivíduos de *Physalaemus cuvieri* após 12 dias de ensaio em sistema de renovação semi-estático. Os resultados estão expressos em média (ponto) e intervalo de confiança (barras) de 95%. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais ($p < 0,05$).

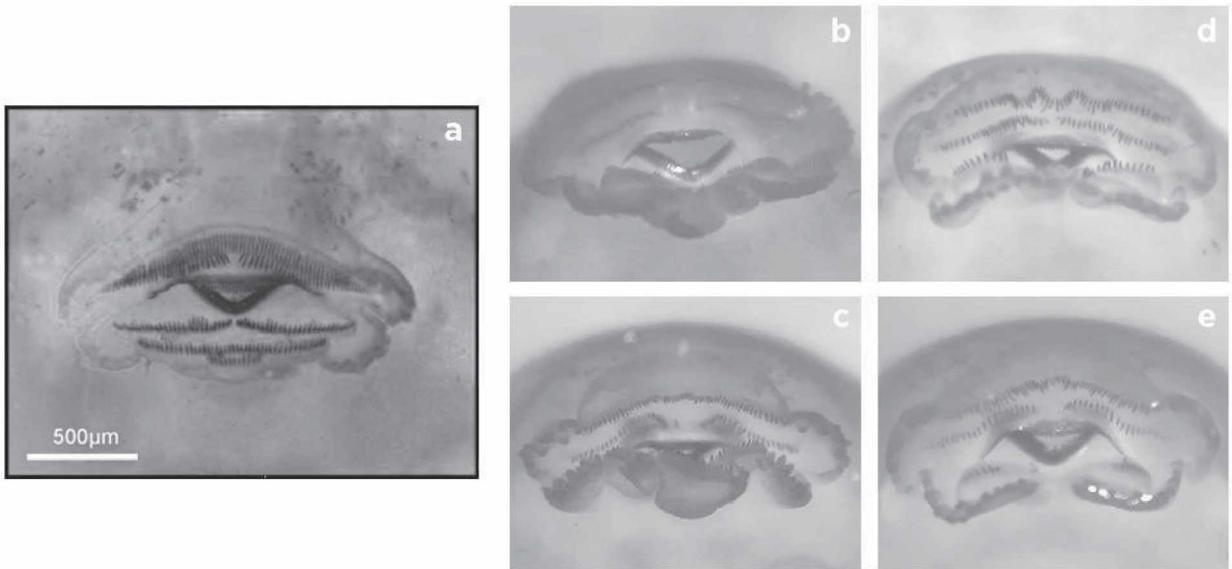


FIGURA 7: Disco oral dos indivíduos de *Physalaemus cuvieri*. A esquerda (a), imagem extraída e adaptada de Gonçalves, S. D. (2014), representando a estrutura padrão do aparato bucal, de *Physalaemus cuvieri*. As imagens b ,c ,d, e demonstram deformidades encontradas nos indivíduos tratados com Roundup em sistema de exposição crônico e semi-estático.

Foram notadas diferenças na pigmentação da pele dos girinos tratados com Roundup ($F_{3,76}=5,64$, $p=0.0015$). Estas diferenças estão relacionadas ao tamanho e desenvolvimento dos processos dendríticos dos melanóforos (FIGURAS 8 e 9). Embora T2 apresente uma redução expressiva, os melanóforos apenas significativamente decresceram com a exposição ao terceiro tratamento (hipótese linear com o controle $p=0.024$, FIGURA 8).

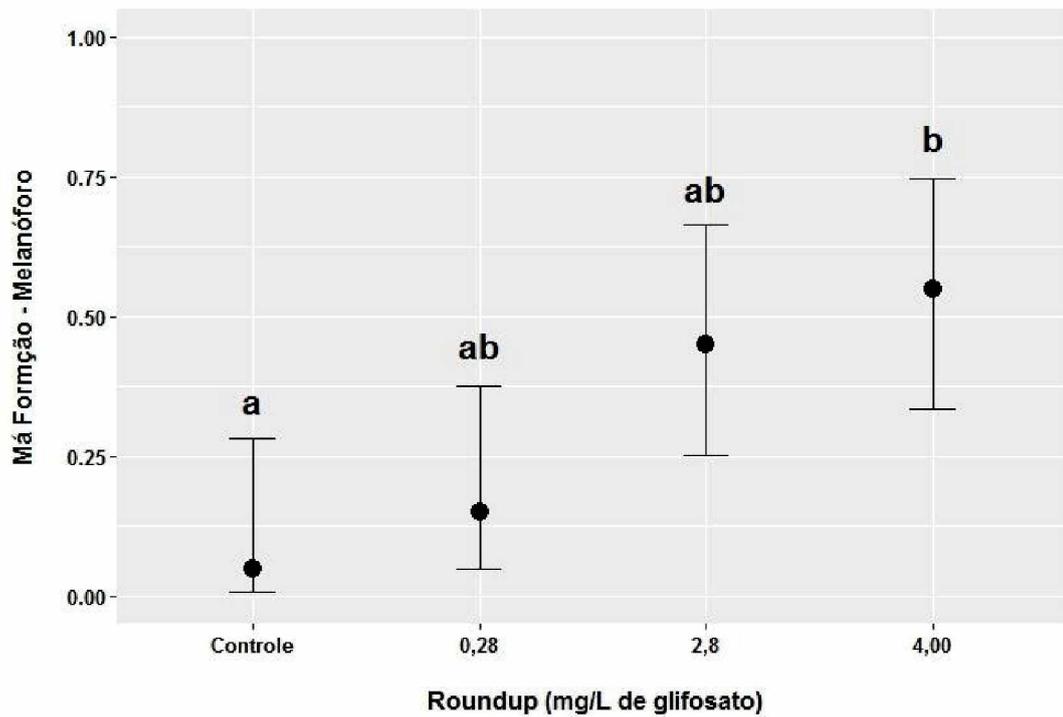


FIGURA 8: Probabilidade de ocorrência (log odds ratio) de malformação nos melanóforos dos indivíduos de *Physalaemus cuvieri* após 12 dias de ensaio em sistema de renovação semi-estático. Os resultados estão expressos em média (ponto) e intervalo de confiança (barras) de 95%. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais ($p < 0,05$).

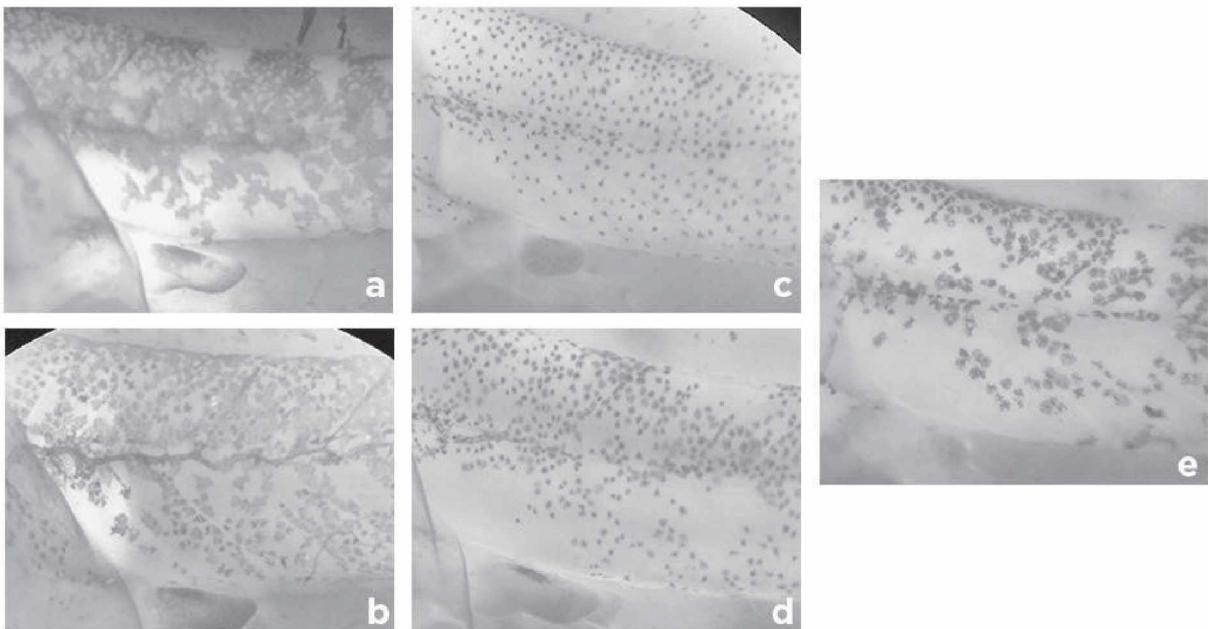


FIGURA 9: Imagens dos melanóforos, da região proximal-anterior da cauda, evidenciados. As imagens a e b representam os estados encontrados em maior frequência nos tratamentos CN e T1, ou seja, indicam a estrutura padrão dos melanócitos sob as mesmas condições. Já as imagens c, d, e representam a estrutura de melanócitos encontradas em maior frequência em T2 e T3, onde as células perdem ou reduzem suas extensões dendríticas.

