

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

MARIANA FEKETE MOUTINHO

**Ecotoxicidade comparativa dos herbicidas da cana-de-açúcar para
larvas de anfíbios**

Versão corrigida

A versão original se encontra disponível na Biblioteca do Instituto de Biociências

Luis Cesar Schiesari

Mariana Fekete Moutinho

São Paulo

Setembro 2013

MARIANA FEKETE MOUTINHO

**Ecotoxicidade comparativa dos herbicidas da cana-de-açúcar para
larvas de anfíbios**

**Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade
de São Paulo para obtenção de título de Mestre.**

Área de concentração: Ecologia de Ambientes Aquáticos e Terrestres.

Orientador: Prof. Dr. Luis Cesar Schiesari

São Paulo

Setembro 2013

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA
FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.**

Ficha catalográfica

Fekete, Mariana Moutinho

Ecotoxicidade comparativa dos herbicidas da cana-de-açúcar para larvas
de anfíbios / Mariana Fekete Moutinho; orientador Prof. Dr. Luis Cesar Schiesari

-- São Paulo, 2013

120p.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ecologia. Área de
concentração: Ecologia de Ambientes Aquáticos e Terrestres) – Instituto de
Biotecnologia da Universidade de São Paulo.

1. Ecotoxicologia. 2. Herbicidas 3. Anfíbios 4. Cana-de-açúcar

XXX 000.0000

FOLHA DE APROVAÇÃO

Mariana Fekete Moutinho

Ecotoxicidade comparativa dos herbicidas da cana-de-açúcar para larvas de anfíbios.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Mestre.

Área de concentração: Ecologia de Ambientes Aquáticos e Terrestres.

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof(a) Dr(a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a) Dr(a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À minha família, pelos laços espirituais que nos fortalecem nesta caminhada.

Em especial ao meu sobrinho Miguel Fekete Montello que está ainda por descobrir as riquezas do mundo e que saiba admirá-lo e respeitá-lo como sua segunda morada.

*“Somente o trabalho e o sacrifício,
a dificuldade e o obstáculo,
como elementos de progresso e auto-superação,
podem dar ao homem
a verdadeira notícia de sua grandeza”*

Emmanuel

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Luis Cesar Schiesari pela oportunidade na realização do projeto e por confiar em meu trabalho. Por todo o apoio e conselhos durante esses anos de trabalho que me trouxeram muito enriquecimento profissional e pessoal.

Aos Profs. Carlos Navas e Evaldo Gaeta Espíndola por terem participado do meu comitê com enriquecedoras discussões, e por estarem sempre disponíveis quando precisei de ajuda.

Aos meus pais Eva Catalina Fekete e Henrique Moutinho Filho, por toda a infinita dedicação e amor que sempre me proporcionaram e que me fizeram chegar até aqui.

Ao meu companheiro Luciano Mizael Dias, que me ajudou em todos os momentos com sua paciência única, dedicação e carinho.

Serei sempre grata por toda minha família que esteve ao meu lado me apoiando e incentivando nos momentos mais difíceis. Ao Victor e a Mari pela amizade única e por me proporcionarem ótimos momentos em que pude relaxar um pouco. Às minhas amigas irmãs Carolina, Fabíola e Juliana por todos os conselhos, ajuda no laboratório (Bila) e por estarem ao meu lado mesmo distantes.

A todos meus companheiros de laboratório e de vida Bianca, Daniel, Toninho e Paulo. Foram ótimos momentos e com a companhia de vocês o trabalho ficava muito mais alegre.

Ao Beto e ao Silas (em memória) por toda ajuda e companhia no trabalho de campo.

À equipe do laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Santa Cecília, Prof. Aldo, Prof. Augusto Cesar, Fabio Pusceddu e Fernando Cortez, por terem me dado oportunidade de descobrir o quanto eu gosto desta área e ainda hoje estarem sempre dispostos a me ajudar e esclarecer minhas dúvidas.

Agradeço a todos os docentes e funcionários da Escola de Artes, Ciências e Humanidades (EACH – USP Leste), principalmente aos técnicos Ana, Kellinton, Ervin e Rodrigo, pela amizade, pelas incansáveis discussões sobre diluição e o mundo da química, pelos trabalhos braçais, pelas caronas de almoço, enfim por terem tornado meu trabalho em laboratório muito mais leve e alegre.

Um agradecimento ao Prof. Dr. Eduardo Almeida e as meninas Andreia Arantes e Ana Letícia Sanches, da Universidade Estadual Paulista campus São José do Rio Preto, por me cederem um espaço em seu laboratório, pelos ensinamentos, por toda a ajuda e participação na pesquisa; ao Prof. Fernando Gomes e a Clara Aquino, do setor de Fisiologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, pela contribuição no trabalho e todas as discussões e ensinamentos de imunologia. Graças a estas duas equipes meu trabalho ganhou outras proporções.

À Profa. Maria Olímpia de Oliveira Rezende e equipe do laboratório de Química Ambiental do Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo, pelas análises realizadas dos meus experimentos.

A todos os funcionários do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB-USP), em especial a Vera Lucia Barbosa Lima, por toda ajuda nas horas mais necessárias; aos funcionários da Estação Biológica de Boracéia (EBB) e do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP), que viabilizaram a minha pesquisa de campo.

Finalmente, agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de minha bolsa (Processo 2011/05280-6) e pelos custeios relacionados ao Projeto Jovem Pesquisador do meu orientador (Projeto 2008/57939-9), bem como à Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo pela permissão de uso dos laboratórios de pesquisa e pelo apoio logístico.

A Deus por ter colocado todas estas pessoas em meu caminho! Este trabalho só foi possível com a presença de vocês.

ÍNDICE

Resumo	11
Abstract	13
1. Introdução	14
2. Materiais e Métodos	23
2.1 Generalidade	23
2.1.1 O sistema-modelo	23
2.1.2 Os pesticidas-modelo	31
2.1.3 Manutenção das desovas e larvas até o início dos experimentos	37
2.2 Delineamento experimental	38
2.2.1 Generalidades	38
2.2.2 Experimento de exposição aguda	40
2.2.3 Experimento de exposição crônica	43
2.3 Forma de análise dos resultados	51
3. Resultados	55
3.1 Experimento de exposição aguda	55
3.2. Experimento de exposição crônica	64
3.2.1 Experimento com larvas de <i>Hypsiboas faber</i>	64
3.2.2 Experimento com larvas de <i>Hypsiboas pardalis</i>	72
4. Discussão	78
4.1 Experimento de exposição aguda	78

4.2 Experimento de exposição crônica	85
5. Conclusão	102
6. Referências Bibliográficas	106
Anexo 1	119

Resumo

Nas últimas três décadas, o crescimento na demanda por biocombustíveis promoveu a expansão das culturas de cana-de-açúcar no Brasil e, conseqüentemente, o aumento no consumo de pesticidas, que está associado à riscos para a saúde humana, integridade ambiental e a biodiversidade. Dentre as diversas espécies de vertebrados ameaçadas de risco, anfíbios parecem ser mais vulneráveis à contaminação por uma série de características morfológicas, fisiológicas e de história de vida. No entanto, poucos são os estudos que avaliam os efeitos de poluentes sobre anfíbios, principalmente na região neotropical. Esta dissertação propôs testar experimentalmente as hipóteses de que (1) os principais herbicidas utilizados na cultura de cana-de-açúcar no Brasil, embora desenvolvidos especificamente para o controle de ervas daninhas, são capazes de causar mortalidade em larvas de anfíbios, (2) esta mortalidade também se manifesta quando larvas de anfíbios são expostas a concentrações recomendadas para uso destes herbicidas, (3) além de efeitos letais, a exposição de larvas de anfíbios a concentrações dos principais herbicidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar no Brasil causa efeitos subletais em termos de crescimento, desenvolvimento, comportamento, imunocompetência e atividade enzimática dos indivíduos. Para testar essas hipóteses, foram utilizadas como modelo biológico larvas de *Physalaemus cuvieri*, *Hypsiboas faber* e *Hypsiboas pardalis*. Estas espécies foram expostas aos herbicidas glifosato, ametrina, 2,4-D, metribuzim e acetocloro, na forma de seus ingredientes ativos. Em exposição aguda, todos os compostos manipulados levaram à mortalidade de larvas de anfíbios, embora alguns deles apenas em concentrações bastante elevadas. Um prolongamento da exposição induziu mortalidade em concentrações muito inferiores àquelas necessárias para causar efeito em exposição aguda. Glifosato, 2,4-D e metribuzim retardaram significativamente o desenvolvimento de *H. faber*, enquanto que ametrina, testada apenas para *H. pardalis*, levou a uma diminuição no ganho de massa e no estágio de desenvolvimento final atingido. A atividade de AChE foi inibida pelo metribuzim em *H. faber* e estimulada pelo glifosato, ametrina e 2,4-D em *H. pardalis*; por sua vez, a atividade de GST, inalterada pela exposição a herbicidas em *H. faber*, foi estimulada pela ametrina e pelo acetocloro em *H. pardalis*. Nenhum composto induziu alterações significativas no perfil leucocitário. Herbicidas também tiveram efeitos comportamentais: a taxa de atividade de *H. pardalis* foi significativamente reduzida sob exposição à ametrina e ao acetocloro. Esta dissertação demonstra,

portanto, que a exposição a doses recomendadas de aplicação dos principais herbicidas utilizados em cultura de cana-de-açúcar no Brasil, pode causar efeitos letais e subletais em larvas de espécies nativas de anfíbios. Estudos futuros devem buscar realismo adicional rumo a uma análise de risco da contaminação ambiental por herbicidas por meio de experimentos manipulando não apenas ingredientes ativos, mas também formulações comerciais, bem como interações dos contaminantes entre si e com outros estressores ambientais, calibrados por concentrações medidas em campo.

Abstract

In the last three decades, the increasing demand for biofuels in Brazil favored the expansion of sugarcane and, as a consequence, an increase in the consumption of pesticides, herewith the risks associated with human health, environmental integrity and biodiversity. Among vertebrates, a series of morphological, physiological and life history traits are suggested to make amphibians particularly vulnerable to contamination. However, few are the studies testing the effects of pesticides on amphibians, especially in neotropics. This study proposed to test the hypotheses that (1) the main herbicides applied to the sugar cane crop in Brazil, although designed for the control of weeds, will cause lethal effects on the amphibian larvae, (2) this mortality also happens in allowed concentrations for the use in sugar cane crops, (3) in addition to any lethal effects, exposure of amphibian larvae to environmentally relevant herbicide concentrations causes sublethal effects in terms of growth, development, behavior, immunocompetence, and enzymatic activity. To test these hypotheses was used as model system the larvae of *Physalaemus cuvieri*, *Hypsiboas faber* and *Hypsiboas pardalis*. These three species were exposed to glyphosate, ametryn, 2,4-D, metribuzin and acetochlor, presented as active ingredients. In the experiments of acute exposure all herbicides caused mortality in amphibian larvae, albeit some of them only in very high doses. Prolonged exposure induced mortality at much lower concentrations than those manipulated in the experiments of acute exposure. Glyphosate, 2,4-D and metribuzin significantly slowed development in *H. faber*, whereas ametryn slowed development and growth in *H. pardalis*. Herbicides also had behavioral effects: activity rates of *H. pardalis* were significantly reduced under exposure to ametryn and acetochlor. AChE activity was inhibited by metribuzin in *H. faber* but stimulated by glyphosate, ametryn and 2,4-D in *H. pardalis*; in turn, GST activity, which was not influenced by exposure to herbicides in *H. faber*, was stimulated by ametryn and acetochlor in *H. pardalis*. No herbicide induced significant changes in leukocyte profiles. In conclusion, this thesis suggests that exposure to environmentally relevant doses of the main herbicides employed in sugarcane fields in Brazil can cause lethal and sublethal effects on native species of larval amphibians. Future studies should seek additional realism towards a risk analysis of the environmental contamination by herbicides through experiments manipulating not only commercial formulations but also active ingredients, as well as interactions among contaminants and other environmental stressors, calibrated by field-measured conditions.

1. Introdução

A partir da Revolução Industrial a exploração de combustíveis fósseis na geração de energia alterou de forma pronunciada o modo de vida da população humana e a transformação dos seus recursos. O caráter não-renovável e a distribuição geográfica restrita de jazidas impuseram repetidas restrições no fornecimento a estes combustíveis fósseis. No ano de 1973 países do mundo todo enfrentaram a primeira grande crise do petróleo em decorrência da instabilidade política do Oriente Médio. As elevações astronômicas dos preços trouxeram grande preocupação econômica, particularmente em países dependentes de importações do produto como o Brasil (PETROBRÁS, 2007). Frente a este cenário de crise econômica, em 1974 o governo brasileiro autorizou a iniciativa privada a explorar petróleo no país (PETROBRÁS, 2013), e em 1975 criou o Programa Nacional do Álcool - Proálcool, com o objetivo de substituir o combustível de gasolina pelo álcool, bem como a busca por independência econômica e alternativa de fonte energética (EMBRAPA, 2006). A demanda por energia no mundo continua crescendo e tenderá a aumentar 1,7% ao ano até 2030 (EMBRAPA, 2006a). É esperado que o consumo de petróleo continue em crescimento constante nos próximos anos, porém, projeções indicam que as reservas brasileiras de petróleo durarão em torno de mais 10 anos (EMBRAPA, 2006), tornando ainda mais importante a utilização de uma fonte energética alternativa.

O uso do álcool como fonte alternativa de energia para suprir as necessidades do país e superar a dependência energética do petróleo, está ainda aliado com questões ambientais como a tentativa de redução nas emissões de CO₂ e, por consequência, redução do aquecimento global (EMBRAPA, 2006). Neste cenário, os biocombustíveis apresentam-se como uma ótima alternativa de energia, pois é uma fonte limpa e renovável uma vez que é proveniente de matéria biológica (biomassa) e seus resíduos, por sua vez obtida a partir do processo da fotossíntese (PETROBRÁS, 2007; MARTINELLI & FILOSO, 2008). A biomassa energética pode ser obtida da soja, da cana-de-açúcar, do milho, da canola, da mamona, da semente de girassol ou ainda da madeira e celulose. Os biocombustíveis não contribuem para o acúmulo de gases na atmosfera, pois os gases gerados em sua queima são reabsorvidos pelas plantas na safra seguinte, havendo um equilíbrio entre a emissão e a absorção dos gases. Eles apresentam também em sua composição quantidade significativa de oxigênio, que quando em conjunto

ao combustível fóssil ajuda a reduzir as emissões de monóxido de carbono (PETROBRÁS, 2007). Além destas vantagens ambientais, a produção de biocombustíveis apresenta vantagens sociais, políticas e econômicas, pois torna o país independente em relação a necessidade de importar energia.

Neste sentido, é importante lembrar que o Brasil apresenta vários fatores que o destacam na produção agrícola e que permitem o avanço na intensificação e expansão da agricultura. Além da competência técnica adquirida constituindo uma agroindústria sólida, o Brasil está posicionado geograficamente na segunda região com maior incidência solar, apresenta uma rica diversidade de solo e climas favoráveis, água doce em abundância e um extenso território cultivável (MARTINELLI & FILOSO, 2008).

Dentre a cultura de biocombustíveis, no Brasil destaca-se o etanol derivado da cana-de-açúcar. O etanol proveniente da cana-de-açúcar, comparado a todas as outras fontes comerciais de biocombustíveis, apresenta baixo custo de produção, pois é produzido diretamente da fermentação da cana-de-açúcar, ao contrário de outras biomassas como a beterraba e o milho, onde o amido tem que ser transformado em açúcar antes da fermentação, aumentando assim as etapas e o custo da produção (OLIVEIRA *et al.*, 2005; LEITE & LEAL, 2007). Seu rendimento também é mais alto do que outras culturas, pois em um hectare plantado com cana-de-açúcar é produzido mais de seis mil litros de etanol por ano (LEITE & LEAL, 2007). Além disso, o etanol absorve mais carbono em seu crescimento que emite em sua combustão, apresentando maior eficiência energética – isto é, uma maior razão da energia obtida na combustão do etanol sobre energia gasta na produção da cana-de-açúcar (OLIVEIRA *et al.*, 2005; EMBRAPA, 2006).