4.3 AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA

Roundup foi capaz de induzir mudanças morfológicas significativas ($F_{3,63} = 1.74$, $P=0.04$, TABELA 3) nos girinos. Da variação na forma observada, 5% é explicada pelo tamanho dos girinos ($F_{1,63} = 3.44$, $P=0.008$, TABELA 3), sendo essa alometria constante entre os tratamentos ($F_{3,63} = 0.69$, $P=0.73$, TABELA 3). Ou seja, há uma homogeneidade nas trajetórias alométricas entre os tratamentos, ângulo e direção não diferem mais do que o esperado ao acaso. Como o efeito do tamanho na forma foi independente do efeito do tratamento na forma, a variação de forma encontrada é devido ao Roundup.

TABELA 3: ANÁLISE DE COVARIÂNCIA MULTIVARIADA (MANCOVA) DOS GIRINOS DE *Physalaemus cuvieri* (Fitz.) expostos ao Roundup.

	Df	SS	MS	Rsq	F	Z	Pr(>SS)
CS	1	0.01	0.01	0.05	3.44	2.32	0.008**
Trat	3	0.01	0.00	0.08	1.74	1.72	0.042*
CS:Trat	3	0.00	0.00	0.03	0.69	-0.68	0.768
Residuals	56	0.10	0.00	0.84			
Total	63	0.12					

Df – Graus de liberdade
 SS – Soma dos quadrados
 SM – Soma do Quadrados médios
 Rsq – R quadrado
 F – Estatística F
 Z – Estatística Z
 Pr – Valor de P
 CS – Tamanho do centroide
 Trat – Tratamentos experimentais

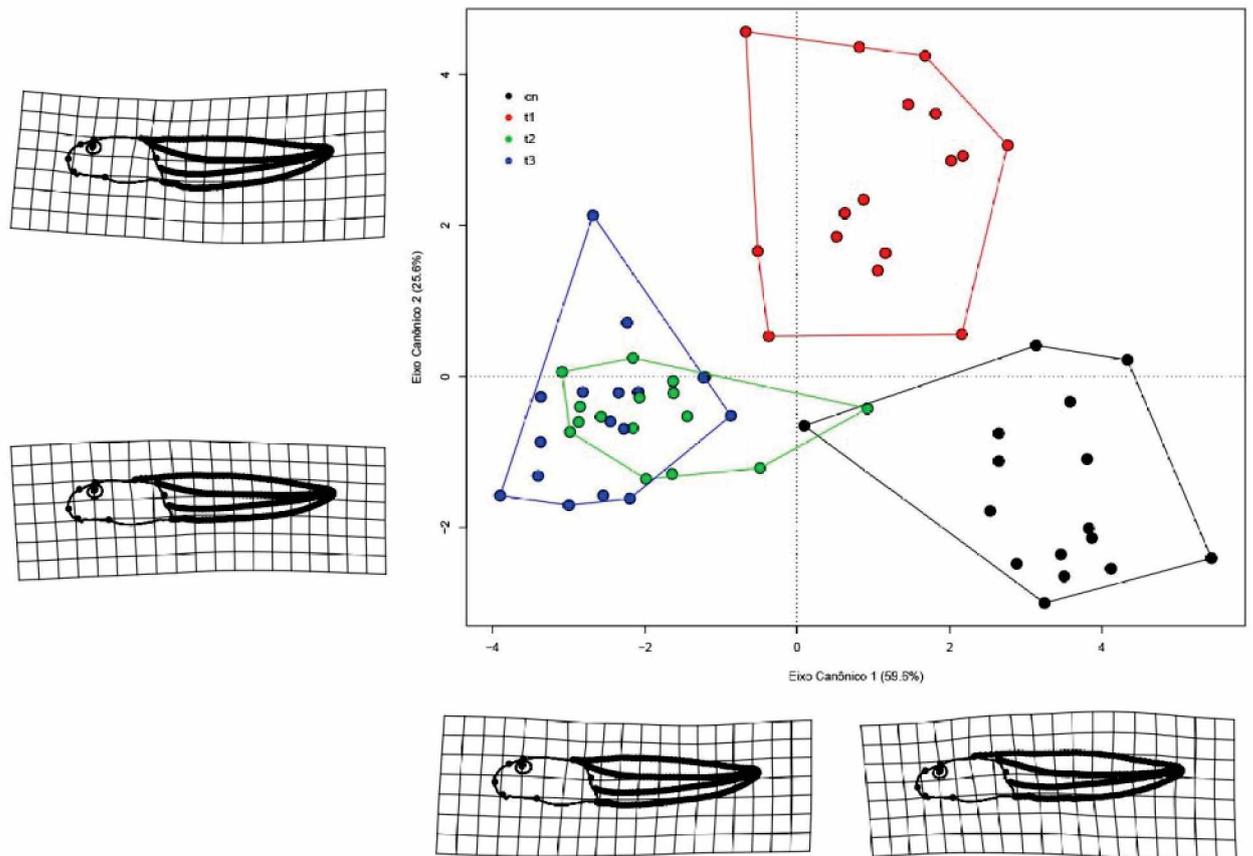


FIGURA 9: Posição dos indivíduos de *Physalaemus cuvieri* no espaço de forma construído pelas duas variáveis canônicas e a contribuição de cada eixo (entre parênteses) para a variações total. As deformações referem-se aos indivíduos com escores mais extremos nos eixos. Os indivíduos estão discriminados aos grupos controle (cn), tratamento 1 (t1 - 0,28 mg i.a. L⁻¹), tratamento 2 (t2- 2,8 mg i.a. L⁻¹) e tratamento 3 (t3 - 4,0 mg i.a. L⁻¹).

A análise de variáveis canônicas (CVA) (FIGURA 9 e 10) resultou em 3 eixos de variação, sendo que as duas primeiras variáveis canônicas explicam 86.1% da variação na forma. De maneira geral o padrão de variação ao longo dos 2 primeiros CVs refere-se a mudanças na altura, comprimento e formato da cauda e do corpo. As descrições comparando os tratamentos são baseadas no centroide do polígono da distribuição dos indivíduos de cada tratamento ao longo dos eixos. A variação na forma, que discrimina os grupos, teve grande suporte através da análise discriminante, na qual obteve-se uma acurácia geral de alocação dos indivíduos nos grupos de 95.31% (TABELA 4), indicando que a variação na forma induzida por Roundup formam grupos robustos e expressivamente discrimináveis.

TABELA 4: Resultado da análise discriminante, demonstrando o percentual de alocação dos indivíduos de *P. cuvieri* nos diferentes grupos experimentais a partir dos eixos das variáveis canônicas.

	CN	T1	T2	T3
CN	93.75	0.00	0.00	6.25
T1	0.00	93.75	6.25	0.00
T2	0.00	0.00	93.75	6.25
T3	0.00	0.00	0.00	100.00

Acurácia geral da classificação: 95.31 %

Estatística Kappa: 0.94

Na primeira CV há uma clara separação dos grupos controle e T1 de T2 e T3. Os tratamentos CN e T1 estão localizados no quadrante positivo do primeiro eixo, enquanto T3 e T2 orientados mais à direção negativa do eixo. Na segunda CV há uma separação dos girinos do tratamento T1 (quadrante positivo) com os girinos dos demais tratamentos (quadrante negativo).