Dados divulgados pela FAO (Food and Agriculture organization of the United Nations) (2012), mostram que a produção de etanol no Brasil cresceu 140% entre o período de 2000 e 2012 e apenas neste último ano de 2012, mais de 50% do cultivo de cana-de-açúcar foi destinado à produção de etanol. Mundialmente, o Brasil está à frente na produção de cana-de-açúcar, seguido da Índia, China e Tailândia (FAOSTAT, 2013). A cana-de-açúcar teve destaque em 2011 com a maior produção dentre as 10 culturas mais importantes do país, produzindo 734.006.000 toneladas (FAOSTAT, 2013).

Desde 1970 a área ocupada pela cana-de-açúcar aumentou de 1,4 milhões para sete milhões de hectares (MARTINELLI & FILOSO, 2008), sendo que apenas entre 2005 e 2006 a produção de cana-de-açúcar no Brasil cresceu 12% (FAO, 2008). A maior produção no Brasil está concentrada na região Centro-Sul, mais especificamente no estado de São Paulo que representa mais de 60% das terras destinadas ao cultivo de cana-de-açúcar (CANASAT, 2012). O governo brasileiro pretende expandir e distribuir para outros estados o cultivo de cana-de-açúcar gerando assim mais economia para o resto do país. Neste sentido foi criado o Zoneamento Agroecológico da Cana-de-açúcar, que visa avaliar e identificar o potencial das terras para expansão da produção de cana-de-açúcar para produção de etanol e açúcar em conjunto a ações sustentáveis e de preservação da biodiversidade (MAPA, 2009a).

O plantio desta monocultura é de suma importância para a economia do país, pois além do seu principal subproduto, que é o etanol, há outros subprodutos e resíduos que podem ser aproveitados e utilizados. Na alimentação humana e animal, são utilizados o açúcar, melaço, bagaço e levedura seca, e na fertilização de solos, como a torta de filtro e a vinhaça (AGEITEC, 2011).

A cultura de cana-de-açúcar é caracterizada como semi-perene, de sistema radicular fasciculado podendo durar de 5 a 6 anos e depois é feita a reforma do canavial ou o replantio da cana. O plantio ocorre principalmente entre os meses de janeiro e março, conhecido por sistema de ano e meio (18 meses), onde nos três primeiros meses ocorre o desenvolvimento inicial da planta, seguido de uma redução do crescimento devido à chegada do inverno e da seca com duração de cinco meses. Nos sete meses seguintes a planta entra em período vegetativo e depois deste período entra em maturação até o final do ciclo (AGEITEC, 2011).

Para que não haja redução na produtividade do plantio, o uso de fertilizantes e pesticidas se faz necessário como as ferramentas mais importantes para o manejo do solo e controle de pragas (JONES *et al.*, 2009). Em consequência da expansão e intensificação da produção de cana-de-açúcar aumentou-se o consumo destes agrotóxicos (MARTINELLI & FILOSO, 2008; SCHIESARI & GRILLITSCH, 2010), que entre os anos de 2006 e 2011 tiveram sua importação triplicada no Brasil (FAOSTAT, 2013).

A cana-de-açúcar é uma planta bastante suscetível a pragas, doenças, nematoides e plantas daninhas, sendo estas últimas a maior preocupação no cultivo desta cultura (AGEITEC, 2011). Desta forma, dentre as classes de agrotóxicos existentes, os herbicidas são os mais utilizados em volume e frequência em plantações de cana-de-açúcar, seguido de inseticidas e fungicidas (ARMAS *et al.*, 2005). No ano de 2012, a cana-de-açúcar foi a segunda cultura que mais utilizou defensivos agrícolas em volume, estando somente atrás da cultura de soja (SINDAG, 2013). Geralmente os agrotóxicos são aplicados juntamente à preparação do solo que antecede o plantio, chamados de pré-emergência, ou aplicados após o surgimento das plantas daninhas, chamados de pós-emergência, matando ou retardando o crescimento destas plantas (AGEITEC, 2011).

A escolha do melhor pesticida a ser utilizado e a época de aplicação é fundamental para que não haja uso indevido e desnecessário destes compostos, uma vez que são por definição, biologicamente ativos com uma série de consequências diretas e indiretas para a integridade ambiental e a saúde humana (SCHIESARI & GRILLITSCH, 2010). Das 225 formulações de pesticidas registradas para uso em plantações de cana-de-açúcar, 89 são consideradas extremamente tóxicas ou altamente tóxicas à saúde humana e outras 117 são altamente perigosas ou muito perigosas ao ambiente (SCHIESARI & GRILLITSCH, 2010). Análises dos ingredientes ativos contidos nos pesticidas utilizados na cana-de-açúcar mostram que muitos compostos são neurotóxicos, carcinogênicos, apresentam efeito tóxico sobre o desenvolvimento e reprodução e causam transtornos endócrinos, além de aumentar a suscetibilidade a doenças e morte (SCHIESARI & GRILLITSCH, 2010; KEGLEY *et al.*, 2010).

Os pesticidas apresentam notável diversidade de estruturas químicas, com consequente variação em seu comportamento toxicocinético, seja no que diz respeito à sua mobilidade, destino ambiental e persistência no ambiente. Alguns compostos se degradam mais rapidamente que outros e alguns ainda podem ser biotransformados podendo gerar produtos mais ou menos tóxicos que o composto original (SCHWARZENBACH *et al.*, 2006). O processo de degradação pode ser químico, em consequência das características físico-químicas do ambiente em que o composto está inserido; por processos biológicos através de microorganismos ou por fotodegradação (NIMMO & MCEWEN, 1994; FAO, 1996).

Após a aplicação, os pesticidas podem permanecer no substrato e em tecidos de organismos vivos ou ainda se volatilizar ou serem transportados pela água quando dissolvidos nesta e aderidos a partículas do solo em suspensão, com potencial de atingir lençóis freáticos e assim contaminar fontes de água potável (NIMMO & MCEWEN, 1994). A característica de alguns pesticidas serem voláteis ou solúveis em água confere a eles também uma ação a longas distâncias de onde foram aplicados, podendo causar danos a uma área intacta e remota (MACDONALD *et al.*, 2000; FAO, 1996; SCHIESARI *et al.*, 2007), sendo um dos meios pelos quais estes compostos alcançam os sistemas aquáticos (RELYEA & HOVERMAN, 2006; SCHWARZENBACH *et al.*, 2006; MARTINELLI & FILOSO, 2008), ameaçando a saúde humana e diversos organismos dependentes deste sistema (SCHWARZENBACH *et al.*, 2006; ANVISA, 2010).

As características descritas acima dos pesticidas tornam estes compostos capazes de causar efeitos diretos sobre os organismos. Dependendo da sensibilidade das espécies à exposição e/ou ao contato com os pesticidas, estes podem ocasionar uma alta mortalidade, resultando em uma redução na densidade das espécies. Além disso, quando não ocorre um efeito letal, as espécies ainda podem estar sujeitas a efeitos subletais, tais como alterações no crescimento dos indivíduos, insucesso na reprodução, supressão da resposta imunológica, alterações fisiológicas, morfológicas e comportamentais, resultando assim em mudanças nas características das espécies (FAO, 1996; RELYEA & HOVERMAN, 2006). Por sua vez, ambos os efeitos sobre as espécies expostas aos pesticidas irão refletir diretamente ou indiretamente na estrutura das comunidades e conseqüentemente no funcionamento de todo um ecossistema (RELYEA & HOVERMAN, 2006).

Para uma avaliação mais precisa dos efeitos diretos e indiretos dos pesticidas sobre as espécies, se faz necessário a realização de testes ecotoxicológicos, tanto em laboratório como em campo. Dentre os tipos de teste mais realizados, há o teste de exposição aguda que tem como função avaliar os efeitos mais severos e rápidos dos compostos sobre os indivíduos expostos. As variáveis de resposta mais utilizadas são a mortalidade para peixes e anfíbios e a imobilidade para invertebrados, prevendo assim como os pesticidas podem interferir na densidade das espécies (RELYEA & HOVERMAN, 2006; ZAGATTO & BERTOLETTI, 2008). Usualmente os testes de exposição aguda

realizados em laboratório apresentam duração de 48 ou 96h, seguindo protocolos padronizados e as características do ambiente e da solução em teste são estritamente controladas. Os organismos-teste entram em contato com cinco concentrações do pesticida diluído em água através das brânquias, por ingestão e pela superfície do corpo (NIMMO & MCEWEN, 1994).

Geralmente as concentrações manipuladas em testes de exposição aguda são mais altas do que as encontradas em ambiente natural, com exceção de um cenário onde há uma alta concentração do pesticida, em função de uma aplicação direta, em ambientes aquáticos com baixo volume de água. Considerando então o estudo do efeito dos pesticidas em concentrações mais realistas, os testes de exposição crônica tornam-se mais expressivos, pois permitem avaliar tanto os efeitos letais como principalmente os efeitos subletais dos compostos sobre as espécies e em período mais prolongado, que pode variar de 7 a 21 dias ou até meses (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2008).

Os efeitos subletais podem ser estudados em vários níveis de organização, desde o nível atômico, molecular, celular e bioquímico até o nível de organismo e comunidade (WEIS *et al.*, 2001). As respostas biológicas observadas nas moléculas, células, fluído corpóreo e tecidos antecedem as respostas observadas no indivíduo, o que as tornam de grande importância para um melhor estudo destas interações. Estas respostas biológicas são empregadas como biomarcadores de exposição que sinalizam o contato do organismo com algum agente agressor, podendo este ser químico, físico ou biológico, gerando assim estresse ao indivíduo (OOST *et al.*, 2003), que não necessariamente será suficiente para causar mortalidade. Neste contexto, se torna importante a realização de testes laboratoriais de exposição prolongada que tenham como objetivo a investigação de biomarcadores. Há uma variedade de testes que analisam as respostas biológicas como biomarcadores e dentre elas há algumas mais usuais quando se trata de avaliação por toxicidade de pesticidas como, por exemplo, teste para avaliação de estresse oxidativo, do sistema imunológico, do sistema endócrino e reprodutor, de neurotransmissores musculares, de genotoxicidade e da fisiologia e morfologia do organismo (OOST *et al.*, 2003).

Dentre os testes que avaliam o sistema imunológico do organismo, o teste de perfil leucocitário é um método rápido e sem muito custo que investiga mudanças quantitativas das células leucocitárias. A

maioria dos vertebrados apresenta cinco tipos de células leucocitárias: os linfócitos constituem a maior parte das células e são responsáveis pela produção de imunoglobulina e modulação da defesa imune recrutando outras células leucocitárias; os neutrófilos juntamente com os linfócitos representam 80% das células de defesa e por serem células fagocitárias primárias se proliferam na circulação sanguínea em resposta a infecções, inflamações e estresse; os eosinófilos são células de defesa que agem sobre processos inflamatórios; os monócitos são células fagocitárias de longa vida associadas a defesa contra infecções e bactérias; e os basófilos são células que apresentam função relacionada à inflamação auxiliando os neutrófilos e os eosinófilos (DAVIS *et al.*, 2008). Muitos pesticidas são imunossupressores (diminuição da defesa imunológica) e dependendo das proporções das células leucocitárias, pode-se confirmar se houve estresse, inflamação ou infecção no organismo (NIMMO & MCEWEN, 1994; DAVIS *et al.*, 2009).

Sabe-se que muitos compostos, principalmente os orgânicos como os organofosforados, são responsáveis por alterar o sistema nervoso nos organismos e por esta razão o teste que avalia as atividades enzimáticas de neurotransmissores são importantes ferramentas para entender o mecanismo de ação dos pesticidas. A acetilcolinesterase é o principal neurotransmissor responsável por mediar os estímulos nervosos, mantendo o funcionamento normal do sistema nervoso e sensorial, estando presente principalmente no cérebro e nos músculos (OOST *et al.*, 2003). A inibição da atividade desta enzima ou o seu estímulo pode ser um indicativo de exposição a um estressor químico, muito eficaz principalmente em exposições a pesticidas (NIMMO & MCEWEN, 1994; LEITE *et al.*, 2010). Outra enzima responsável principalmente pela desintoxicação nos organismos é a glutatona S-transferase. É uma enzima solúvel que catalisa compostos eletrofílicos participando da defesa contra danos às estruturas do DNA e lipídios. A exposição à pesticidas orgânicos podem ocasionar a sua inibição ou indução alterando o funcionamento de defesa do organismo (OOST *et al.*, 2003). Geralmente os efeitos consequentes das alterações da atividade destas enzimas são observados por modificações no comportamento, no crescimento e no desenvolvimento dos organismos.

Para o desenvolvimento destes testes ecotoxicológicos, se faz necessário o uso de espécies-modelo aquáticas e/ou terrestres, que apresentem certa sensibilidade à compostos tóxicos e que sejam

de fácil manipulação. É fundamental que as espécies sejam representativas de ecossistemas que estejam em equilíbrio como também em alteração, para que os resultados possam servir de monitoramento destes ecossistemas.

Os anfíbios são excelentes espécies-modelo a serem estudadas, pois apresentam diversas características que os tornam suscetíveis à contaminação por pesticidas, estão presentes em diversos ecossistemas aquáticos e, além disso, são atualmente a classe de vertebrados mais ameaçada do planeta, com 32,5% de suas espécies ameaçadas (STUART *et al.*, 2004), o que torna o estudo deste taxa de grande importância para a preservação das espécies e conseqüentemente dos ecossistemas em que estão inseridos.

O declínio de populações de anfíbios vem ocorrendo mundialmente desde o final dos anos 80 até os dias de hoje (GASCON *et al.*, 2005) como resultado de vários fatores como a perda de habitat, constatada como a maior ameaça (SEMLITSCH, 2003a; STUART *et al.*, 2004; ALFORD, 2010), a contaminação ambiental, a introdução de espécies exóticas potencialmente predadoras, a sobrecoleta para consumo humano, doenças emergentes e a radiação ultravioleta (ALFORD, 2010). A contaminação ambiental é reconhecida como a segunda maior ameaça às populações de anfíbios devido aos compostos químicos (GASCON *et al.*, 2005), pois podem agir diretamente sobre os juvenis e adultos que se encontram no ambiente terrestre (SEMLITSCH, 2003a) ou sobre as larvas no ambiente aquático, onde estas podem também entrar em contato com estes agentes através da chuva, inundações, deposição da atmosfera e descartes (BOONE & BRIDGES, 2003; SCHIESARI *et al.*, 2007).

A maioria dos anfíbios depende tanto do habitat aquático quanto do terrestre para completar seu ciclo de vida (SEMLITSCH, 2003a), necessário para a reprodução e desenvolvimento da larva e para o desenvolvimento do juvenil e maturação, respectivamente. Este ciclo de vida é muitas vezes considerado complexo, pois envolve mudanças morfológicas, fisiológicas, ecológicas e comportamentais devido à metamorfose que ocorre na transição desses habitats (SEMLITSCH, 2003b). As larvas de anfíbio em especial sofrem mudanças consideráveis durante seu desenvolvimento estando expostas a várias interferências e má formação (COOKE, 1981). Outras características também os tornam suscetíveis aos poluentes, como a fina e permeável membrana do ovo assim como a pele do adulto, o período em que

as larvas permanecem na água e a pouca mobilidade dos indivíduos em terra (BOONE & BRIDGES, 2003; SCHIESARI *et al.*, 2007).

Desta forma, pelos anfíbios apresentarem todas essas características morfológicas, fisiológicas e de história de vida, eles podem ser considerados e usados como indicadores ambientais (COOKE, 1981; POUNDS *et al.*, 2005), auxiliando nas tomadas de medidas para redução do impacto de poluentes no ambiente, que por contrapartida diminuiria também a ameaça às populações desses animais, bem como a todas as espécies expostas a estes poluentes, inclusive a humana (GASCON *et al.*, 2005). Além disso, em geral, a maior parte das pesquisas provém do Hemisfério Norte e onde a biodiversidade é mais intensa (na região Neotropical) há pouquíssimas pesquisas voltadas para o conhecimento das espécies e seus comportamentos frente a estes poluentes (SCHIESARI *et al.*, 2007).

Portanto, considerando a necessidade de novas pesquisas que avaliem os impactos diretos e indiretos do uso de defensivos agrícolas em monoculturas de cana-de-açúcar, como os herbicidas, sobre as espécies de anfíbios, o presente trabalho propôs testar experimentalmente as hipóteses de que (1) os principais herbicidas utilizados na cultura de cana-de-açúcar no Brasil, embora desenvolvidos especificamente para o controle de ervas daninhas, são capazes de causar mortalidade em larvas de anfíbios, (2) esta mortalidade também se manifesta quando larvas de anfíbios são expostas a concentrações recomendadas para uso destes herbicidas, (3) além de efeitos letais, a exposição de larvas de anfíbios a concentrações dos principais herbicidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar no Brasil causa efeitos subletais em termos de crescimento, desenvolvimento, comportamento, imunocompetência e atividade enzimática, e estes efeitos subletais podem influenciar o comportamento e ciclo de vida dos indivíduos.

2. Materiais e Métodos

2.1 Generalidades

2.1.1 O Sistema-modelo

As espécies selecionadas foram *Hypsiboas faber*, *Hypsiboas pardalis* e *Physalaemus cuvieri*. Todas estas espécies são comuns e abundantes. Têm ampla distribuição geográfica que coincide com importantes áreas de cultivo de cana-de-açúcar, e ocorrem em corpos d'água encontrados dentro de canaviais (Figura 1, Figura 2).

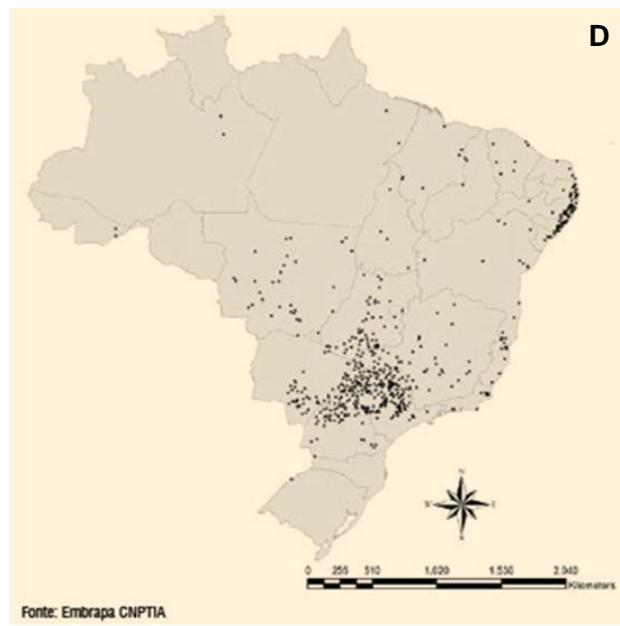


Figura 1. Distribuição na América do Sul das espécies *Hypsiboas faber* (A), *Hypsiboas pardalis* (B) e *Physalaemus cuvieri* (C) (IUCN, 2012), e distribuição espacial das usinas sucroalcooleiras no Brasil em 2010 (D).



Figura 2. Corpos d'água colonizados por larvas de anfíbios em canaviais, Luiz Antonio, SP. Corpos d'água como estes foram colonizados por *Dendropsophus minutus*, *Dendropsophus nanus*, *Scinax fuscovarius*, *Leptodactylus fuscus*, *Leptodactylus mystacinus*, *Physalaemus cuvieri*, *Eupemphix nattereri*, *Elachistocleis sp.*, *Phyllomedusa hypochondrialis* e *Pseudis sp.* (L. Schiesari, dados não publicados).

Hypsiboas faber é uma espécie de grande porte, com cerca de 10 cm (VERDADE *et al.*, 2009; Figura 3), que habita florestas tropicais úmidas e as regiões de borda destas florestas. De ampla distribuição, abrange os estados de Espírito Santo, Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Bahia, além de ocorrer na província de Misiones na Argentina e na porção oriental do Paraguai (LAVILLA *et al.*, 2010). Sua reprodução se dá em sítios alagados temporários, dependentes da época de chuvas, entre os meses de setembro e março, com pico nos meses de janeiro e fevereiro (BERTOLUCI & RODRIGUES, 2002; obs. pessoal). As desovas possuem de 1000 a 2700 ovos (MARTINS & HADDAD, 1988) e são depositadas em ninhos circulares de lama de aproximadamente 30 cm de diâmetro e sete cm de profundidade (Figura 3), estruturadas pelo macho. Os embriões permanecem no local por aproximadamente 3 dias até que se completem os primeiros estágios larvais e em seguida as larvas exotróficas se desenvolvem em ambientes lênticos (POMBAL JR. & HADDAD, 2005), por mais oito meses até a completa metamorfose (MARTINS, 1993).

Hypsiboas pardalis é uma espécie de médio a grande porte, de aproximadamente 7 cm quando adulto (Figura 4) e os girinos apresentam o corpo e musculatura da cauda na cor marrom, com marcas transversais de cor marrom escuro no dorso da cauda (HEYER *et al.*, 1990). Sua distribuição abrange os estados brasileiros de São Paulo, Rio de Janeiro e Espírito Santo e o leste de Minas Gerais (NASCIMENTO *et al.*, 2004). Habita bordas da Mata Atlântica e matas de galeria, sendo encontrada na vegetação ou no chão perto de poças permanentes ou temporárias. Constroem na margem destas poças ninhos de lama para a reprodução (NASCIMENTO *et al.*, 2004; CONDEZ *et al.*, 2009), similares às construídas pela espécie *H. faber*, mas de menor diâmetro (Figura 4). Segundo Bertoluci e Rodrigues (2002) sua reprodução ocorre entre os meses de julho a janeiro.



Figura 3. Exemplar adulto de *Hypsiboas faber* (A) e sua respectiva desova (B) encontrada na Estação Ecológica de Boracéia. Crédito da foto A para Daniel Din (12/07/2013).



Figura 4. Exemplar adulto de *Hypsiboas pardalis* (A) e sua respectiva desova (B).
Crédito da foto B para Daniel Din (12/07/2013).

Physalaemus cuvieri é uma espécie de pequeno porte, atingindo em média, quando adulto, 3 cm (VERDADE *et al.*, 2009; Figura 5), que está presente em quase todo território brasileiro, como também em Misiones e Entre Rios na Argentina e porção oriental do Paraguai, encontrada em áreas abertas, pastos e florestas, principalmente no período noturno (MIJARES *et al.*, 2010; HEYER *et al.*, 1990). Sua época de reprodução se estende de outubro a março (HEYER *et al.*, 1990), ocorrendo em poças permanentes ou temporárias geralmente em área abertas (CONDEZ *et al.*, 2009). As desovas são depositadas em forma de espuma que flutua (BERTOLUCI & RODRIGUES, 2002a) e fica ancorada às margens da vegetação (Figura 5). Cada desova pode conter de 300 a 700 ovos, que após 3 dias se encontram em estágio larval, saindo do ninho de espuma. Os girinos levam em torno de 45 dias para metamorfosearem (ANDRADE, 1995).

As desovas e embriões das espécies selecionadas foram coletados na Estação Biológica de Boracéia (EBB), localizada na cidade de Salesópolis, a 110 km da cidade de São Paulo (23° 37' 59" S e 45° 31' 59" W). Está inserida em uma reserva da Mata Atlântica de 16450 há e pode ser considerada um sítio de referência uma vez que está inserida dentro de uma bacia hidrográfica protegida e sem fontes locais de poluição (VERDADE *et al.*, 2011 SCHIESARI, dados não publicados). O período chuvoso na região se estende principalmente entre os meses de novembro a janeiro, com precipitação menos elevada, mas presente no resto do ano (HEYER *et al.*, 1990).



Figura 5. Exemplar adulto de *Physalaemus cuvieri* (A) e sua respectiva desova (B) encontrada na Estação Ecológica de Boracéia. Crédito da foto A para Daniel Din (12/07/2013).

2.1.2 Os pesticidas-modelo

Os herbicidas selecionados contêm ingredientes ativos que representam aproximadamente 63% do volume dos herbicidas utilizados em uma grande área produtora de cana-de-açúcar no estado de São Paulo (ARMAS *et al.*, 2005), e são sabidamente utilizados na área de estudo do Projeto Jovem Pesquisador (SCHIESARI obs. pessoal; projeto processo: 2008/57939-9). São eles o glifosato, a ametrina, o 2,4-D, o metribuzin e o acetocloro.

Glifosato. O composto glifosato é o herbicida mais usado por volume mundialmente tanto em plantações alimentícias como não alimentícias. Encontram-se registrados como ingredientes ativos nas formulações de pesticidas três sais deste composto, sendo um deles o glifosato de sódio, muito utilizado como regulador de crescimento da cana-de-açúcar (EPA, 1993) e em pós-emergência de plantas infestantes nesta cultura (ANVISA, 2000). Como maturador, o limite de aplicação é de 1mg/kg com um intervalo de 30 dias e para pós-emergência a quantidade de aplicação é a mesma, mas o intervalo de segurança não é determinado devido à modalidade de emprego (ANVISA, 2000).

Segundo a EPA (Environmental Protection Agency, 1993), o glifosato está classificado como não carcinogênico aos humanos (Tabela 1) e de classe toxicológica IV (classe toxicológica I - extremamente tóxico; II – altamente tóxico; III – medianamente tóxico; IV – pouco tóxico) (ANVISA, 2000). Por apresentar grande adsorção ao solo e pouco deslocamento vertical, dificilmente alcança as camadas de água, exceto quando aplicado diretamente nela ou quando ocorre erosão do solo. Nestes casos este composto é dificilmente quebrado, pois a fotólise ocorre em 69 dias, além de apresentar uma meia-vida na água maior que a dos outros compostos em estudo e a segunda menor solubilidade em água (Tabela 1), podendo ser tóxico a comunidades aquáticas (EPA, 1993).

Ametrina. É o terceiro ingrediente ativo mais utilizado (14,39%) por volume (ARMAS *et al.*, 2005), com aplicação pré e pós-emergência das plantas infestantes (ANVISA, 2013), inibindo a fotossíntese e outros processos enzimáticos (EPA, 2005). Está registrado para uso em culturas de cana-de-açúcar, abacaxi, algodão, banana, café, citro, mandioca, milho e uva, com um limite de aplicação em cultura de cana-de-açúcar de 0,05 mg/kg, não apresentando intervalo de segurança devido à modalidade de emprego (ANVISA, 2013).

O composto ametrina está inserido na classe toxicológica III (ANVISA, 2013), e é caracterizado como móvel com grande potencial de atingir corpos d'água (ARMAS *et al.*, 2005), pois possui baixa solubilidade em água, baixa adsorção ao solo (baixo Koc) e sua quebra por fotólise ocorre em 28 dias. Este ingrediente ativo não causa nenhum efeito de preocupação prioritária aos humanos (Tabela1), mas pode ser leve a moderadamente tóxico a peixes e invertebrados de água doce em exposição aguda, e em exposição crônica causar redução no crescimento e na reprodução destes organismos (EPA, 2005).

2,4-D. O ingrediente ativo 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxacético) representa o quarto herbicida mais utilizado (10,63%) e o que apresentou maior frequência de uso ao longo de quatro anos consecutivos (ARMAS *et al.*, 2005). Utilizado em diversos plantios, sua aplicação é feita em pré e pós-emergência das plantas infestantes nas culturas de arroz, aveia, café, cana-de-açúcar, centeio, cevada, milho, pastagem, soja, sorgo e trigo. Seu limite de aplicação em cultura de cana-de-açúcar é de 0,1 mg/kg, sem intervalo de segurança determinado sendo que o uso deve ser feito até três meses após o plantio ou corte (ANVISA, 2013).

Segundo Armas *et al.* (2005) e Kegley *et al.* (2010), o ingrediente ativo 2,4-D é considerado móvel devido sua alta solubilidade em água e baixa meia-vida em água e solo aeróbico (Tabela 1), além de ocorrer sua quebra por fotólise em 13 dias, podendo alcançar lençóis freáticos e corpos d'água. Estudos indicam que este composto é possivelmente carcinogênico e suspeito de gerar transtorno endócrino (KEGLEY *et al.*, 2010), mas está classificado toxicologicamente na classe I (ANVISA, 2013).

Metribuzim. Na escala representativa de compostos mais utilizados por volume, o metribuzim está em quinto lugar (9,43%) (ARMAS *et al.*, 2005), empregado em pré-emergência das plantas infestantes nas culturas de aspargo, mandioca e soja, em pós-emergência em cultura de trigo e em ambas as modalidades de emprego nas culturas de batata, café, tomate e cana-de-açúcar. Nesta última o limite de aplicação é de 0,1 mg/kg, com 120 dias de intervalo de segurança (ANVISA, 2013).

Classificado toxicologicamente na classe III pela ANVISA (2013) é também considerado um ingrediente ativo de preocupação prioritária pela organização PAN (Pesticide Action Network), pois é altamente tóxico sobre, principalmente, o desenvolvimento e reprodução dos organismos. Este composto

se degrada primeiramente por fotólise na água em 0,2 dias, no solo e por metabolismo microbiano, e torna-se disponível a alcançar lençol freático por não ser volátil (EPA, 1998) e alcançando o meio aquoso persiste por apresentar meia-vida em água elevada (Tabela 1). Apesar da quebra deste composto por fotólise ser muito rápida, seus metabólitos diketo-metribuzim e desaminodiketometribuzim, são considerados de baixa toxicidade. O desaminodiketometribuzim é a maior fração gerada pela quebra do metribuzim, sendo considerado de baixa toxicidade para algas e de média toxicidade para peixes e cladóceros e é bastante solúvel em água com baixo valor de Kow (Log P 1,49) (PPDB, 2013).

Acetocloro. O composto acetocloro foi o sétimo herbicida mais utilizado por volume (7,82%) em um período de quatro anos, mas sua aplicação aumentou bruscamente em 2003, o que levou a ficar em primeiro lugar e substituir a atrazina, devido suas características físico-químicas serem menos agressivas ao ambiente que este outro composto (ARMAS *et al.*, 2005). Sua aplicação se faz em pré-emergência em plantas infestantes nas culturas de café, milho, soja e cana-de-açúcar, com um limite de aplicação de 0,1 mg/kg e com intervalo de segurança indeterminado devido à modalidade de emprego (ANVISA, 2013). Pertencente à classe toxicológica III (ANVISA, 2013), é considerado um composto de preocupação prioritária por ser extremamente tóxico e carcinogênico (Tabela 1). No ambiente o acetocloro é potencialmente móvel, pois apresenta uma média adsorção ao solo, baixa probabilidade de ocorrer lixiviação (EXTOXNET, 1996) e é o segundo composto com maior período (>30 dias) para ocorrer a fotólise em água.

Tabela 1. Propriedades físico-químicas e efeitos de preocupação prioritária dos ingredientes ativos utilizados nos testes. SD= sem dados.