Variável canônica 1- eixo positivo

Os girinos do grupo controle ocupam o espectro positivo do eixo, que descreve mudanças em relação a forma média ou referência, relacionadas a uma cauda ligeiramente mais comprida, com os marcos na região distal terminal se deslocando mais à direção posterior no sentido ventro-dorsal, tornando essa região mais deprimida ou prostrada. A ponta da cauda se torna ligeiramente mais afilada. Como um todo a cauda pode ser considerada mais retilínea, tomando-se como referencial os marcos 8 e 12. Na região distal terminal, os marcos da nadadeira ventral e dorsal movimentam-se na direção póstero-ventral.

A inserção da nadadeira dorsal na região proximal anterior se desloca mais anteriormente no corpo dos indivíduos. Possui um ligeiro aumento na altura na região proximal anterior, onde posteriormente os marcos se deslocam, de maneira sutil, no sentido antero-ventral e, posteriormente na região proximal posterior se estendendo até a parte da região anterior, se deslocam pra cima, assumindo o mesmo formato, em relação a forma média, até a depressão final da cauda na região distal terminal.

A nadadeira é marcadamente menor na região ventro-proximal inteira com uma projeção dos marcos nos dois setores proximais se deslocando no sentido

dorsal-posterior, sofrendo desse modo uma leve depressão. Posteriormente, na região distal anterior os marcos se deslocam ligeiramente no sentido antero-ventral. Com os marcos da região distal terminal deslocando-se mais ventro-posterior.

Na região dorsal da nadadeira a partir da inserção no corpo os marcos da região proximal anterior se deslocam no sentido anterior e mais acima, mais dorsal, em seguida os marcos sofrem então uma leve depressão e posteriormente nas regiões proximal posterior e distal anterior os marcos se deslocam no sentido anterior e mais acima. Na região distal terminal os marcos se deslocam para baixo e posteriormente.

De maneira geral a musculatura da cauda se torna acentuadamente delgada, com os marcos ventrais da região proximal anterior até a região proximal posterior sofrendo deslocamentos no sentido dorsal, na região proximal anterior no sentido posterior e na região proximal posterior e distal anterior deslocando-se no sentido anterior. Dorsalmente a inserção da musculatura é ligeiramente anterior, com a região proximal posterior se deslocando para cima e a partir da região proximal posterior até a região distal terminal os deslocamentos ocorrem no sentido ventro-anterior. Ao final da cauda, ambos os lados ventral e dorsal, os marcos se deslocam no sentido ventro-posterior.

O corpo é mais alto, sentido dorso-ventral, especialmente após as inserções da nadadeira e musculatura dorsal. No sentido antero-posterior ocorre uma leve depressão após a inserção da nadadeira da cauda no dorso, mas especialmente na região dos olhos e focinho, tornando assim o corpo mais dorso-deprimido e de focinho mais cavado em relação ao corpo.

Em resumo a musculatura da cauda é mais delgada, de forma geral a nadadeira possui ondulações (variações nas regiões com aumentos e decréscimos em comparação a forma média) dos marcos ao longo do shape. Mas, contudo, sofrendo uma leve redução da altura nadadeira, especialmente na posição ventro-proximal. Além de uma cabeça mais rombuda.

Variável canônica 1- eixo negativo

Ao longo da amplitude do eixo negativo as modificações em relação a forma média podem ser descritas pelo corpo apresentando uma projeção anterior da região

proximal no polo cefálico, assim como um deslocamento dos marcos no sentido dorso-anterior, o focinho (que inclui o marco 3 - ponto extremo) apresenta um aspecto ligeiramente mais agudo nessa região.

A inserção da nadadeira dorsal na região proximal anterior é mais plana e posterior, além de mais elevada, acompanhando o corpo que se torna também mais elevado. Porém, levemente deprimida nos marcos que seguem ainda na região proximal anterior, e em seguida há um leve aumento na altura, ou seja, há um deslocamento dos marcos para cima e posteriormente, na região proximal posterior. A nadadeira dorsal sofre um afilamento tênue a partir da região proximal posterior e distal anterior no sentido ventro-posterior, seguido de uma elevação na altura da nadadeira, na região distal terminal há um deslocamento dos marcos para cima e na direção anterior.

A região ventral na posição proximal da nadadeira da cauda é marcadamente mais ampla, com os marcos deslocando-se no sentido ventro-anterior. A partir da região distal anterior os marcos se deslocam no sentido dorso-posterior seguido de um deslocamento dorso anterior na região distal terminal.

A linha entre a inserção da musculatura e a inserção da nadadeira na região dorsal proximal anterior, junto ao corpo, é menor e mais angulada. De maneira geral, a musculatura da cauda sofre uma dilatação, desde a região proximal anterior, mas especialmente na região proximal posterior e distal anterior, com os marcos ventrais deslocando-se mais ventralmente e posterior enquanto os dorsais deslocando-se mais dorsalmente e posterior, de maneira a ampliar a altura da cauda, na região proximal anterior os marcos ventrais se deslocam acentuadamente para baixo, ou mais ventral, no sentido anterior, enquanto os marcos dorsais ligeiramente também se deslocam no sentido ventral.

A ponta da cauda, região distal terminal (nadadeira e musculatura), se torna mais curvada e elevada, com os marcos deslocando-se no sentido ventro-dorsal e anterior. Desse modo a cauda se torna ligeiramente mais curta e com a ponta mais obtusa ou abaulada.

Variável canônica 2 - eixo positivo

No O segundo eixo da CVA separa o tratamento T1 dos tratamentos T2 T3 e CN. T1 está localizado no quadrante positivo do eixo, enquanto T3, T2 e CN estão mais orientados ao longo do quadrante negativo do eixo. O quadrante positivo do eixo descreve mudanças em relação a forma média ou referência como o corpo ligeiramente menor (menos comprido) com os marcos do ponto extremo do focinho (3) e margem anterior e superior da região cefálica (2 e 10, respectivamente) movendo-se mais à direção dorso-posterior enquanto o marco 8 movendo-se mais anteriormente. A posição do corpo é mais elevada, entretanto a margem posterior do corpo (polo abdominal) é maior em relação aos marcos de inserção ventral e dorsal da nadadeira caudal, ou seja, um pouco menor em comprimento e maior em altura na região posterior.

A inserção da nadadeira é mais elevada junto a parede do corpo, na região dorso-posterior, seguindo-se uma tênue depressão dos marcos na região distal anterior e mantendo-se aproximadamente o mesmo formato em relação a forma média até a região distal anterior, entretanto com pequenos deslocamentos, tanto ventral quanto dorsal, mas sempre com deslocamentos no sentido anterior. Na região distal terminal os deslocamentos são mais expressivos, com os primeiros marcos deslocando-se de modo elevado para região dorso-anterior. Na região distal terminal da cauda, tanto ventral quanto dorsal, os marcos se deslocam de modo a elevar a cauda formando uma curvatura, ou seja, alguns marcos se deslocam para cima ou no sentido dorsal reto e outros no sentido anterior.

A região ventral da nadadeira aumenta, com os marcos da região que se estende desde a proximal anterior até a distal anterior se deslocando anteriormente e com maior distanciamento ventral de modo a ampliar a altura da cauda. A nadadeira é relativamente maior, em comprimento e altura, enquanto a ponta é mais abaulada

A musculatura se desloca para baixo e anteriormente da região que corresponde a proximal anterior a distal anterior, se tornando mais cavada e segue a curvatura da região distal terminal com os marcos se deslocando dorso-anterior.

O focinho é menos curvado, mais plano, enquanto a região anterior aos olhos a parede do corpo é mais cavada (depressão). A ponta da nadadeira é mais dilatada. Em relação ao corpo a nadadeira se torna mais comprida e maior de maneira geral.

Variável canônica 2 - eixo negativo

o quadrante negativo do segundo CV descreve mudanças contrárias ao quadrante positivo como exemplo a inserção dorsal da nadadeira no corpo, região proximal anterior, é mais cavada e anterior, com os marcos se deslocando no sentido anterior e ventral (para baixo), seguido de uma leve elevação dos marcos e um aumento da altura a partir da região proximal anterior e ao final, a partir da proximal posterior até a região distal terminal há uma protusão e afilamento da ponta da cauda (musculatura e nadadeira), tornando uma cauda ligeiramente de menor elevação, com um leve aumento da musculatura.