Ingrediente ativo	Glifosato	Ametrina	2,4-D	Metribuzim	Acetocloro
Propriedades físico-químicas					
Função	Herbicida	Herbicida	Herbicida	Herbicida	Herbicida
Classe química	Glicina substituída	Triazina	Ácido ariloxialcanóico	Triazinona	Cloroacetanilida
Peso molecular (g/mol)	168,07	227,12	221,04	214,29	269,77
Solubilidade na água a 20°C (mg/L)	10500	200	23180	1165	282
Koc ⁱ	21699	3,45*	46**	106**	422*
Kow ⁱⁱ em pH7, a 20°C (Log P)	-3,20	2,63	-0,83	1,65	4,14
Fotólise em água em pH7 (dias)	69	28**	13	0,2	>30
Hidrólise em água a 20°C e pH7 (dias)	>365	>365	>365	>365	>365
Degradação em solo aeróbico (dias; DT50 em laboratório)	49	60	14	11,5	10,6
Degradação em solo anaeróbico (dias)**	22	189	333	276	-
Efeitos de preocupação prioritária					
PAN Bad actor chemical ⁱⁱⁱ	não	não	não	sim	sim
WHO classificação****	III	II	II	II	III
Classificação toxicológica ANVISA***	IV	III	I	III	III
Toxicidade aguda**	baixa	baixa	moderada	moderada	baixa
Contaminação de lençol freático**	possivelmente	possivelmente	possivelmente	possivelmente	SD
Carcinogênico	não	SD	possivelmente	não	possivelmente
Disruptor endócrino	SD	SD	possivelmente	possivelmente	possivelmente
Inibidor de colinesterase	não	não	não	não	não
Efeito sobre o desenvolvimento e reprodução	não	SD	sim	sim	sim
Mutagênico	não	não	não	não	sim
Neurotóxico	não	SD	sim	SD	não

"-" valor não encontrado na literatura;

Todos os dados foram extraídos da base de dados de PPDB (Pesticides Properties Database, 2013), exceto os que apresentam asterisco (*);

*Dados extraídos de Armas *et al.*, 2005;

**Dados extraídos de Kegley *et al.*, 2010;

***Dados extraídos de <http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/bUI0> (ANVISA, 2013a);

****para definição da classificação ver WHO, 2009;

ⁱCoeficiente de partição carbono orgânico-água (Coeficiente de adsorção);

ⁱⁱCoeficiente de partição octanol-água

ⁱⁱⁱIngredientes ativos que apresentam um ou mais efeitos de preocupação prioritária (toxicidade aguda, contaminação de lençol freático, carcinogênico, transtorno endócrino, inibidor de colinesterase e influência no desenvolvimento e reprodução) segundo PAN (Pesticide Action Network) e CPR (Californians for Pesticides Reform);

Os compostos considerados possíveis de contaminar lençóis freáticos devem apresentar dois dos seguintes dados: solubilidade em água >3mg/L ou Koc<1900ml/g; e hidrólise em água>14 dias ou degradação em solo aeróbico>610 dias ou em solo anaeróbico>9 dias (KEGLEY *et al.*, 2010)

Tabela 2. Interpretação dos dados das propriedades físico-químicas dos compostos, segundo Pesticide Properties Database (PPDB, 2013).

Kow (Log P)		Solubilidade em água (mg/L)	
<2,7	baixa bioacumulação	<50	baixa
2,7 - 3	moderada bioacumulação	50 - 500	moderada
>3	alta bioacumulação	>500	alta
Degradação em solo (dias) e Hidrólise em água DT50 (dias)		Fotólise em água DT50 (dias)	
<30	não persistente	<1	rápido
30 - 100	moderadamente persistente	1 - 14	moderadamente rápido
100 - 365	persistente	14 - 30	devagar
>365	muito persistente	>30	estável

2.1.3 Manutenção das desovas e larvas até o início dos experimentos

Os embriões e larvas foram transportados em recipientes de plástico ou sacos plásticos (conforme o tipo de desova) logo após a coleta para o laboratório da Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo (EACH-USP). Estas foram mantidas em tanques de 50L com água de fornecimento público, filtrada em filtro de partículas acoplado a um filtro de carvão ativado e climatizada a 25°C até a sua eclosão. Após a eclosão total das larvas, foi feita uma contagem para estimar o número de indivíduos por desova e em seguida foram separadas e colocadas em outros novos tanques, para que houvesse uma maior área/indivíduo. Parte da água do tanque foi trocada a cada dois dias, para que os parâmetros físico-químicos da água fossem mantidos estabilizados.

As larvas foram alimentadas a cada 24 horas *ad libitum*, com uma mistura triturada na proporção de 3:1 de ração de coelho (Purina Mills, LLC, USA; ~16% proteína) e ração para peixe TetraMin (~45% proteína) até o início do experimento de exposição aguda (SCHIESARI, 2004). No caso das desovas utilizadas em experimento de exposição crônica, a alimentação foi mantida após o início do mesmo.

A permissão da coleta, transporte e armazenamento dos animais descritos neste projeto foi concedida pelo IBAMA/ICMBio (permissão 17559-1 de 21 de Outubro de 2008) e os experimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (protocolo 039/2007 26 de Abril de 2007).

2.2 Delineamento experimental

2.2.1 Controle de qualidade

Os experimentos foram baseados em protocolos internacionalmente padronizados para bioensaios ecotoxicológicos com anfíbios (ASTM, 2004) para maximizar a reprodutibilidade, repetibilidade e comparabilidade dos resultados dos experimentos, bem como com a literatura.

Ingredientes ativos de pesticidas e solventes - Os ingredientes ativos de pesticidas e os solventes utilizados nos experimentos estão apresentados na tabela 3 abaixo.

Tabela 3. Dados gerais dos ingredientes ativos e solventes utilizados nos experimentos.

Reagentes	Empresa	Pureza	Registro	Volume
Etanol	Merck	absoluto PA	603-002-00-5	1 L
Acetona	Merck	PA	606-001-00-8	1 L
Glifosato	Sigma-Aldrich	99,20%	1071-83-6	250 mg
Ametrina	Sigma-Aldrich	98,50%	834-12-8	250 mg
2,4-D	Sigma-Aldrich	97%	94-75-7	5 g
Metribuzin	Sigma-Aldrich	99,80%	21087-64-9	100 mg
Acetocloro	Sigma-Aldrich	96,80%	34256-82-1	100 mg
Atrazina	Sigma-Aldrich	98,80%	1912-24-9	250 mg
Diuron	Sigma-Aldrich	99,50%	330-54-1	250 mg
Isoxaflutol	Sigma-Aldrich	99,90%	141112-29-0	100 mg

Organismos - Os experimentos foram realizados com indivíduos provenientes de três ou mais desovas da espécie de modo a incorporar certa diversidade genotípica na avaliação da sensibilidade aos agroquímicos. Os indivíduos foram selecionados com aproximadamente a mesma massa corporal (dependendo da espécie esta massa foi de 5 mg a 29 mg) e estágio de desenvolvimento (aproximadamente estágio 25; Gosner, 1960) com a finalidade de reduzir a variabilidade dos parâmetros medidos e posteriormente fortalecer a interpretação dos resultados. Apenas indivíduos aparentemente saudáveis, ou seja, com movimentos natatórios normais, com capacidade de se movimentar ao longo da coluna d'água e sem nenhuma deformidade e/ou lesão aparente, foram utilizados nos experimentos.

Qualidade da água - A água utilizada nos experimentos foi água de fornecimento público, filtrada em filtro de partículas acoplado a um filtro de carvão ativado. Antes do experimento, a cada 24h, e ao final

deste, foram analisadas as condições físico-químicas da água (pH, temperatura, condutividade e oxigênio dissolvido) por métodos padronizados (APHA-AWWA-WEF, 1995). Segundo o guia FETAX (ASTM, 2004), os valores de pH devem manter-se entre 6,5 e 9 no controle e tratamentos. Os valores de condutividade e oxigênio dissolvido não são estabelecidos pelo guia internacional e por esta razão o presente estudo considera os valores ótimos de oxigênio dissolvido para cultivo de peixes de até 4 mg/L (KUBTZA, 2003). A temperatura é reportada abaixo.

Descontaminação - Toda vidraria utilizada na manipulação dos compostos e experimentos foi devidamente lavada com Extran 3%, onde a vidraria ficou imersa por 12h e depois foi enxaguada 10 vezes em água corrente. Após a lavagem com Extran, a vidraria ficou imersa em ácido nítrico 10% por mais 12h e depois foi enxaguada 10 vezes em água corrente filtrada e cinco vezes em água deionizada. Toda vidraria foi seca em estufa, exceto as volumétricas, e armazenadas em armários fechados.

Temperatura - A temperatura do laboratório e da sala de cultura permaneceu constante a 25°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), através de uso de ar condicionado quente/frio, pois a variação de temperatura influencia no metabolismo ectotérmico e conseqüentemente na sensibilidade das espécies. A temperatura de 25°C é um grau mais alto da estabelecida pelo guia FETAX (ASTM, 2004), pois no presente estudo as espécies utilizadas são provenientes da região Neotropical que apresenta temperatura mais elevada que a reportada no guia internacional.

Alimentação - A alimentação das larvas ocorreu a cada 24h *ad libitum* com uma mistura triturada 3:1 de ração de coelho (Purina Mills, LLC, USA; ~16% proteína) e ração para peixe TetraMin (~45% proteína) até o início dos experimentos de exposição aguda e no caso dos indivíduos utilizados em experimento de exposição crônica, a alimentação após o início do experimento foi mantida, com um cálculo de 16% da massa média dos indivíduos e depois multiplicado pelo número de indivíduos presentes por tratamento (SCHIESARI, 2004).

2.2.2 Experimento de exposição aguda

De modo a testar a hipótese de que os herbicidas glifosato, acetocloro, ametrina, metribuzin, atrazina e 2,4-D são letais a larvas de anuros e que há variação significativa na toxicidade destes compostos, foram realizados testes de laboratório de exposição aguda (96h) com as espécies *Physalaemus cuvieri* (Leiuperidae) e *Hypsiboas pardalis* (Hylidae).

Foram realizados nove experimentos no total, sendo que os sete primeiros foram experimentos preliminares (testes 1 a 7; Tabela 4), que serviram para a estimativa das amplitudes de concentrações a serem manipuladas nos testes definitivos (teste 8 e 9). Toda a descrição dos procedimentos do experimento de exposição aguda se refere aos dois testes definitivos.

A quantidade de experimentos preliminares realizados foi definida conforme a obtenção de dados de mortalidade para cada composto. Desta forma, foi preciso a realização de sete experimentos, sendo que os três primeiros não apresentaram mortalidade alguma.

Os compostos atrazina e 2,4-D não foram utilizados nos testes definitivos, pois apresentaram baixa solubilidade em água, o que dificultou o uso destes compostos no preparo das soluções quando foi necessário o aumento de concentração para atingir uma mortalidade dos indivíduos.

Inicialmente foram pesquisados os dados disponíveis na literatura para toxicidade dos compostos selecionados para anfíbios e peixes como parâmetro para definir os valores mínimos e máximos a serem manipulados nos testes de estimativa de amplitude. Dentro destes valores mínimo e máximo, cada composto foi manipulado em cinco concentrações distribuídas ao longo de uma escala logarítmica, além dos controles apropriados. Posteriormente, os resultados destes testes foram usados para refinar a determinação de concentrações mínimas e máximas nos testes subsequentes (definitivos).

Com exceção do composto glifosato, os outros compostos não apresentam boa solubilidade em água. Nestes casos, diversas tentativas de solubilização foram feitas com os solventes etanol e acetona. Sempre que um ou mais solventes se fizeram necessários, foram incluídos no teste, além do controle com

água, um controle para o solvente na concentração máxima utilizada dentro do experimento (Tabela 4).

Cada tratamento dos testes definitivos foi replicado quatro vezes.

Tabela 4. Sumário dos experimentos de exposição aguda realizados com larvas de anfíbios.

Número do teste	Data	Organismo	Matriz	Efeito	Nº de Testes	Solução estoque matriz	Solvente	Concentrações utilizadas	Réplicas
teste 1	14/01/2011	<i>P. cuvieri</i>	Água c/ glifosato	Agudo	1	10 mg.L ⁻¹	agua+etanol	0.001 - 0.01 - 0.1 - 1 mg.L ⁻¹	4
teste 1	14/01/2011	<i>P. cuvieri</i>	Água c/ atrazina	Agudo	1	10 mg.L ⁻¹	etanol+agua	0.001 - 0.01 - 0.1 - 1 mg.L ⁻¹	4
teste 1	14/01/2011	<i>P. cuvieri</i>	Água c/ 2,4-D	Agudo	1	10 mg.L ⁻¹	etanol+agua	0.001 - 0.01 - 0.1 - 1 mg.L ⁻¹	4
teste 2	21/02/2011	<i>P. cuvieri</i>	Água c/ atrazina	Agudo	1	30 mg.L ^{-1*}	etanol+agua	1 - 10 - 30 mg.L ⁻¹	3
teste 2	21/02/2011	<i>P. cuvieri</i>	Água c/ 2,4-D	Agudo	1	30 mg.L ^{-1*}	etanol+agua	1 - 10 - 30 mg.L ⁻¹	3
teste 3	29/09/2011	<i>H. pardalis</i>	Água c/ acetocloro	Agudo	1	4,98 mg.L ⁻¹	acetona+água	0.1 - 0.258 - 0.664 - 1.709 mg.L ⁻¹	3
teste 3	29/09/2011	<i>H. pardalis</i>	Água c/ glifosato	Agudo	1	565,65 mg.L ⁻¹	água	11.35 - 29.24 - 75.32 - 194.05 mg.L ⁻¹	3
teste 4	04/10/2011	<i>H. pardalis</i>	Água c/ ametrina	Agudo	1	85,09 mg.L ⁻¹	etanol+água	1.71 - 4.41 - 11.35 - 29.24 mg.L ⁻¹	3
teste 5	07/11/2011	<i>P. cuvieri</i>	Água c/ glifosato	Agudo	1	937,00 mg.L ⁻¹	água	70 - 84,69 - 102,47 - 123,98 - 150 mg.L ⁻¹	3
teste 5	07/11/2011	<i>P. cuvieri</i>	Água c/ acetocloro	Agudo	1	67 mg.L ⁻¹	acetona+água	1 - 2,11 - 4,47 - 9,46 - 20 mg.L ⁻¹	3
teste 6	27/11/2011	<i>P. cuvieri</i>	Água c/ acetocloro	Agudo	1	34,9 mg.L ⁻¹	acetona+água	1 - 1,78 - 3,16 - 5,62 - 10 mg.L ⁻¹	3
teste 6	27/11/2011	<i>P. cuvieri</i>	Água c/ ametrina	Agudo	1	114,4 mg.L ⁻¹	etanol+água	4 - 6,62 - 10,95 - 18,13 - 30 mg.L ⁻¹	3
teste 7	19/12/2011	<i>P. cuvieri</i>	Água c/ acetocloro	Agudo	1	38 mg.L ⁻¹	acetona+água	1 - 1,86 - 3,46 - 6,45 - 12 mg.L ⁻¹	3
teste 7	19/12/2011	<i>P. cuvieri</i>	Água c/ ametrina	Agudo	1	150,3 mg.L ⁻¹	etanol+água	10 - 13,16 - 17,32 - 22,80 - 30 mg.L ⁻¹	3
teste 7	19/12/2011	<i>P. cuvieri</i>	Água c/ metribuzin	Agudo	1	511,10 mg.L ⁻¹	etanol+água	11,35 - 29,24 - 75,32 - 194,05 mg.L ⁻¹	3
teste 8	31/01/2012	<i>P. cuvieri</i>	Água c/ glifosato	Agudo	1	1389,3 mg.L ⁻¹	água	84 - 97,10 - 112,25 - 129,76 - 150 mg.L ⁻¹	4
teste 8	31/01/2012	<i>P. cuvieri</i>	Água c/ acetocloro	Agudo	1	63 mg.L ⁻¹	acetona+água	1 - 1,86 - 3,46 - 6,45 - 12 mg.L ⁻¹	4
teste 8	31/01/2012	<i>P. cuvieri</i>	Água c/ ametrina	Agudo	1	201,6 mg.L ⁻¹	etanol+água	10 - 12,57 - 15,81 - 19,88 - 25 mg.L ⁻¹	4
teste 8	31/01/2012	<i>P. cuvieri</i>	Água c/ metribuzin	Agudo	1	1145,6 mg.L ⁻¹	etanol+água	29 - 46,64 - 75 - 120,63 - 194 mg.L ⁻¹	4
teste 9	28/08/2012	<i>H. pardalis</i>	Água c/ glifosato	Agudo	1	1389,3 mg.L ⁻¹	água	84 - 97,10 - 112,25 - 129,76 - 150 mg.L ⁻¹	4
teste 9	28/08/2012	<i>H. pardalis</i>	Água c/ acetocloro	Agudo	1	63 mg.L ⁻¹	acetona+água	1 - 1,86 - 3,46 - 6,45 - 12 mg.L ⁻¹	4
teste 9	28/08/2012	<i>H. pardalis</i>	Água c/ ametrina	Agudo	1	201,6 mg.L ⁻¹	etanol+água	10 - 12,57 - 15,81 - 19,88 - 25 mg.L ⁻¹	4
teste 9	28/08/2012	<i>H. pardalis</i>	Água c/ metribuzin	Agudo	1	1145,6 mg.L ⁻¹	etanol+água	29 - 46,64 - 75 - 120,63 - 194 mg.L ⁻¹	4

*Para a concentração de 30 mg.L⁻¹ não houve solução estoque.

Os recipientes-teste experimentais foram potes de vidro de capacidade de 2,4 litros, contendo 1 litro de solução e 10 girinos da espécie em estágio inicial de desenvolvimento (aproximadamente estágio 25; Gosner, 1960) e aproximadamente mesma massa corporal (5 mg). Os girinos foram colocados em um mesmo recipiente e separados aleatoriamente em grupos de 5 indivíduos. Estes foram novamente aleatorizados e assim inseridos nos tratamentos. A temperatura no laboratório foi mantida constante a 25°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) e a alimentação interrompida 24h antes do início do experimento. Após cada 24 horas de experimento e ao término deste, as condições físico-químicas da água foram analisadas (pH, temperatura, condutividade e oxigênio dissolvido) e os indivíduos mortos foram computados e retirados. Decorridas 96 horas, a mortalidade total de cada recipiente foi registrada e os testes encerrados. Uma amostra dos indivíduos foi preservada no gelo para análise de resíduos ou em solução de formalina como testemunho e para análise morfológica.

Para a classificação dos compostos segundo sua toxicidade aguda (CL50) para organismos aquáticos, o presente trabalho utilizou a classificação do Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS Criteria; GHS, 2011). Portanto, os compostos podem ser classificados em três categorias quando expostos a 96h de experimento: alta toxicidade (CL50 $< 1\text{mg/L}$); média toxicidade (CL50 entre 1 e 10mg/L) e baixa toxicidade (CL50 $> 10\text{mg/L}$).

2.2.3 Experimento de exposição crônica

Após nove experimentos agudos e com uma pequena quantidade de dados obtidos por experimento, optou-se por realizar experimentos de exposição crônica a fim de testar a hipótese de que os herbicidas selecionados, em concentrações recomendadas para uso e em exposição prolongada, podem causar alterações letais e subletais em termos de crescimento, desenvolvimento, comportamento e morfologia em larvas de anuros.

Para a realização do experimento de exposição crônica coletou-se somente desovas das espécies *Hypsiboas faber* e *Hypsiboas pardalis*, pois estas se encontravam em grandes quantidades (mais que três desovas) e em boa qualidade, ou seja, as desovas gelatinosas estavam inteiras, não demonstrando perda

parcial da desova por predação ou pisoteio e com grande número de ovos, podendo gerar assim um número alto de indivíduos/desova (± 2500 ovos). Além disso, optou-se por coletar desovas de *H. faber*, ao invés de *P. cuvieri* por duas razões: (1) Larvas de *H. faber* apresentam uma maior massa corpórea que *P. cuvieri*, importante característica para obtenção de resultados mais precisos nos testes de perfil leucocitário, uma vez que facilita o manuseio e obtenção de quantidade apropriada de sangue para análise; (2) desovas de *P. cuvieri* fornecem um número muito menor de indivíduos/desova que *H. faber*, e uma vez que para a realização do experimento crônico se faz necessária a utilização de 30 indivíduos/aquário (aprox. 1100 indivíduos/experimento), seria necessária a coleta de muito mais desovas de *P. cuvieri* do que *H. faber*.

No que diz respeito aos compostos selecionados, além do conhecimento de que são largamente utilizados em culturas de cana-de-açúcar, foi utilizado também como critério de seleção as propriedades físico-químicas dos compostos, como a sua solubilidade em água, tempo de hidrólise e de fotólise, facilitando assim seu uso no experimento, preparo das soluções e validação dos experimentos.

Para determinar as concentrações dos herbicidas empregados no experimento de exposição crônica, foi feito primeiramente um levantamento das doses mínimas e máximas recomendadas para uso em cultura de cana-de-açúcar pelos próprios fabricantes, de todas as formulações existentes (AGROFIT, 2011) (Anexo 1).

Através dos dados de concentração de ingrediente ativo presente em cada formulação, calculou-se a concentração de ingrediente ativo em uma aplicação de dose mínima recomendada/ha e em uma aplicação de dose máxima recomendada/ha. Com este conjunto de dados, obteve-se a moda das massas de ingredientes ativos aplicados em dose mínima e em dose máxima permitida para uso. Os valores das modas calculadas, em g/ha, foram convertidos para a área do aquário e posteriormente divididos por 12L, que simularia um cenário de contaminação de uma poça de 10 cm de profundidade, inserida num canal. Esta profundidade é mais próxima de um cenário realista das poças encontradas em cultura de cana-de-açúcar e colonizadas por anfíbios (SCHIESARI, obs. pessoal).

Protocolo experimental com a espécie *Hypsiboas faber*

O bioensaio de exposição crônica teve duração de 23 dias, onde larvas da espécie *H. faber* foram submetidas a duas concentrações de cada um dos três compostos (glifosato, 2,4-D e metribuzim) (Tabela 5) e a um controle de água, sendo que cada tratamento foi replicado cinco vezes.

Tabela 5. Sumário do experimento de exposição crônica realizado com larvas da espécie *Hypsiboas faber*.

Número do teste	Data	Organismo	Matriz	Concentrações utilizadas	Nº desovas utilizadas
teste 1	08/02/2012	<i>H. faber</i>	Água c/ glifosato	0,48 - 2,4 mg.L ⁻¹	4
teste 1	08/02/2012	<i>H. faber</i>	Água c/ 2,4-D	0,40 - 1,21 mg.L ⁻¹	4
teste 1	08/02/2012	<i>H. faber</i>	Água c/ metribuzin	1,44 - 1,92 mg.L ⁻¹	4

Os embriões e larvas utilizados no experimento foram obtidos de quatro desovas da espécie, coletadas na Estação Biológica de Boracéia, de modo a incorporar certa diversidade genotípica na avaliação da sensibilidade aos agroquímicos. As desovas foram transportadas logo após a coleta para o laboratório em recipientes de plástico e depois mantidas em tanques de 50L até a sua eclosão. Após a eclosão as larvas foram separadas e colocadas em outros três novos tanques, para que houvesse uma maior área/indivíduo. Foram alimentadas com uma mistura 3:1 de ração de coelho (Purina Mills, LLC, USA; ~16% proteína) e ração para peixe TetraMin (~45% proteína) e 2/3 da água de cultura foi trocada a cada dois dias. Durante o experimento os indivíduos foram alimentados diariamente com uma dose da mistura de ração equivalente a 16% da massa média individual (SCHIESARI, 2004), obtida de 30 indivíduos retirados aleatoriamente da cultura no início do experimento.

Para a montagem do experimento, as larvas foram colocadas juntas em um mesmo recipiente para utilizarmos aleatoriamente indivíduos provenientes das quatro desovas, sendo selecionados os indivíduos com aproximadamente a mesma massa corporal (massa média de 30 indivíduos igual a 29,1mg) e estágio de desenvolvimento (aproximadamente estágio 25; GOSNER, 1960), com a finalidade de reduzir a variabilidade dos parâmetros medidos e posteriormente fortalecer a interpretação dos resultados. Apenas indivíduos aparentemente saudáveis, ou seja, com movimentos natatórios normais, com capacidade de se movimentar ao longo da coluna d'água e sem nenhuma deformidade e/ou lesão aparente, foram utilizados nos experimentos. Estes foram colocados de cinco em cinco em copos plásticos com água de diluição e

depois foram distribuídos aleatoriamente em 10 girinos/copo. Foram aleatorizados novamente grupos de 3 copos, totalizando 30 girinos/tratamento.

Os recipientes empregados foram aquários de vidro de capacidade de 40 litros, contendo 30 litros de solução e 30 girinos da espécie. A temperatura no laboratório foi mantida constante à 25°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) e uma vez por semana as soluções foram trocadas e renovadas. Nesta troca os girinos foram mantidos em copos de plástico com a solução do próprio tratamento, para que os aquários fossem lavados com água filtrada corrente. Após o acréscimo dos 30L de solução de cada tratamento, os girinos foram colocados novamente ao seu respectivo aquário.

A cada 48 horas de experimento foram realizadas contagens de sobrevivência dos indivíduos (número de indivíduos presentes no aquário). Foi contabilizado também o número de indivíduos que estavam em atividade em cada aquário, no período da manhã e da tarde (aleatoriamente), totalizando 20 registros. Para a obtenção destes dados foi estabelecido como indivíduos em atividade, qualquer movimento de comportamento, seja este natatório ou de alimentação, contabilizados em um instante de observação ao longo da área do aquário (SCHIESARI, 2004).

A análise das condições físico-químicas da água (pH, temperatura, condutividade e oxigênio dissolvido) e a descontaminação da vidraria utilizada na manipulação dos compostos e experimento, foram realizadas sob o mesmo controle de qualidade descrito para os outros testes.

Ao término do experimento, os indivíduos foram retirados das soluções e pesados individualmente (massa úmida). Os 10 primeiros indivíduos de cada aquário foram submetidos à análise de perfil leucocitário, um indicador de imunocompetência que pode revelar quais são os efeitos dos compostos sobre os componentes do sistema imunológico. Assim, para a análise do perfil leucocitário, foi retirada por capilaridade uma quantidade de sangue (no mínimo 2 μL) do pedúnculo caudal, de cada indivíduo, e adicionado a uma lâmina para realização de esfregaço. As lâminas foram devidamente identificadas e guardadas em um laminário e coradas posteriormente com corante giemsa. As células contabilizadas foram lidas aleatoriamente em microscópio óptico em aumento de 100X, completando um total de 100

células/lâmina. Este teste ocorreu em colaboração com Professor Fernando Gomes do Departamento de Fisiologia do IB-USP e sua aluna Clara S. de M. Aquino.

Os mesmos indivíduos que foram submetidos à análise de perfil leucocitário, foram em seguida congelados em freezer -80°C em embalagens de alumínio, para posterior análise de biomarcadores moleculares, que são indicadores de exposição e/ou de danos moleculares de preocupação prioritária. Este teste teve como objetivo quantificar as atividades enzimáticas de acetilcolinesterase (AChE) e glutathione S-transferase (GST) dos indivíduos utilizados no experimento, com a colaboração do Professor Eduardo Almeida, do departamento de Química e Ciências Ambientais, da UNESP – SJRP.

Os outros 20 indivíduos de cada tratamento foram preservados em solução de formalina como testemunho e classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento (GOSNER, 1960). Após um mês do término do experimento, o teste de biomarcadores moleculares foi realizado e desenvolvido em laboratório segundo as seguintes etapas:

Homogeneização para GST

Para a análise da GST, o girino foi pesado (no mínimo 100 mg) e posteriormente homogeneizado (1:3 massa:volume) em tampão Tris HCl 20 mM, pH 7,4 contendo sacarose 0,5M, KCl 0,15 mM e 1 mM de inibidor de protease (PMSF), e centrifugados a 10.000 x g por 20 minutos a 4°C e a fração sobrenadante foi coletada e re-centrifugada a 50.000 x g por 60 minutos a 4°C. A porção sobrenadante foi novamente coletada para a análise da atividade enzimática.

Homogeneização para a AChE

Para a análise da AChE, o girino foi pesado e posteriormente homogeneizado (1:3 massa:volume) em Tris HCl 0,1 mol.L⁻¹ pH 8,0 e centrifugados por 30 minutos a 10.000 x g, a 4°C. A fração sobrenadante foi coletada e armazenada em freezer -80°C para a posterior análise da atividade enzimática.

Análise da GST

A atividade da GST foi analisada por método espectrofotométrico adaptado de Keen, Habig e Jakoby (1976). Nas cubetas foram adicionados o tampão fosfato de potássio 0,2 M, pH 6,5 (977,5 µL), o

CDNB (100 mM de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) (10 μ L) e a GSH (100 mM de glutathiona reduzida) (10 μ L), sendo por fim, adicionada a amostra. A atividade enzimática foi avaliada a 30°C, sendo o aumento da absorbância acompanhado durante um minuto a 340 nm e os dados expressos em U mg^{-1} de proteína.

Análise da AChE

Para a análise de AChE foi utilizado o espectrofotômetro de feixe duplo, seguindo a metodologia descrita por Ellman et al. (1961), medindo-se a formação do produto tiólico produzido pela ação da enzima sobre o substrato (acetilcolina), que reage com o ditionitrobenzeno (DTNB). O resultado desta reação forma um composto amarelado que é monitorado em 412 nm, a 25°C, durante um minuto e os dados são expressos em U mg^{-1} de proteína.

Quantificação de proteína

A quantificação de proteína foi realizada utilizando-se o método de Bradford (1976). O reagente de Bradford contém Coomassie Brilliant Blue G-250 em solução ácida e este ao se ligar às proteínas tem sua absorbância alterada de 465 nm para 595 nm. Com esta alteração ocorre uma mudança na coloração do reagente, de castanho para diferentes tons de azul, de acordo com a concentração de proteína presente. A absorbância é determinada por espectrofotometria em 595 nm. Esta quantificação foi utilizada apenas para os cálculos das atividades específicas de cada enzima.

Todos os procedimentos foram feitos com os tubos de ensaio e ependorfs inseridos em gelo para que não houvesse nenhuma modificação química das soluções.

*Protocolo experimental com a espécie *Hypsiboas pardalis**

O bioensaio de exposição crônica teve duração de 23 dias, onde larvas da espécie *H. pardalis* foram submetidas a uma concentração de cada um dos cinco compostos (glifosato, ametrina, 2,4-D, metribuzim e acetocloro) (Tabela 6) e a um controle de água. Para este bioensaio foi priorizado aumentar o número de compostos a serem analisados, sendo quatro deles (glifosato, ametrina, metribuzim e acetocloro) também utilizados nos bioensaios de exposição aguda. Em contrapartida foi reduzido o número de concentrações,

testando assim a máxima concentração recomendada para uso. Cada um dos tratamentos contendo os ingredientes ativos foi replicado quatro vezes e o controle oito vezes.

Tabela 6. Sumário do experimento de exposição crônica realizado com larvas da espécie *Hypsiboas pardalis*.

Número do teste	Data	Organismo	Matriz	Concentrações utilizadas	Nº desovas utilizadas
teste 1	12/10/2012	<i>H. pardalis</i>	Água c/ 2,4-D	1,21 mg.L ⁻¹	4
teste 1	12/10/2012	<i>H. pardalis</i>	Água c/ metribuzin	1,92 mg.L ⁻¹	4
teste 1	12/10/2012	<i>H. pardalis</i>	Água c/ glifosato	2,4 mg.L ⁻¹	4
teste 1	12/10/2012	<i>H. pardalis</i>	Água c/ acetocloro	3,34 mg.L ⁻¹	4
teste 1	12/10/2012	<i>H. pardalis</i>	Água c/ ametrina	4 mg.L ⁻¹	4

Os embriões e larvas utilizados no experimento foram obtidos de quatro desovas da espécie, coletadas na Estação Biológica de Boracéia, de modo a incorporar certa diversidade genotípica na avaliação da sensibilidade aos agroquímicos. As desovas foram transportadas logo após a coleta para o laboratório em recipientes de plástico e depois mantidas em tanques de 50L até a sua eclosão. Após a eclosão as larvas foram separadas e colocadas em outros três novos tanques, para que houvesse uma maior área/indivíduo. Foram alimentadas com uma mistura 3:1 de ração de coelho (Purina Mills, LLC, USA; ~16% proteína) e ração para peixe TetraMin (~45% proteína) e 2/3 da água de cultura foi trocada a cada dois dias. Durante o experimento os indivíduos foram alimentados diariamente com uma dose da mistura de ração equivalente a 16% da massa média individual (SCHIESARI, 2004), obtida de 30 indivíduos retirados aleatoriamente da cultura no início do experimento.