A inserção dorsal da nadadeira é mais anterior, com os marcos se deslocando na direção dorso-anterior, e ao final, na região distal terminal, ventro-posterior, com os últimos marcos deslocando-se apenas na direção ventral, movimentos esses envolvidos na protusão da ponta da cauda. A cauda é ligeiramente menor – comprimento - . O corpo é ligeiramente maior, com focinho mais deprimido e obtuso.

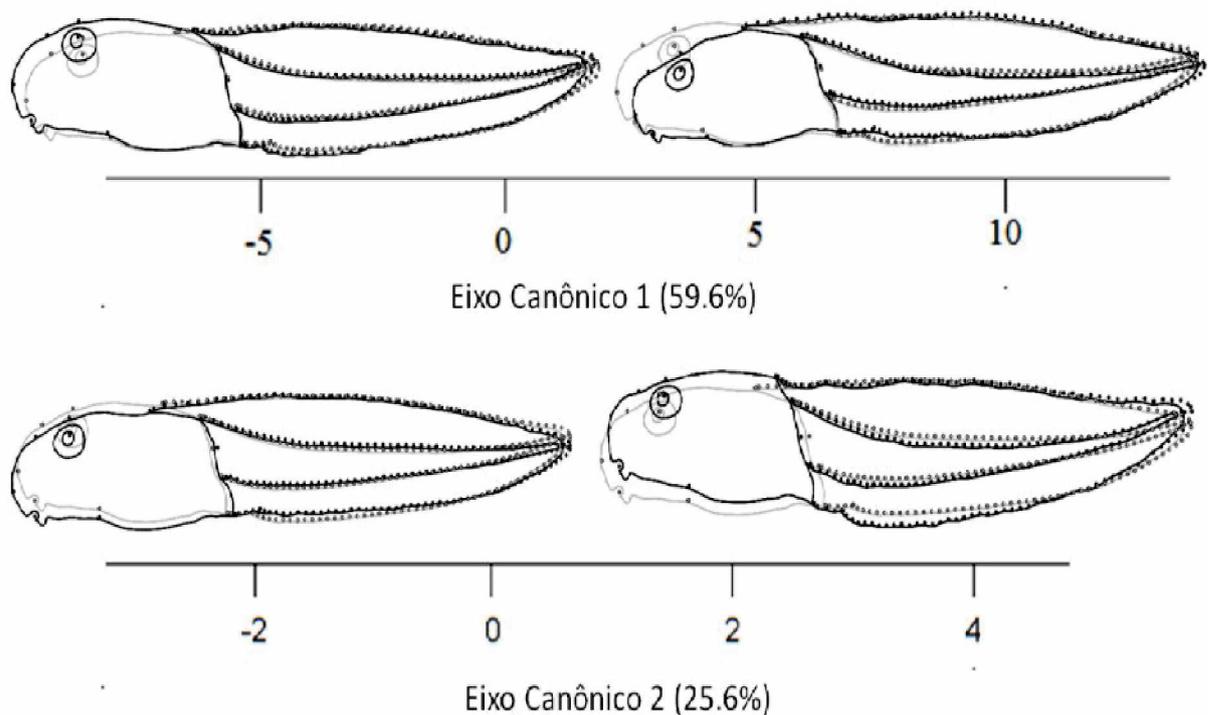


Figura 10: Modificações apresentadas, em relação a forma média, por indivíduos dos extremos de dois CVs. O extremo do espectro negativo da primeira variável canônica é representado por um indivíduo do tratamento 3, enquanto no extremo positivo é representado por um indivíduo do controle negativo. Já na segunda variável canônica indivíduos do T1 e CN são representados no eixo negativo e positivo respectivamente. Em cinza é representado a forma média ou referencial, enquanto em preto a forma (indivíduo) alvo. As alterações estão magnificadas em 5x.

Síntese das transformações na forma dos indivíduos de P. cuvieri

Em resumo o primeiro eixo descreve mudanças no tamanho não alométrico do corpo e nadadeira (comprimento e altura) além do formato. O eixo positivo, onde se encontram os tratamentos CN e T1, os girinos possuem o focinho mais plano e o polo encefálico dorso deprimido e angulado negativamente, apresentando um corpo menor (altura e comprimento) enquanto os indivíduos do eixo negativo, T2 e T3, possuem o focinho mais obtuso, abaulado, com a parede do corpo dorsal indo de mais plana a angulada positivamente e com o corpo maior (altura e comprimento). A inserção da nadadeira da cauda no eixo positivo (CN e T1) é mais anterior na parede dorsal do corpo, é também mais alta mais e cavada. Enquanto no eixo negativo (T2 e T3) a nadadeira se insere mais posteriormente, e com uma leve depressão. Há ainda mudanças no tamanho e forma da cauda (nadadeira e musculatura). A cauda no eixo positivo (CN e T1) é menor em altura (musculatura e nadadeira) e sutilmente maior em comprimento, a ponta da cauda é relativamente mais prostrada e retilínea em seu eixo central, tenuamente mais fina. Já no eixo negativo (T2 e T3), a cauda de maneira geral é maior em altura (musculatura e cauda) e sutilmente menor em comprimento devido a curvatura dorsal na ponta.

Já no segundo CV, as modificações, de maneira geral, estão relacionadas com as alterações no primeiro eixo, entretanto com pequenas variações e de menor intensidade nas transformações. No eixo positivo onde se localiza T1 o corpo é mais elevado, com o dorso mais abaulado/arqueado o focinho é mais elevado e plano e a região distal do polo abdominal mais alta, o corpo é ligeiramente menor em comprimento. A inserção da nadadeira é mais posterior na parede do corpo e mais elevada, seguida de uma depressão, a cauda é rebaixada no sentido ventral, entretanto com maior altura, enquanto a região terminal sofre uma curvatura no sentido ventro-dorsal. No eixo negativo (CN, T2 e T3) a inserção da nadadeira é anterior e mais cavada (angulada), na cabeça, todos os marcos se movimentaram para região ventral, deixando o focinho mais abaulado e angulado, tornando-se mais deprimido em seu ponto extremo. O dorso do corpo sofre uma depressão na região do polo abdominal, o corpo é levemente mais comprido, tomando como referencial os marcos 3 e 8. A cauda é menor em altura de maneira geral, e retilínea. Além de sofrer uma compressão no sentido ventro-dorsal e uma prostração na região terminal.

5 DISCUSSÃO

Nossos resultados indicam que o Roundup foi capaz de alterar a morfologia, as taxas de crescimento e de deformidades (relacionadas ao disco oral e a pigmentação) dos girinos de *Physalaemus cuvieri*. De maneira geral, as mudanças induzidas pelo agrotóxico na forma podem ser descritas pelo aumento da altura da nadadeira caudal e redução do comprimento e curvatura da cauda, além de corpos relativamente menores, bem como indivíduos menores quando comparados ao controle (tamanho do centroide).

Tais alterações são consistentes com as encontradas em trabalhos anteriores com larvas de anfíbios expostas a formulações de Roundup com concentrações semelhantes a 2 mg L^{-1} , e assemelham-se parcialmente as morfologias induzidas por predadores (larvas de libélula) em algumas espécies. Especificamente, a exposição ao Roundup induziu um aumento na altura da cauda em girinos de *Rana pipiens*, *Rana sylvatica* e *Hyla versicolor* na mesma direção e extensão, ou parcialmente no caso de *H. vesicolor*, que dos indivíduos expostos apenas às ninfas de libélula (RELYEA, 2012; KATZENBERGER *et al.*, 2014). Outro estudo realizado por Levis *et al.* (2016) com larvas de salamandras (*Ambystoma maculatum*) também verificou uma variação na forma, dentre outras alterações, associada com um aumento no tamanho lateral da cauda após exposição ao Roundup.