Para a montagem do experimento, as larvas foram colocadas juntas em um mesmo recipiente para utilizarmos aleatoriamente indivíduos provenientes das quatro desovas, sendo selecionados os indivíduos com aproximadamente a mesma massa corporal (massa média de 30 indivíduos igual a 23,5mg) e estágio de desenvolvimento (aproximadamente estágio 26; GOSNER, 1960), com a finalidade de reduzir a variabilidade dos parâmetros medidos e posteriormente fortalecer a interpretação dos resultados. Apenas indivíduos aparentemente saudáveis, ou seja, com movimentos natatórios normais, com capacidade de se movimentar ao longo da coluna d'água e sem nenhuma deformidade e/ou lesão aparente, foram utilizados nos experimentos. Estes foram colocados de cinco em cinco em copos plásticos com água de diluição e

depois juntados aleatoriamente em 10 girinos/copo. Foram aleatorizados novamente grupos de três copos, totalizando 30 girinos/tratamento.

Os recipientes-teste experimentais foram aquários de vidro de capacidade de 40 litros, contendo 30 litros de solução e 30 girinos da espécie. A temperatura no laboratório foi mantida constante à 25°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) e uma vez por semana as soluções foram trocadas e renovadas. Nesta troca os girinos foram mantidos em copos de plástico com a solução do próprio tratamento, e assim os aquários foram lavados com água filtrada corrente. Após o acréscimo dos 30L de solução de cada tratamento, os girinos foram colocados novamente ao seu respectivo aquário.

A cada 48 horas de experimento foram feitas contagens de sobrevivência dos indivíduos. Foi contabilizado também o número de indivíduos que estavam em atividade em cada aquário, no período da manhã e da tarde (aleatoriamente), totalizando 20 registros. Para a obtenção destes dados foi estabelecido como indivíduos ativos, àqueles que apresentavam movimento de comportamento, seja este natatório ou de alimentação, contabilizados em um instante de observação ao longo da área do aquário (SCHIESARI, 2004).

No início do experimento, duas vezes por semana, principalmente antes da troca das soluções, e completados os 23 dias, foram analisadas as condições físico-químicas da água (pH, temperatura, condutividade e oxigênio dissolvido). Em função da baixa oxigenação da água, foi instalado no sexto dia de experimento um compressor de ar para cada grupo de quatro aquários, sendo vistoriada a vazão de ar todos os dias para que não houvesse diferenças entre os tratamentos. A mortalidade antes e após a instalação dos compressores foi analisada estatisticamente e não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os dados, portanto a mortalidade inicial não ocorreu devido à baixa oxigenação da água. Toda vidraria utilizada na manipulação dos compostos e experimento foi devidamente lavada com Extran 3% e depois com ácido nítrico 10%, secada em estufa e armazenada em armários fechados.

Ao término do experimento, os indivíduos foram retirados das soluções, pesados individualmente (massa úmida) e classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento (GOSNER, 1960). Os 10 primeiros indivíduos de cada aquário foram congelados em freezer -80°C em embalagens de alumínio, para

posterior análise de biomarcadores de exposição, seguindo os mesmos procedimentos efetuados para o teste com *H. faber*. Os outros 20 indivíduos de cada tratamento foram preservados em solução de formalina como testemunho e para análise morfológica.

2.3 Forma de análise dos resultados

Experimento de exposição aguda. A variável de resposta foi a mortalidade (% de indivíduos mortos) em cada tratamento. A partir destes dados foi calculada a variável padrão CL50 “concentração com efeito letal em 50% dos indivíduos utilizados”, através do programa estatístico PROBIT 1.5 (EPA, 2002) ou TSK 1.5 (HAMILTON *et al.*, 1977), seguindo o fluxograma da EPA (2002; Figura 6) para escolha dos testes estatísticos. As concentrações de efeito CENO (maior concentração de efeito não observado) e CEO (menor concentração de efeito observado) foram obtidas através do software TOXSTAT 3.5 (GULLEY & WEST Inc., 1996) e os testes estatísticos foram estabelecidos segundo o fluxograma da EPA (2002; Figura 7). Para testar diferenças de sensibilidade entre as espécies para um mesmo composto, os valores de CL50 obtidos foram comparados pelo teste Z através da fórmula proposta por EPA (1985). Os parâmetros físico-químicos foram analisados estatisticamente utilizando a média de cada réplica, por Análise de Variância (ANOVA) através do software SPSS 19, para testar se houve diferença significativa entre os tratamentos e o controle.

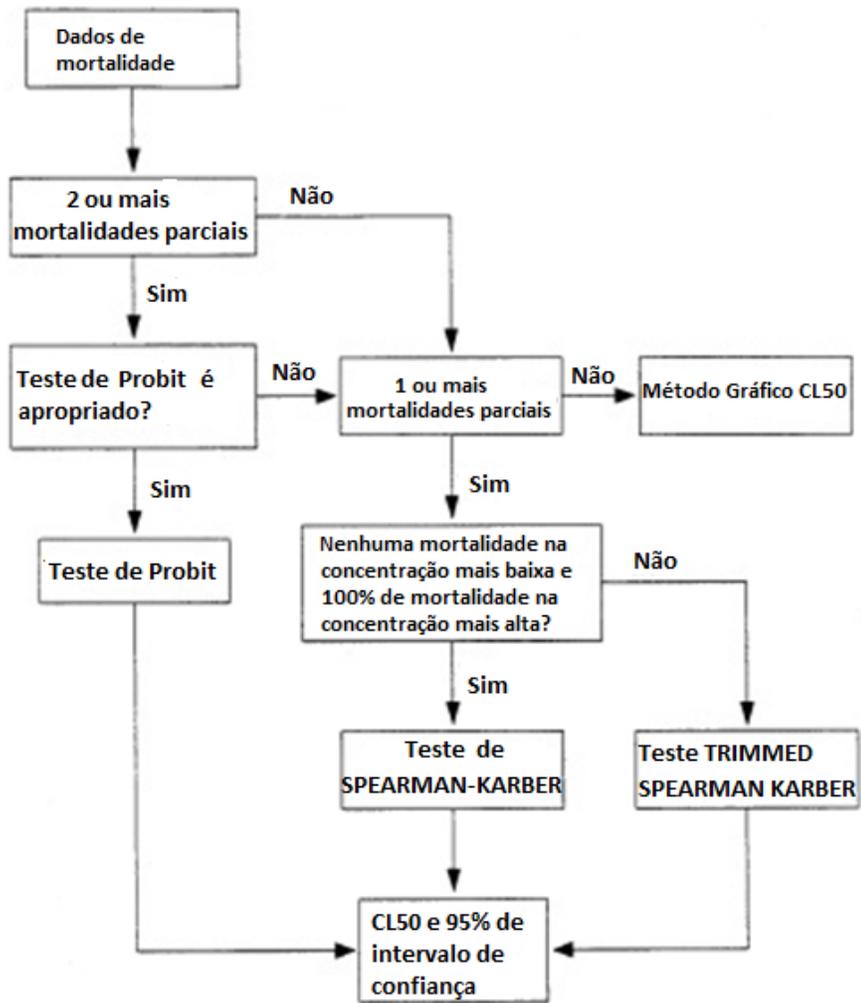


Figura 6. Fluxograma para determinação de CL50 em testes de exposição aguda com múltiplas concentrações (EPA, 2002).

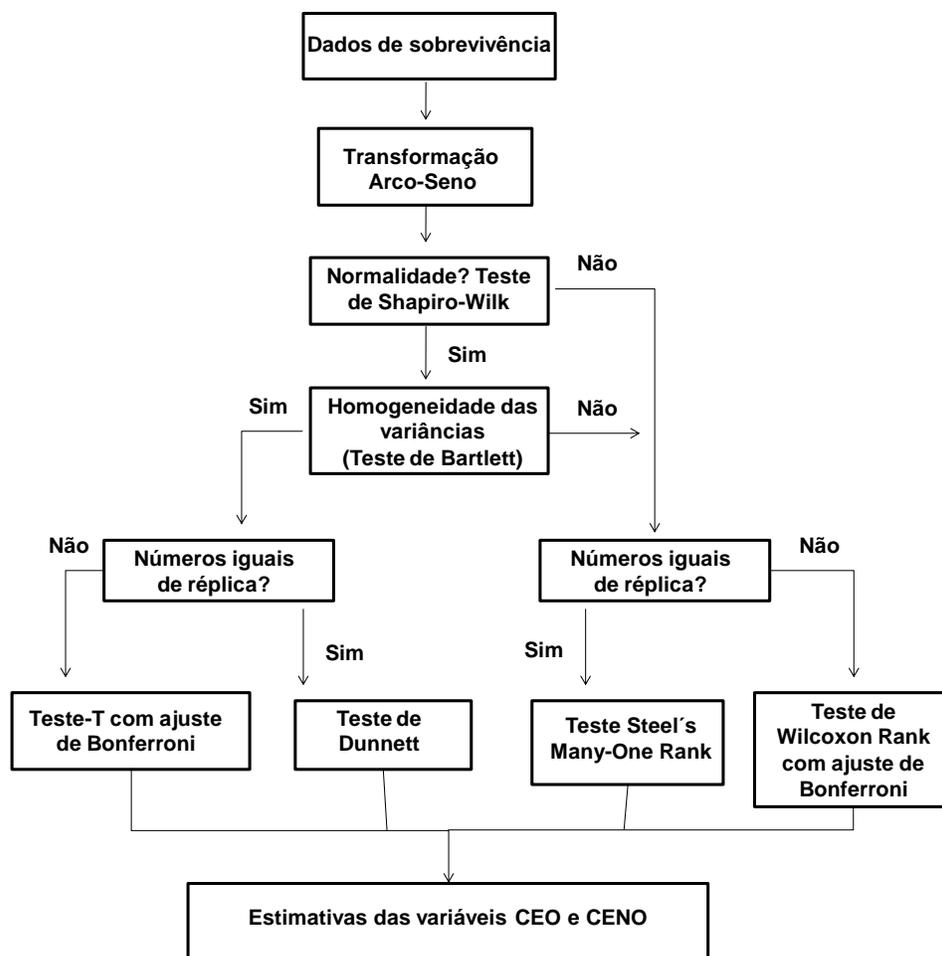


Figura 7. Fluxograma para análise estatística de dados de sobrevivência e determinação de CEO e CENO em testes de exposição aguda com múltiplas concentrações (EPA, 2002).

Experimento de exposição crônica. As variáveis de resposta para *H. faber* foram porcentagem de sobrevivência, estágio de desenvolvimento, massa viva, taxa de atividade, porcentagem de células leucocitárias e atividade enzimática. As variáveis de resposta para *H. pardalis* foram porcentagem de sobrevivência, estágio de desenvolvimento, massa viva, taxa de atividade e atividade enzimática.

Para a variável de resposta porcentagem de sobrevivência utilizou-se o software TOXSTAT 3.5 (WEST Inc. & GULLEY, 1996) e para todas as outras variáveis (de efeito subletal), exceto estágio de desenvolvimento, foi conduzida uma ANOVA pelo software SPSS 19, para testar o efeito das concentrações de cada composto sobre as variáveis dependentes citadas acima. Caso o resultado fosse significativo, um teste a posteriori foi realizado para detectar a diferença significativa presente. A escolha dos testes

estatísticos foi feita segundo o fluxograma da EPA (2008; Figura 8). Para a análise do estágio de desenvolvimento foi conduzido um teste de chi-quadrado, por se tratar de uma variável ordinal, pelo software SPSS 19, para testar o efeito das concentrações de cada composto sobre o crescimento das larvas.

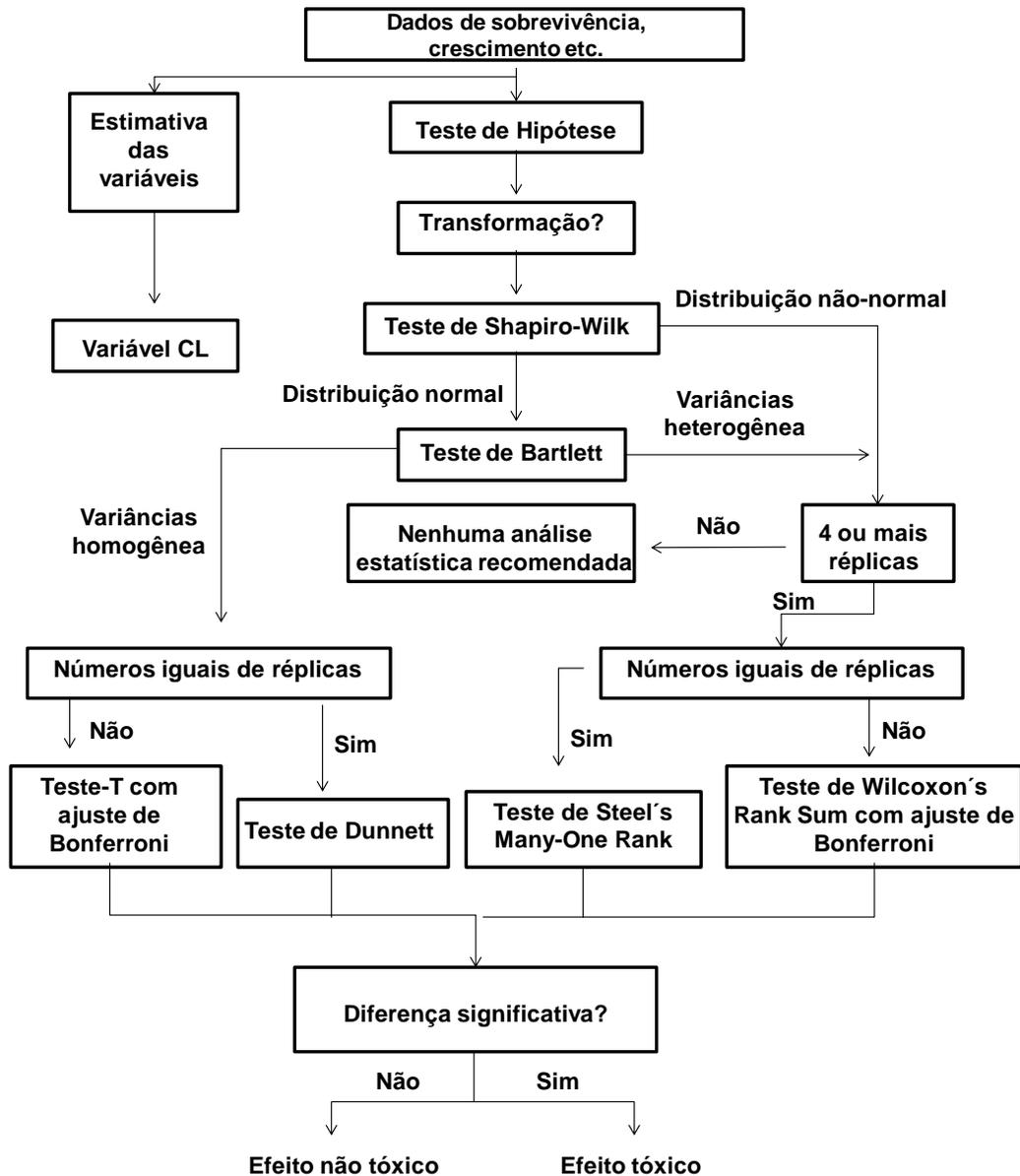


Figura 8. Fluxograma para análise estatística de dados obtidos em testes de exposição crônica com múltiplas concentrações (adaptado de EPA, 2008).

3. Resultados

3.1 Experimento de exposição aguda

Glifosato

O composto glifosato apresentou efeito significativo sobre a mortalidade das larvas de *Physalaemus cuvieri* e de *Hypsiboas pardalis* após 96h de exposição. A mortalidade sobre *P. cuvieri* foi inicialmente baixa nas duas menores concentrações (0% e 8%), seguido de um aumento de 38% na terceira, para 80% e 100% nas duas concentrações mais altas. Para *H. pardalis* a mortalidade foi 15% maior que *P. cuvieri* logo na segunda concentração mais baixa, seguido de um aumento de 43% na terceira e 100% de mortalidade dos indivíduos nas duas concentrações mais altas (Figura 9). Os valores de CEO e CENO de *H. pardalis* foram menores que de *P. cuvieri* (Tabela 7), sendo que a mesma concentração de 97,1mg/L de glifosato que causou uma mortalidade significativa para *H. pardalis*, foi a maior concentração sem efeito observado para *P. cuvieri*. Além disso, a CL50 de *H. pardalis* (CL50=106,19 mg/L) foi significativamente mais baixa que a de *P. cuvieri* (CL50=115,15 mg/L) (Teste Z: Z=1,08 e H=1,00; Z>H). Portanto, *H. pardalis* se mostrou significativamente mais sensível ao glifosato que *P. cuvieri*.

Tabela 7. CL50s (Concentração Letal Mediana) e respectivos intervalos de confiança de 95% (entre parênteses), CEOs (Concentração de Efeito Observado) e CENOs (Concentração de Efeito Não Observado) de cada composto manipulado em experimentos de 96h de exposição com *Physalaemus cuvieri* e *Hypsiboas pardalis*. Todos os dados estão expressos em mg/L. Não foi possível calcular a CL50 e CENO de ametrina para *H. pardalis*, pois houve mortalidade acima de 90% na menor concentração manipulada (NC:não calculável).

Compostos	<i>P. cuvieri</i>			<i>H. pardalis</i>		
	CL50	CEO	CENO	CL50	CEO	CENO
Glifosato	115,2 (111,6 a 118,8)*	112,3 ⁱ	97,1 ⁱ	106,2 (103,2 a 109,2)*	97,1 ⁱ	84 ⁱ
Ametrina	14,6 (13,6 a 15,7)*	12,6 ⁱⁱ	10 ⁱⁱ	NC (<10)	10 ⁱ	NC
Metribuzim	85,1 (79,3 a 91,3)**	75 ⁱⁱ	46,6 ⁱⁱ	67,9 (62,6 a 73,8)*	75 ⁱ	46,6 ⁱ
Acetocloro	4,4 (4,1 a 4,7)**	6,5 ⁱ	3,5 ⁱ	7,8 (7,2 a 8,4)**	12 ⁱ	6,5 ⁱ

*Teste PROBIT

**Teste de Trimmed Spearman-Kärber

ⁱ Teste de Steel Many One Rank

ⁱⁱ Teste de Dunnett

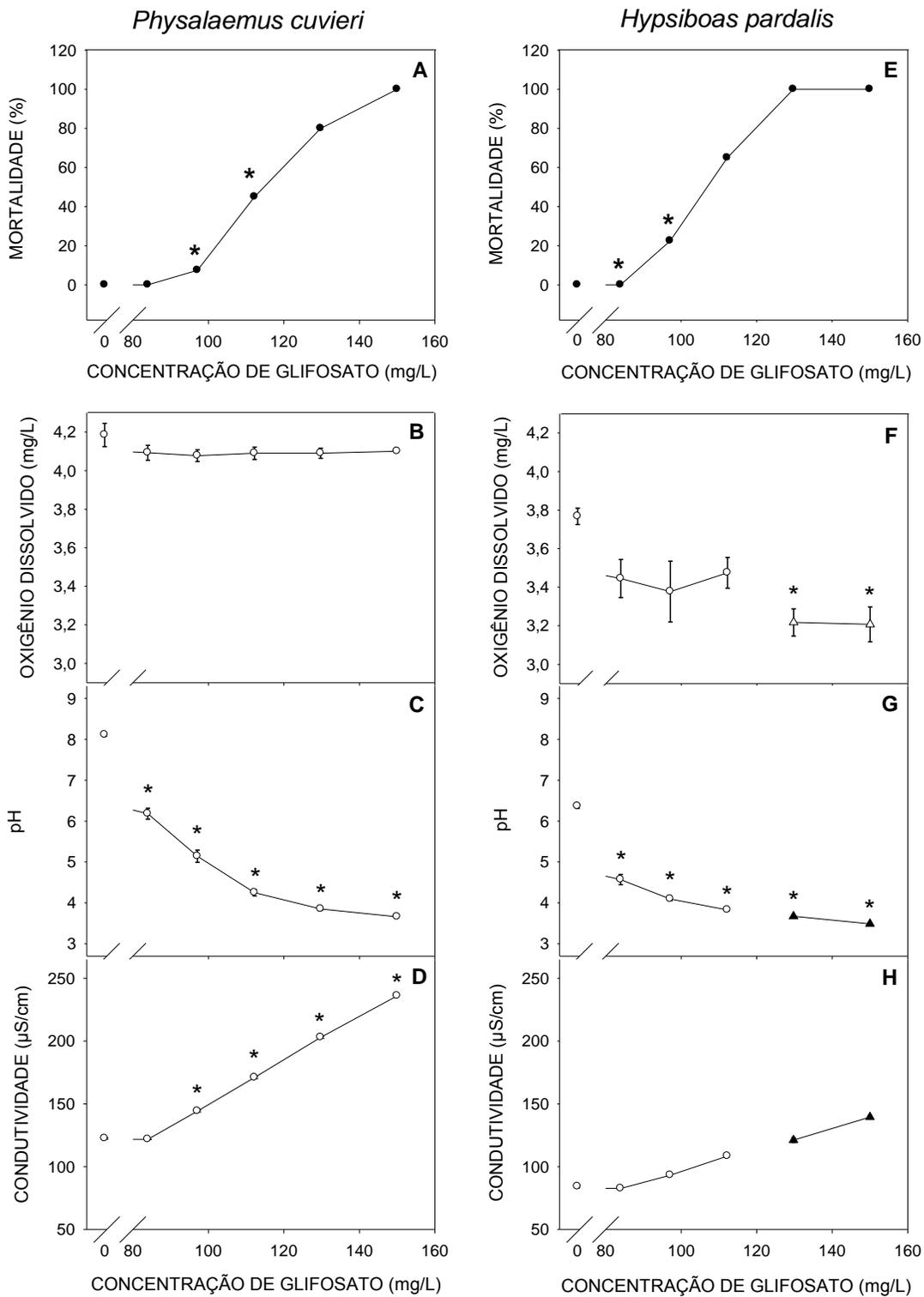


Figura 9. Mortalidade de *Physalaemus cuvieri* (A) e *Hypsiboas pardalis* (E) em exposição aguda de 96h ao glifosato. Propriedades físico-químicas medidas ao longo de cada experimento incluem oxigênio dissolvido (B,F), pH (C,G) e condutividade (D,H). Símbolos representam a média \pm 1 erro padrão de quatro réplicas. Para os casos em que propriedades físico-químicas não puderam ser tomadas em 96h de exposição (○) por conta de mortalidade completa dos girinos, são mostrados valores obtidos após 0h (▲) ou 24h (△). *indica diferença significativa ($p < 0,05$) relativa ao controle.

O glifosato também influenciou as propriedades físico-químicas da água dos experimentos. Para ambos os experimentos, os valores de pH no controle mantiveram-se dentro do esperado (6,5 a 9), segundo o guia FETAX (ASTM, 2004), porém esses valores apresentaram um declínio gradual com o aumento das concentrações de glifosato, com diferença significativa em relação ao controle, o que tornou o meio mais ácido. Os valores da condutividade da água aumentaram com a concentração de glifosato nos dois experimentos, mas apenas no experimento com *P. cuvieri* esta relação foi positiva, com um aumento até duas vezes em relação ao controle (Figura 9). No experimento com *P. cuvieri* o oxigênio dissolvido não apresentou variação significativa entre os tratamentos e o controle, diferentemente do experimento com *H. pardalis* que teve os valores mais baixos (3,2 mg/L) e significativos nas duas concentrações mais altas manipuladas em apenas 24h (Figura 9), valores estes que se encontram ligeiramente abaixo do esperado para cultivo de peixes (4mg/L; KUBITZA, 2003). A temperatura se manteve na faixa de 23°C em todos os tratamentos do experimento com *P. cuvieri*, mas o mesmo não ocorreu com o experimento com *H. pardalis*, que apresentou uma diferença de temperatura significativa nas duas concentrações mais altas de glifosato ($\pm 23^{\circ}\text{C}$) em relação ao controle ($\pm 21^{\circ}\text{C}$) (dados não apresentados na Figura 9), porém esses valores estão dentro do recomendado ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$).

Ametrina

O composto ametrina apresentou efeito na mortalidade das larvas de *P. cuvieri*, caracterizado por uma baixa mortalidade na concentração mais baixa (15%), seguido de um aumento de 18% na segunda, 25% na terceira para 22% e 15% nas duas concentrações mais altas. Já para as larvas de *H. pardalis*, o efeito sobre a mortalidade foi significativo em todas as concentrações manipuladas, com mortalidade acima de 90% na concentração mais baixa manipulada (Figura 10). Desta forma, não se obteve a maior concentração sem efeito observado (CENO) e não foi possível calcular a concentração letal a 50% dos indivíduos desta espécie (CL50). Portanto, pode-se dizer que *H. pardalis* se mostrou mais sensível à ametrina que *P. cuvieri* (CL50=14,6mg/L).

As propriedades físico-químicas da água dos experimentos também foram influenciadas pela ametrina. Para ambos os experimentos, os valores de oxigênio dissolvido foram significativos em todas as concentrações, sendo que no experimento com *H. pardalis* a diferença foi até três vezes menor em relação

ao controle (Figura 10). A condutividade da água se manteve praticamente constante com o aumento das concentrações em ambos os experimentos, mas foram significativamente diferentes em relação ao controle. Da mesma forma, também foram significativos os valores de pH em cada um dos tratamentos relativo ao controle do experimento com *P. cuvieri*, com valores mais baixos (\pm pH 6,5) que o registrado no controle (\pm pH 8), porém estão dentro do recomendado pelo guia FETAX (ASTM, 2004). O controle do experimento com *H. pardalis* apresentou valores de pH abaixo do observado no experimento com *P. cuvieri* (Figura 10) e com diferença significativa nas três primeiras concentrações, apresentando valores bem abaixo do recomendado. A temperatura no experimento com *P. cuvieri* variou de 23,2°C no controle a 23,7°C na maior concentração e o mesmo ocorreu com o experimento com *H. pardalis* com uma diferença de um grau (21,5°C a 22,2°C) (dados não apresentados na Figura 10).

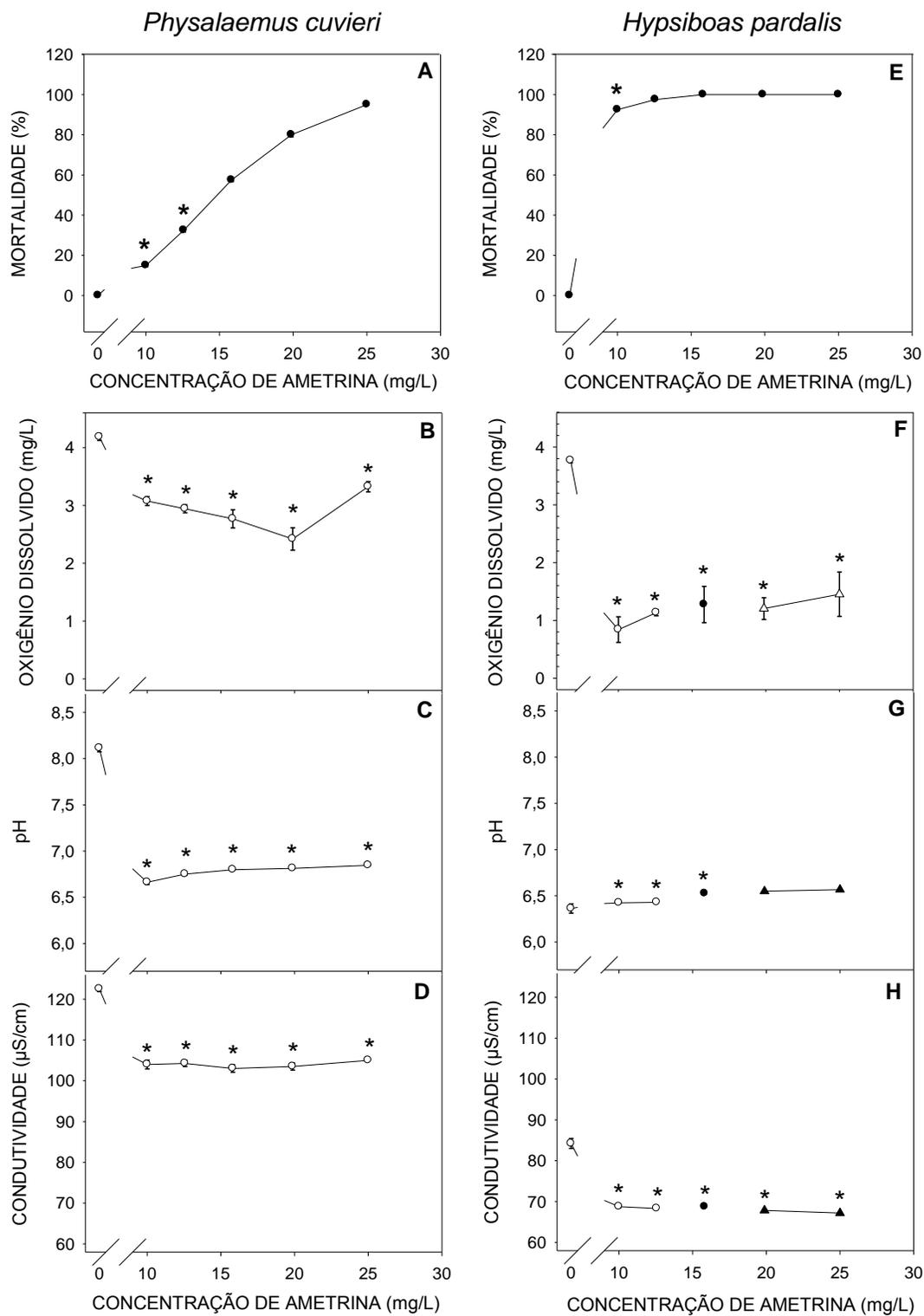


Figura 10. Mortalidade de *Physalaemus cuvieri* (A) e *Hypsiboas pardalis* (E) em exposição aguda de 96h à ametrina. Propriedades físico-químicas medidas ao longo de cada experimento incluem oxigênio dissolvido (B,F), pH (C,G) e condutividade (D,H). Símbolos representam a média \pm 1 erro padrão de quatro réplicas. Para os casos em que propriedades físico-químicas não puderam ser tomadas em 96h de exposição (○) por conta de mortalidade completa dos girinos, são mostrados valores obtidos após 0h (▲), 24h (△) ou 48h (●). *indica diferença significativa ($p < 0,05$) relativa ao controle.