A plasticidade fenotípica é uma das respostas evolutivas que pode permitir aos organismos maximizarem sua aptidão em ambientes heterogêneos, espacial ou temporalmente. Nesses ambientes a seleção favorece diferentes fenótipos e não um fenótipo ótimo. Portanto dependendo das condições ambientais há um trade off no valor adaptativo dos diferentes fenótipos nos diferentes ambientes (MCCOLLUM; VAN BUSKIRK, 1997). Dessa forma, a morfologia induzida por um predador pode ser uma resposta adaptativa que proporciona benefícios antipredatório, mas que podem incorrer em custos em ambientes livres de predadores (MCCOLLUM; VAN BUSKIRK, 1996, VAN BUSKIRK *et al.*, 1997). Embora as respostas sejam predador-presa específicas (RELYEA, 2001; 2004a), na maioria dos casos, os girinos respondem aos predadores aumentando a altura da nadadeira. Essa alteração ajudaria o girino a evadir de ataques de predadores, ao custo de desenvolver corpos relativamente

menores (trade-off energético), que levam a um crescimento mais lento, provavelmente devido ao reduzido consumo de alimento e reduzida eficiência na digestão (MCCOLLUM E VAN BUSKIRK, 1996; RELYEA, 2004b; RELYEA; AULD 2004, 2005).

Até onde sabemos a consequência da plasticidade morfológica induzida pelo Roundup sobre a aptidão individual é desconhecida. Entretanto, se o estressor é novo na história evolutiva, possivelmente as normas de reação moldadas ao longo da história evolutiva pela seleção não sejam adequadas para responder a essa nova pressão, no caso o agrotóxico (GHALAMBOR *et al.*, 2007). Nesse cenário, a maioria das variantes induzidas, como no caso do Roundup, podem provavelmente ser casos de plasticidade não adaptativa, onde os distúrbios do desenvolvimento e ou dos processos fisiológicos resultam em fenótipos ambientalmente induzidos com um reduzido valor adaptativo em relação ao fenótipo constitutivo (GHALAMBOR *et al.*, 2007). Dessa forma, segundo Relyea (2012) pode-se prever que a indução do Roundup pode ter um custo associado ao crescimento reduzido. Como no presente estudo onde os tratamentos em que as mudanças foram mais expressivas - T2 e T3 - tiveram o crescimento e o desenvolvimento reduzidos em relação ao controle. Por outro lado, T1 que também apresentou uma morfologia induzida, na mesma direção, não apresentou um efeito sobre o tamanho como predito, sugerindo uma resposta dose-dependente.

Respostas parcialmente semelhantes foram encontradas em experimentos em messocosmos, onde as concentrações (0 a 2 mg e.a. L⁻¹) que promoveram alterações na forma não tiveram efeito sobre o tamanho, assim como no T1 deste trabalho. Ao contrário do que encontramos, como resposta à maior concentração, houve efeitos sobre o tamanho e a forma. Já, em Relyea (2012) a maior concentração (3 mg e.a. L⁻¹) usada afetou o tamanho dos girinos e induziu uma alta mortalidade, o que impediu a avaliação da forma (RELYEA, 2012). Por outro lado, a exposição em condições laboratoriais a 2 mg L⁻¹ de glifosato Roundup resultou em um crescimento mais lento das espécies de girinos testadas (RELYEA, 2004b), como o encontrado em *P. cuvieri* nesse trabalho. Em larvas de anfíbios o crescimento reduzido está associado com um aumento na susceptibilidade ao dessecamento das poças, uma menor sobrevivência após a metamorfose e um menor sucesso reprodutivo (SMITH, 1987; SEMLITSCH *et al.*, 1988, NEWMAN, 1988, ALTWEGG E REYER, 2003).

Embora não haja evidências diretas dos mecanismos para a resposta plástica ao Roundup ser semelhante àquela induzida por predadores, alguns autores sugerem que o Roundup pode interferir com os hormônios do estresse, que induzem as respostas antipredatórias (GLENNEMEIER; DENWER, 2002). Além disso, é possível que o agrotóxico e as pistas do predador, em alguma extensão, ativem vias endócrinas compartilhadas (RELYEA, 2012; KATZENBERGER *et al.*, 2015), gerando respostas semelhantes na forma.

Por outro lado, contrariamente à literatura acima discutida, os dados aqui encontrados com relação a alometria, indicam que possivelmente os efeitos sobre a forma não estão em absoluto associados ao tamanho e desenvolvimento reduzidos. Uma vez que o tamanho é responsável por apenas 5% da variação na forma.

Muita embora os mecanismos moleculares subjacentes não sejam completamente conhecidos, existem algumas hipóteses possíveis para a aparente associação da plasticidade fenotípica de modo geral ao crescimento e desenvolvimento reduzido. Um exemplo são os custos da detoxificação e reparação de tecidos. Isso leva ao aumento das demandas energéticas implicando em menor disponibilidade para outras relações de crescimento. Pois o Roundup pode causar stress oxidativo o que leva a danos em tecidos como brânquias, fígado e rins, além de aumentar o metabolismo energético causando uma depleção massiva das reservas de energia, como glicogênio, proteínas e lipídios (DORNELLES; OLIVEIRA, 2013, BURRACO; GOMEZ-MESTRE, 2019). É conhecido também que o glifosato atua como um desregulador neuro-endócrino, afetando vias envolvidas no eixo hipotálamo-hipófese-tireoide (LAJMANOVICH *et al.* 2019) e do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (BURRACO; GOMEZ-MESTRE, 2019). Tais eixos modulam uma cascata hormonal, envolvidas nas respostas ao estresse, sistema imunológico, na síntese de hormônios, taxas metabólicas e desenvolvimento, que podem levar a mudanças estruturais nos tecidos e na fisiologia dos girinos, afetar a expressão de genes do metabolismo antioxidante e de genes envolvidos no controle da metamorfose (LANCTÔT *et al.*, 2013; MIYATA; OSE, 2012; de SOUZA *et al.*, 2017).

Apenas exemplificando, dentre as diversas vias de ação, o glifosato inibe a expressão ou reduz a atividade de diversas enzimas, especialmente da família P450 e proteínas reguladas por hormônios. Essa atividade ocorre em pontos críticos da via de síntese dos hormônios esteroidais, reduzindo assim a produção dos precursores destes hormônios que são de fundamental importância como, por exemplo, o controle

metabólico, equilíbrio eletrolítico, comportamento e características sexuais. Da mesma forma o glifosato possui efeitos deletérios nas vias de sinalização do ácido retinóico, através da inibição da enzima CYP26, que degrada o ácido retinóico. O ácido retinóico serve como um sinalizador molecular que guia o desenvolvimento, organogênese e morfogênese inicial, como por exemplo o desenvolvimento dos olhos e do eixo antero-posterior, através da manutenção de um gradiente de ácido retinóico durante as primeiras etapas do desenvolvimento (DUESTER, 2008; PAGANELLI et al., 2010). Além disso o efeito do glifosato sobre os hormônios da tireoide é marcadamente relevante, pois estão envolvidos, dentre outros, na metamorfose atributo central da história de vida dos anuros, refletido na sua sobrevivência (DENVER, 1998). O glifosato por exemplo reduz a taxa de expressão gênica do receptor nuclear dos hormônios da tireoide, o $\text{tr}\beta$, inibindo assim a expressão de genes chave para o desenvolvimento e metamorfose. Inibe também a expressão de enzimas deiodenases, responsáveis por metabolizar os hormônios esteroidais, transformando-os da forma inativa para biologicamente ativa (LANCTÔT, 2013).

Em resposta a ruptura de eixos hormonais e taxas metabólicas, pode haver alterações na produção de espécies reativas de oxigênio e no sistema antioxidante, o que pode acarretar danos em moléculas como lipídios, proteínas e DNA, prejudicando dessa forma a funcionalidade de diversas células e tecidos. Nesse sentido, de acordo com Burraco & Gomez-Mestre (2016) o glifosato, em níveis não letais, alterou os níveis de corticosterona, da taxa metabólica e da atividade de enzimas antioxidantes. E, como resultado, aumentou a demanda energética, além de levar a um estado de estresse oxidativo. Em conjunto tais mecanismos têm potencial para afetar a forma e o padrão de crescimento e de desenvolvimento dos girinos. Efeitos estes de alto significado ecológico para os indivíduos, com implicações no valor adaptativo, incluindo a sobrevivência.

Em concordância com a literatura (HEDBERG; WALLIN, 2010), nós encontramos efeitos do Roundup sobre o tamanho, morfologia e no padrão de organização dos melanóforos, de modo concentração-dependente, mas, especialmente e de maneira significativa, no terceiro tratamento. Os mecanismos subjacentes a alterações celulares foram investigados por Hedberg e Wallin, (**op. cit**), onde o Roundup afetou o transporte celular dos melanossomos nos melanóforos de uma espécie de anuro (*Xenopus laevis*), bem como a morfologia e a integridade do citoesqueleto, impactando assim a adesão celular. Especificamente, os microtubulos

perderam a sua organização e tais distúrbios podem afetar marcadamente a eficiência do transporte dos melanossomos, conforme observado (HEDBERG; WALLIN, 2010). Dentre os mecanismos propostos para tais alterações, pelos autores acima citados, envolvem mudanças no pH e no balanço de Ca^{2+} , o que leva a uma série de distúrbios em cadeia que acarretam na perda da homeostase celular e no padrão de expressão gênica, tais disfunções podem resultar em alterações deletérias na forma e função celular, no caso específico pode afetar a localização do cito esqueleto, morfologia e adesão das células (HEDBERG; WALLIN, 2009). Tais mecanismos podem ser, portanto, ao menos em parte, responsáveis pelas alterações encontradas no presente trabalho.

Nesse mesmo sentido no presente estudo foi observado um aumento nas taxas de deformidades no disco oral, que pode segundo Devi *et al.* (2016) ser explicado devido ao baixo pH ou falhas de desenvolvimento. O aparato bucal dos girinos é uma estrutura complexa e altamente variada (ALTIG, 2007 a; b), composta de lábios, dentículos e mandíbula queratinizada, além de papilas. O arranjo das partes que o compõe está de maneira geral adaptativamente ajustados a história de vida de cada espécie através das pressões de seleção (ALTIG, 2006). O aparato bucal não está envolvido apenas na ancoragem e aquisição de recursos alimentares, mas também, possivelmente, as papilas exerçam funções sensoriais químicas e táteis, assim como uma estrutura que controla o fluxo de água através da boca dos indivíduos (MCDIARMID; ALTIG, 1999). Portanto, alterações nesta estrutura podem ter efeitos deletérios no desenvolvimento e sobrevivência dos indivíduos. Por exemplo, anomalias morfológicas no aparelho bucal afetam o comportamento e a eficiência de forrageio (HOPKINS *et al.*, 2000) e, de acordo com Tolledo *et al.* (2014), os indivíduos passam menos tempo forrageando e adquirem menos recurso alimentar quando comparado a indivíduos sem alterações no aparelho bucal.

Enquanto sistema complexo e frágil, diversos são os fatores ambientais, incluindo xenobióticos, que são descritos na literatura como indutores de malformações. Entretanto, de todas as variáveis físico-químicas dos sistemas aquáticos já analisados, o pH é um dos fatores mais importantes com efeitos severos sobre componentes estruturais, fisiologia, e diversos aspectos da ecologia das espécies, como comportamento, crescimento e desenvolvimento (GOSNER; BLANCK, 1957; ROWE *et al.*, 1998; CHRISTOPHER *et al.*, 1996). Considerando que o Glifosato é um ácido fraco, os efeitos encontrados podem estar relacionados a este

aspecto da natureza química deste agrotóxico. No trabalho desenvolvido por Devi *et al.* (2016), no qual os autores avaliaram o efeito do pH sobre a estrutura do aparato bucal de duas espécies de anura, as alterações encontradas, como danos no revestimento da mandíbula, deformações e ausência de dentículos ambas estruturas queratinizadas, além de alterações nas papilas e lábios se assemelham aos encontrados no presente estudo. O mecanismo proposto pelos autores é o efeito do pH sobre o processo de mitose, através da dependência da carga líquida da tubulina pelo pH, afetando assim a dinâmica do microtúbulo durante a mitose. Indicando os autores que as estruturas compostas por tecidos moles vivos do disco oral, como papilas e lábios e células basais às estruturas queratinizadas possuem uma alta taxa mitótica ou mitoticamente ativos, e desse modo passíveis de sofrerem os efeitos deletérios do pH sob a divisão celular. Portanto, além do Ph, dentre os mecanismos envolvidos nos distúrbios do desenvolvimento e crescimento dos indivíduos, o efeito do glifosato sobre o desenvolvimento correto do disco oral possa ser considerado como uma hipótese adicional de causa.

Por fim, embora os mecanismos subjacentes aos efeitos encontrados não sejam em absoluto compreendidos e que em alguns casos não haja evidências diretas apenas hipóteses, independentemente da via de ação, seja ela direta - sobre o crescimento, desenvolvimento, forma e morfologia - ou indireta, através dos custos energéticos e quebra da homeostase fisiológica, existe um efeito potencial do Roundup original no valor adaptativo dos girinos. Considerando que os anfíbios anuros são um importante componente para manutenção do equilíbrio de diversos ecossistemas, uma vez que ocupa uma posição relevante na cadeia trófica, enquanto consumidor intermediário os efeitos sobre indivíduos podem ser transferidos para outras escalas da hierarquia ecológica, como populações comunidades e ecossistemas.

Além disso, dada as incongruências, ainda que exaustivamente apresentado pela ciência independente o poder deletério do Roundup, torna-se ainda necessário a ampliação do arcabouço experimental, correlacional e epidemiológico para aumentar o peso da evidência, desse de qualquer outro agrotóxico, demonstrando a insustentabilidade desse pacote-tecnológico, seus riscos, perigos e consequências sobre a biota nativa e os ecossistemas.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste estudo demonstram que a exposição de girinos de *Physalaemus cuvieri* ao Roundup afeta a forma e o tamanho dos indivíduos. Além de provocar efeitos deletérios como a malformações do aparato bucal e das células pigmentares, corroborando assim a generalidade dessas respostas entre diferentes espécies de anfíbios. Tais efeitos têm potencial para afetar a sobrevivência e o sucesso reprodutivo dos indivíduos e, portanto, podem influenciar a dinâmica populacional. Estudos futuros devem investigar as consequências da plasticidade morfológica induzida pelo Roundup sobre a aptidão individual bem como o mecanismo através do qual estas respostas são induzidas. É também necessário investigar os efeitos da pigmentação sobre a aptidão individual. A cada conhecimento adicional relacionado aos fatores que afetam o valor adaptativo dos indivíduos desse grupo que sofre taxas alarmantes de extinção, são de grande valia, além disso como são importantes componentes dos ambientes aquáticos possuem potencial para serem utilizados como bioindicadores da saúde desses sistemas.

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 o valor adaptativo e a sobrevivência dos girinos. A partir disso, se consideramos as implicações morfofisiológicas envolvidas, esses efeitos podem 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

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Amostras analisadas por cultura e resultados insatisfatórios, 2011-2012. 2012.** Disponível em: <<https://www.icict.fiocruz.br/sites/www.icict.fiocruz.br/files/PARA+2011-2012.pdf>> Acesso em: 28 fev. 2016.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Nota técnica Nº 23/2018/SEI/CREAV /GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA.** Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117833/Nota+t%C3%A9cnica+23+de+2018+-+Glifosato/faac89d6-d8b6-4d8c-8460-90889819aaf7>>. Acesso em 3 de mar. 2019.

AIASSA, D. E., MAÑAS, F. J., GENTILE, N. E., BOSCH, B., SALINERO, M. C., GORLA, N. B. Evaluation of genetic damage in pesticides applicators from the province of Córdoba, Argentina. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 20, p. 20981-20988, 2019.

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

ALROY, J. Current extinction rates of reptiles and amphibians. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 42, p. 13003-13008, 2015.

ALTING, R. Discussions of the origin and evolution of the oral apparatus of anuran tadpoles. **Acta Herpetologica**, 1.2: 95-105, 2006.

ALTIG, R. A primer for the morphology of anuran tadpoles. **Herpetological conservation and biology**, 2.1: 71-74, 2007, a.

ALTIG, R. Comments on the descriptions and evaluations of tadpole mouthpart anomalies. **Herpetological Conservation and Biology**, 2.1: 1-4., 2007, b.

ALTWEGG, R., REYER, HU. Patterns of natural selection on size at metamorphosis in water frogs. **Evolution**, v. 57, n. 4, p. 872-882, 2003.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SAÚDE COLETIVA (ABRASCO) 2019. **Agrotóxicos: STF adia julgamento da ADI 5553.** Disponível em: <<https://www.abrasco.org.br/site/outras-noticias/agrotoxicos-stf-adia-julgamento-da-adi-5553/45335/>>. Acesso em 21 fev 2020.

AVILA-VAZQUEZ, M., DIFILIPPO, F. S., MAC LEAN, B., MATURANO, E., ETCHEGOYEN, A. Environmental exposure to glyphosate and reproductive health impacts in agricultural population of Argentina. **Journal of Environmental Protection**, v. 9, n. 03, p. 241, 2018.

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.

BENACHOUR, N. SIPAHUTAR, H., MOSLEMI, S., GASNIER, C., TRAVERT, C., SÉRALINI, G. E. Time-and dose-dependent effects of roundup on human embryonic and placental cells. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 53, n. 1, p. 126-133, 2007.

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, 2009.

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.

BENITEZ LEITE, S.; MACCHIL, M. L.; ACOSTA, M. Malformaciones congénitas asociadas a agrotóxicos. **Revista de la Sociedad Boliviana de Pediatría**, v. 48, n. 3, p. 204-217, 2009.

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.

BOONE, M. D.; Hammond, S. A.; Veldhoen, N.; Youngquist, M.; Helbing, C. C. Specific time of exposure during tadpole development influences biological effects of the insecticide carbaryl in green frogs (*Lithobates clamitans*). **Aquatic toxicology**, v. 130, p. 139-148, 2013.

BRAUSCH, J. M.; BEALL, B; SMITH, P. N. Acute and sub-lethal toxicity of three POEA surfactant formulations to *Daphnia magna*. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 78, n. 6, p. 510-514, 2007.

BRÜHL, C. A.; P., S.; W., B. Amphibians at risk? Susceptibility of terrestrial amphibian life stages to pesticides. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, n. 11, p. 2465-2472, 2011.

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**, 91.2: 135-142, 2009.

BURRACO, P; GOMEZ-MESTRE, I. Physiological stress responses in amphibian larvae to multiple stressors reveal marked anthropogenic effects even below lethal levels. **Physiological and Biochemical Zoology**, 89.6: 462-472, 2016.

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.; MA 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.

CHAPIN, 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. 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.

CHRISTOPHER, R., KINNEY, O., FIORI, A., CONGDON, J. Oral deformities in tadpoles (*Rana catesbeiana*) associated with coal ash deposition: effects on grazing ability and growth. **Freshwater Biology**, 36(3), 723-730, 1996.

COLLYER, M. L.; ADAMS, D. C. RRPP: An R package for fitting linear models to high-dimensional data using residual randomization. **Methods in Ecology and Evolution**, v.9 .n 7: p.1772-1779, 2018.

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.

COOKE, A. S. Tadpoles as indicators of harmful levels of pollution in the field. **Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological**, v. 25, n. 2, p. 123-133, 1981.

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.

DALLEGRAVE, E., MANTESE, F. D., OLIVEIRA, R. T., ANDRADE, A. J., DALSENTER, P. R., LANGELOH. Pre-and postnatal toxicity of the commercial glyphosate formulation in Wistar rats. **Archives of toxicology**, v. 81, n. 9, p. 665-673, 2007.

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

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

DE SOUZA, J. S., KIZYS, M. M. L., DA CONCEIÇÃO, R. R., GLEBOCKI, G., ROMANO, R. M., ORTIGA-CARVALHO, T. M.; DA SILVA I. D. C.S. GIANNOCCO G.; DA SILVA, G. M. R, D. ROMANO, M. A; IZABEL M. CHIAMOLERA, M. I. Perinatal exposure to glyphosate-based herbicide alters the thyrotrophic axis and causes thyroid hormone homeostasis imbalance in male rats. **Toxicology**, v. 377, p. 25-37, 2017.

DENVER, R. J. Hormonal correlates of environmentally induced metamorphosis in the Western spadefoot toad, *Scaphiopus hammondi*. **General and comparative endocrinology**, v. 110, n. 3, p. 326-336, 1998.

DEVI, L. M.; THABAH, C. M.; HOOROO, R. N. K.; DEY, S. Morphological and microstructural changes of the oral apparatus in two anuran tadpoles, in regard to pH. **Micron**, 82, 41-51, 2016.

DORNELLES, M. F.; OLIVEIRA, G. T. Toxicity of atrazine, glyphosate, and quinclorac in bullfrog tadpoles exposed to concentrations below legal limits. **Environmental Science and Pollution Research**, 23.2: 1610-1620, 2016.

DUESTER, G. Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis. **Cell**, v. 134, n. 6, p. 921-931, 2008.

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: An International Journal*, 23(4), 815-822, 2004

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. **EFSA Journal**, v. 13 n.11, p. 107, 2015.

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, 2007.

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.

GASKIN, R. E., HOLLOWAY, P. J. Some physicochemical factors influencing foliar uptake enhancement of glyphosatemono (isopropylammonium) by polyoxyethylene surfactants. **Pesticide Science**, 34(3), 195-206.1992.

GHALAMBOR, C. K., MCKAY, J. K., CARROLL, S. P., & REZNICK, D. N. Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments. **Functional ecology**, v. 21, n. 3, p. 394-407, 2007.

GLENNEMEIER, K. A., DENVER, R. J. Role for corticoids in mediating the response of *Rana pipiens* tadpoles to intraspecific competition. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology**, v. 292, n. 1, p. 32-40, 2002.

GONZÁLEZ-DONCEL, M.; Fernández-Torija, C.; Hinton, D. E.; Tarazona, J. V. Stage-specific toxicity of cypermethrin to medaka (*Oryzias latipes*) eggs and embryos using a refined methodology for an in vitro fertilization bioassay. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 48, n. 1, p. 87-98, 2004.

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.

GOSNER, K. L., BLACK, I. H. The effects of acidity on the development and hatching of New Jersey frogs. *Ecology*, 38(2), 256-262, 1957.

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., LOOMIS, D., GROSSE, Y., EL GHISSASSI, F., BENBRAHIM-TALLAA, L., GUHA, N., MATTOCK, H, STRAIF, K. 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.

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

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.

HEDBERG, D; WALLIN, M. Effects of Roundup and glyphosate formulations on intracellular transport, microtubules and actin filaments in *Xenopus laevis* melanophores. **Toxicology in Vitro**, v. 24, n. 3, p. 795-802, 2010.

HOPKINS, W. A.; CONGDON, J.; RAY, J. K. Incidence and impact of axial malformations in larval bullfrogs (*Rana catesbeiana*) developing in sites polluted by a coal-burning power plant. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 19, n. 4, p. 862-868, 2000.

HOKANSON, R. FUDGE, R., CHOWDHARY, R., BUSBEE, D. Alteration of estrogen-regulated gene expression in human cells induced by the agricultural and horticultural herbicide glyphosate. **Human & experimental toxicology**, v. 26, n. 9, p. 747-752, 2007.

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.

HOPKINS, W. A., CONGDON, J., & RAY, J. K. Incidence and impact of axial malformations in larval bullfrogs (*Rana catesbeiana*) developing in sites polluted by a coal-burning power plant. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, 19(4), 862-868, 2000.

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.

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.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Censo agropecuário. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/censo-agropecuario/censo-agropecuario-2017>> Acesso em: 21 fev 2020.

INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE AND NATURAL RESOURCES (IUCN). The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2020-1. <<https://www.iucnredlist.org>> Acesso em: 13 abr 2020.

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.

KATZENBERGER, M., HAMMOND, J., DUARTE, H., TEJEDO, M., CALABUIG, C., & RELYEA, R. A. Swimming with predators and pesticides: how environmental stressors affect the thermal physiology of tadpoles. **PloS one**, v. 9, n. 5, p. e98265, 2014.

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., PELTZER, P. M., ATTADEMO, A. M., MARTINUZZI, C. S., SIMONIELLO, M. F., COLUSSI, C. L., SIMONIELLO, M. F.; COLUSSI, C. L.; BOCCIONI, A. P. C.; SIGRIST, M. First evaluation of novel potential synergistic effects of glyphosate and arsenic mixture on *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) tadpoles. **Heliyon**, v. 5, n. 10, p. e02601, 2019.

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.

LEVIS, N. A., SCHOOLER, M. L., JOHNSON, J. R., & COLLYER, M. L. Non-adaptive phenotypic plasticity: the effects of terrestrial and aquatic herbicides on larval salamander morphology and swim speed. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 118, n. 3, p. 569-581, 2016

LEWINSOHN, 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.

MANN, R. M., HYNNE, 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.

MCCOLLUM, S. A. VAN BUSKIRK, J. Costs and benefits of a predator-induced polyphenism in the gray treefrog *Hyla chrysoscelis*. **Evolution**, v. 50, n. 2, p. 583-593, 1996.

MCDIARMID, R. W.; ALTIG, R (Ed.). **Tadpoles: the biology of anuran larvae**. University of Chicago Press, 1999.

MESNAGE, R., DEFARGE, N., SPIROUX DE VENDÔMOIS, J., SÉRALINI, G. E. Major pesticides are more toxic to human cells than their declared active principles. **BioMed research international**, 2014.

MESNAGE, R., DEFARGE, N., DE VENDÔMOIS, 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.

MESNAGE, R., BENBROOK, C., ANTONIOU, M. N. Insight into the confusion over surfactant co-formulants in glyphosate-based herbicides. **Food and Chemical Toxicology**, 2019.

MIJARES, A.; RODRIGUES, M. T.; BALDO, D. *Physalaemus cuvieri*. **The IUCN Red List of Threatened Species 2010**. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org/species/57250/11609155> 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.

MIYATA, K.; OSE, K. Thyroid hormone-disrupting effects and the amphibian metamorphosis assay. **Journal of toxicologic pathology**, v. 25, n. 1, p. 1-9, 2012.

MONTEIRO, L. R.; REIS, S. F. **Princípios de morfometria geométrica**. Ribeirão Preto, Brasil: **Holos** editora, 1999.

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

NETTO, G. F. em Laboratório de demografia e estudos populacionais: **Veneno à nossa mesa: Brasil consome 14 agrotóxicos proibidos na União Europeia e Estados Unidos**. <<https://www.ufjf.br/ladem/2014/02/28/veneno-a-nossa-mesa-brasil-consome-14-agrotoxicos-proibidos-na-uniao-europeia-e-estados-unidos/>>. Acesso em 21 fev 2020.

NEWMAN, R. A. Adaptive plasticity in development of *Scaphiopus couchii* tadpoles in desert ponds. **Evolution**, v. 42, n. 4, p. 774-783, 1988.

OECD, FAO. **PERSPECTIVAS AGRÍCOLAS NO BRASIL: DESAFIOS DA AGRICULTURA BRASILEIRA 2015-20124**. 2015. disponível em: <<HTTPS://WWW.FAO.ORG.BR/DOWNLOAD/PA20142015CB.PDF>>. Acesso em: 28 de OUT 2016.

PAGANELLI, A., GNAZZO, V., ACOSTA, H., LÓPEZ, S. L., CARRASCO, A. E. Glyphosate-based herbicides produce teratogenic effects on vertebrates by impairing retinoic acid signaling. **Chemical research in toxicology**, v. 23, n. 10, p. 1586-1595, 2010.

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.

RELYEA, R. A. Morphological and behavioral plasticity of larval anurans in response to different predators. **Ecology**, v. 82, n. 2, p. 523-540, 2001.

RELYEA, R. A. Fine -tuned phenotypes: tadpole plasticity under 16 combinations of predators and competitors. **Ecology**, v. 85, n. 1, p. 172-179, 2004, a.

RELYEA, R. A. Growth and survival of five amphibian species exposed to combinations of pesticides. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, n. 7, p. 1737-1742, 2004, b.

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, 2005, a.

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, 2005, b.

RELYEA, R. A. The lethal impact of Roundup on aquatic and terrestrial amphibians. **Ecological applications**, v. 15, n. 4, p. 1118-1124, 2005,c.

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. Amphibians are not ready for Roundup®. In: **Wildlife ecotoxicology**. Springer, New York, NY. p. 267-300, 2011.

RELYEA, R. A. New effects of Roundup on amphibians: Predators reduce herbicide mortality; herbicides induce antipredator morphology. **Ecological Applications**, v. 22, n. 2, p. 634-647, 2012.

RELYEA, R. A., AULD, J. R. Having the guts to compete: how intestinal plasticity explains costs of inducible defences. **Ecology Letters**, v. 7, n. 9, p. 869-875, 2004.

RELYEA, R. A.; AULD, J. R. Predator-and competitor-induced plasticity: how changes in foraging morphology affect phenotypic tradeoffs. **Ecology**, v. 86, n. 7, p. 1723-1729, 2005.

RICHARD, S., MOSLEMI, S., SIPAHUTAR, H., BENACHOUR, N., SERALINI, G. E. Differential effects of glyphosate and roundup on human placental cells and aromatase. **Environmental health perspectives**, 113(6), 716-720, 2005.

ROHLF, F. J. TPSDig v2. 16. **Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook, New York**, 2010.

ROWE, C. L.; KINNEY, O. M.; CONGDON, J. D. Oral deformities in tadpoles of the bullfrog (*Rana catesbeiana*) caused by conditions in a polluted habitat. **Copeia**, v. 1998, n. 1, p. 244-246, 1998.

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

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.

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.

SEMLITSCH, R. D.; SCOTT, D. E.; PECHMANN, J. H. Time and size at metamorphosis related to adult fitness in *Ambystoma talpoideum*. **Ecology**, v. 69, n. 1, p. 184-192, 1988.

SMITH, D. C. Adult recruitment in chorus frogs: effects of size and date at metamorphosis. **Ecology**, v. 68, n. 2, p. 344-350, 1987.

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

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.

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. **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.

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

TILMAN, D., FARGIONE, J., WOLFF, B., D'ANTONIO, C., DOBSON, A., HOWARTH, R., DAVID S., SWACKHAMER, D. Forecasting agriculturally driven global environmental change. *science*, 292(5515), 281-284, 2001.

TOLLEDO, J., SILVA, E. T., NUNES-DE-ALMEIDA, C. H., & TOLEDO, L. F. L. Anomalous tadpoles in a Brazilian oceanic archipelago: implications of oral anomalies on foraging behaviour, food intake and metamorphosis Herpetological Society. *The Herpetological Journal*, 24(4), 237-243, 2014.

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.

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.

União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN). **Red list**. 2019 <<https://www.iucnredlist.org/search/stats?permalink=41e5f948-4b23-4c3d-9bcf-71bb90ce90b6>> acesso em 21 de fev 20202.

VAN BUSKIRK, J. Getting in shape: adaptation and phylogenetic inertia in morphology of Australian anuran larvae. **Journal of evolutionary biology**, v. 22, n. 6, p. 1326-1337, 2009.

VAN BUSKIRK, J.; MCCOLLUM, S. A., WERNER, E. E. Natural selection for environmentally induced phenotypes in tadpoles. **Evolution**, v. 51, n. 6, p. 1983-1992, 1997.

WALSH, L. P., MCCORMICK, C., MARTIN, C., & STOCCO, D. M. Roundup inhibits steroidogenesis by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. **Environmental health perspectives**, v. 108, n. 8, p. 769-776, 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.

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.

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.

YUAN, J.; Zhang, X.; Yu, L.; Sun, Z.; Zhu, P.; Wang, X.; Shi, H. Stage-specific malformations and phenotypic changes induced in embryos of amphibian (*Xenopus tropicalis*) by triphenyltin. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 7, p. 1960-1966, 2011.

ZELDITCH, M. L.; SWIDERSKI, D. L.; SHEETS, H. D. Geometric morphometrics for biologists: a primer. Academic Press, 2012.