Metribuzim

O composto metribuzim apresentou um efeito limiar na mortalidade dos indivíduos da espécie *P. cuvieri*, caracterizado por uma baixa mortalidade nas duas concentrações mais baixas (3% e 0%), seguido de um aumento de 25% na terceira para 97% e 100% nas duas concentrações mais altas. De forma similar, o efeito letal sobre a espécie *H. pardalis* foi de 0% e 8% de mortalidade nas duas concentrações mais baixas, seguido de um aumento de 55% na terceira concentração e 100% de mortalidade dos indivíduos nas duas concentrações mais altas (Figura 11). Mesmo as duas espécies apresentando valores de CEO e CENO iguais (Tabela 7), a CL50 de *H. pardalis* (CL50=67,94 mg/L) foi significativamente mais baixa que *P. cuvieri* (CL50=85,11 mg/L) (Teste Z: $Z = 1,25$, $H = 1,00$). Portanto, *H. pardalis* se mostrou mais sensível ao metribuzim que *P. cuvieri*.

O metribuzim também influenciou as propriedades físico-químicas da água dos experimentos. Em ambos os experimentos, houve variação significativa no oxigênio dissolvido em todos os tratamentos, além de ser caracterizada por uma diminuição com o aumento das concentrações de metribuzim, estando abaixo do recomendado. O pH foi menor nos tratamentos quando comparado ao controle nos dois experimentos, e variou pouco (5,68 a 6,19) com o aumento das concentrações no experimento com *H. pardalis* (Figura 11), ficando pouco abaixo do valor de referência de 6,5. Os valores de condutividade foram mais altos (122 a 103,75 $\mu\text{s/cm}$) no controle e tratamentos do experimento com *P. cuvieri* quando comparados ao experimento com *H. pardalis* (84,23 a 68,45 $\mu\text{s/cm}$), e em ambos foram significativos os valores. Entre os tratamentos não houve grande variação, como pode-se observar na figura 11. A temperatura pouco variou entre os tratamentos e o controle nos experimentos com *P. cuvieri* e com *H. pardalis* (23,2 a 23,9°C e 21,5 a 22,8°C, respectivamente) (dados não apresentados na Figura 11).

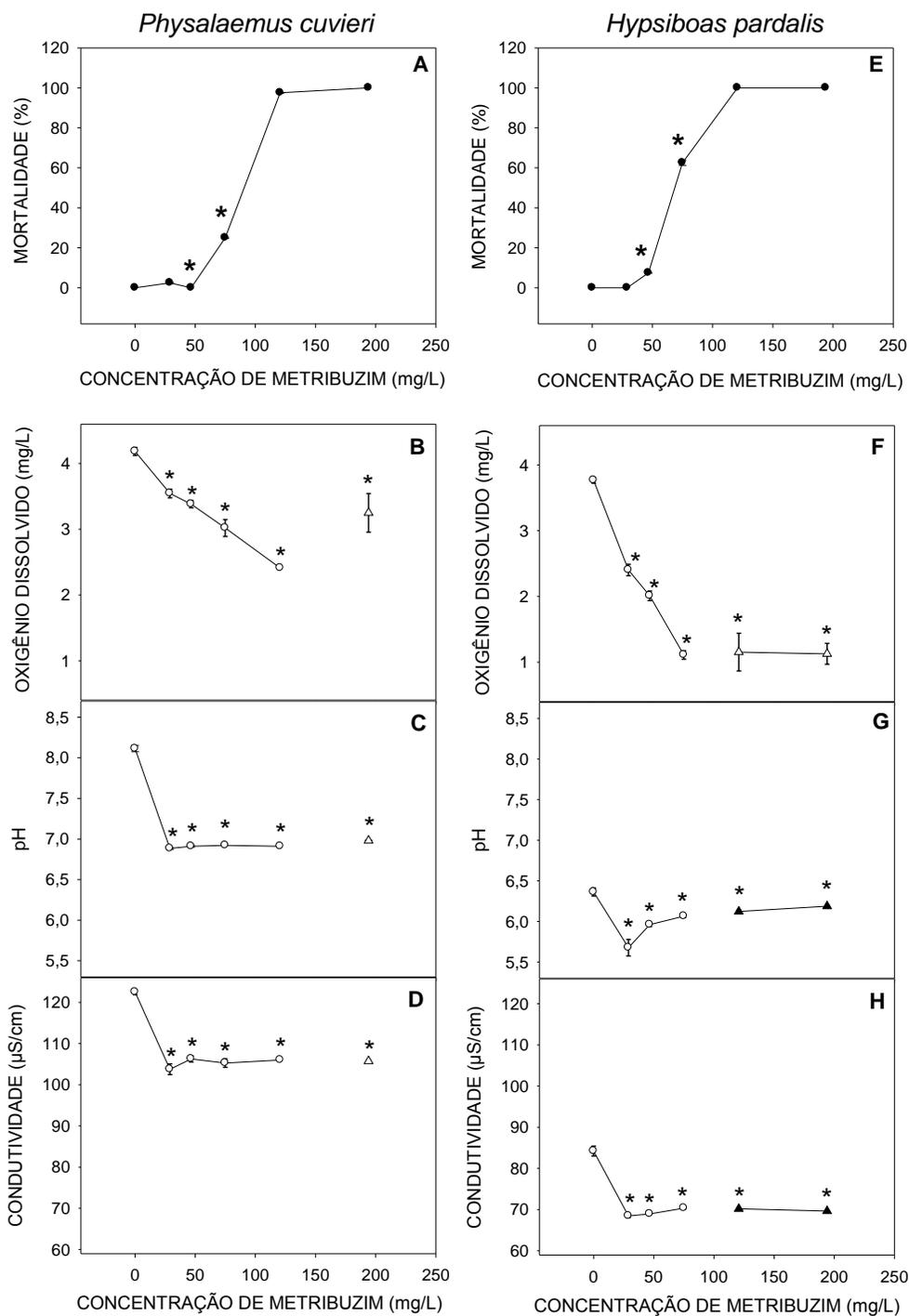


Figura 11. Mortalidade de *Physalaemus cuvieri* (A) e *Hypsiboas pardalis* (E) em exposição aguda de 96h ao metribuzim. Propriedades físico-químicas medidas ao longo de cada experimento incluem oxigênio dissolvido (B,F), pH (C,G) e condutividade (D,H). Símbolos representam a média \pm 1 erro padrão de quatro réplicas. Para os casos em que propriedades físico-químicas não puderam ser tomadas em 96h de exposição (○) por conta de mortalidade completa dos girinos, são mostrados valores obtidos após 0h (▲) ou 24h (△). *indica diferença significativa ($p < 0,05$) relativa ao controle.

Acetocloro

O acetocloro apresentou efeito similar ao do metribuzim sobre a mortalidade dos indivíduos de *P. cuvieri*, com baixa mortalidade nas duas menores concentrações e 100% de mortalidade nas duas concentrações mais altas (Figura 12). O mesmo não ocorreu para as larvas de *H. pardalis* que apresentaram 20% de mortalidade na quarta concentração, contra 100% dos indivíduos de *P. cuvieri* na mesma concentração. Esta diferença pode ser observada também pelos valores de CEO e CENO. A menor concentração de efeito observado para *P. cuvieri* (CEO=6,5mg/L), foi o mesmo valor da maior concentração sem efeito observado para *H. pardalis*. Com isso, pode-se dizer que apenas para este composto, *P. cuvieri* se mostrou significativamente mais sensível (CL50=4,4mg/L) ao acetocloro que *H. pardalis* (CL50=7,8mg/L) (Teste Z: $Z = 1,77$, $H = 1,00$).

Assim como os outros compostos, o acetocloro também influenciou as propriedades físico-químicas da água. O oxigênio dissolvido apresentou uma maior variação de amplitude no experimento com *H. pardalis*, onde os valores diminuíram com o aumento da concentração, exceto na concentração mais alta que teve o oxigênio dissolvido mais elevado que os outros tratamentos. A variação deste parâmetro no experimento com *P. cuvieri* foi de aproximadamente 1 mg/L, mas apresentou a mesma característica de diminuição com o aumento da concentração de acetocloro. Em ambos os experimentos os valores de oxigênio dissolvido nos tratamentos foi menor que recomendado (4 mg/L). O controle do experimento com *P. cuvieri* apresentou pH 8, e os valores de pH registrado nos tratamentos foram duas vezes mais baixos, ligeiramente abaixo do recomendado (pH 6,5 a 9). Já no experimento com *H. pardalis*, o controle apresentou pH 6,5 e não variou muito nos outros tratamentos (Figura 12). Em ambos os experimentos foram significativos os valores de pH. A condutividade também foi mais alta no experimento com *P. cuvieri* do que no experimento com *H. pardalis* (122,50µs/cm e 84,23µs/cm no controle, respectivamente). Apesar da variação entre os tratamentos ter sido mais pronunciada no experimento com *P. cuvieri* (103,50 a 87µs/cm), em ambos os experimentos foi significativa a variação da condutividade. A temperatura no experimento com *P. cuvieri* se manteve na casa dos 23°C (23,2 a 23,6°C) e no experimento com *H. pardalis* variou de 21,5 a 22°C (dados não apresentados na Figura 12), valores pouco abaixo do recomendado (25°C ±2°C).

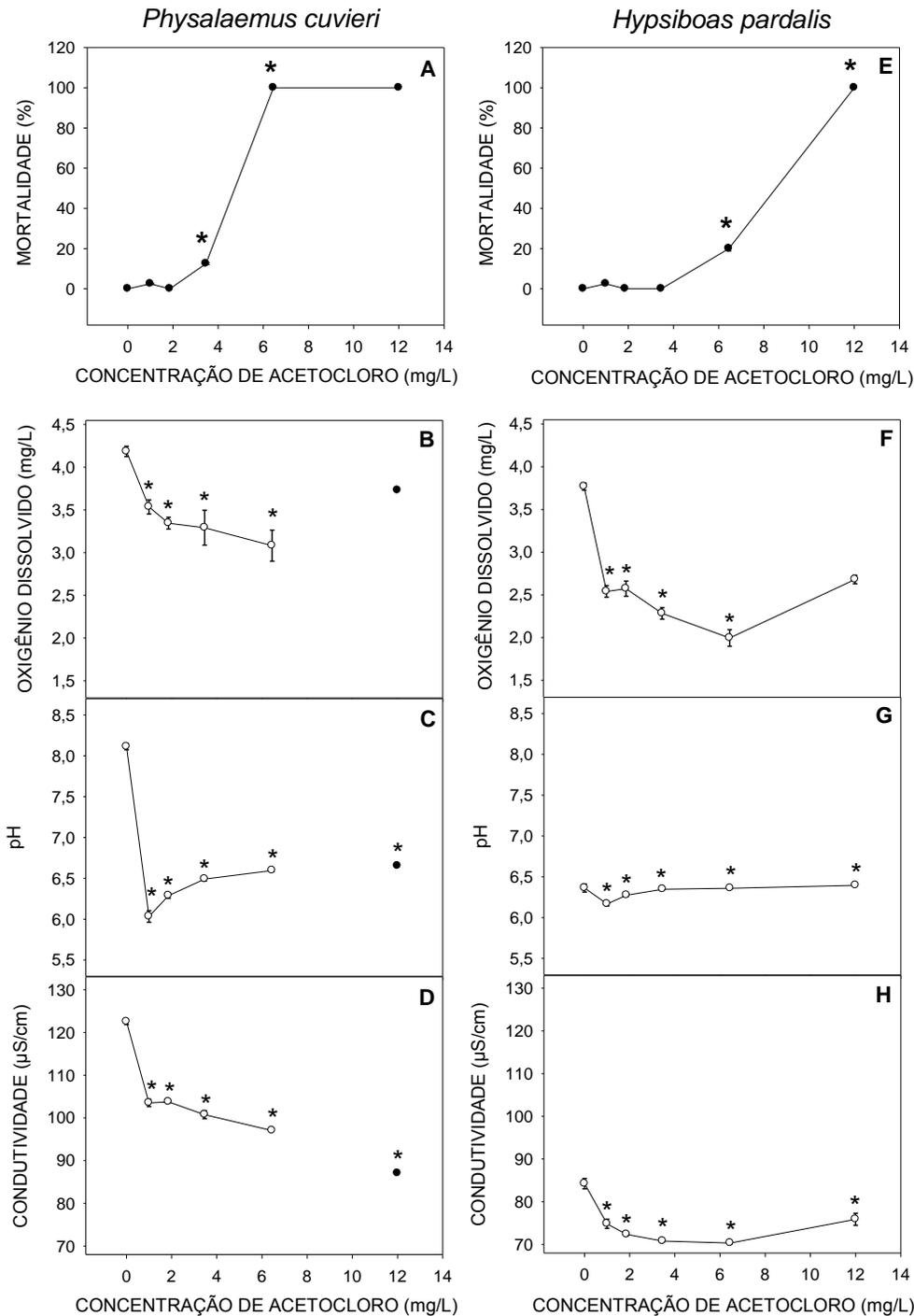


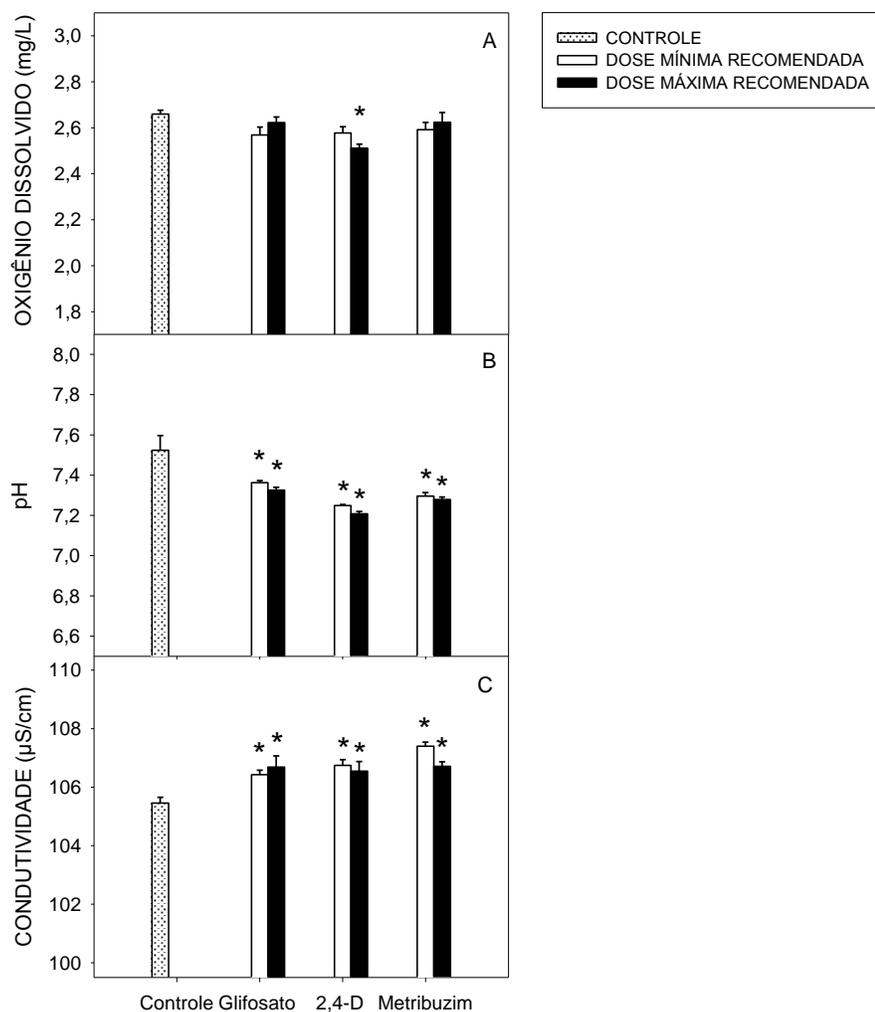
Figura 12. Mortalidade de *Physalaemus cuvieri* (A) e *Hypsiboas pardalis* (E) em exposição aguda de 96h ao acetochloro. Propriedades físico-químicas medidas ao longo de cada experimento incluem oxigênio dissolvido (B,F), pH (C,G) e condutividade (D,H). Símbolos representam a média \pm 1 erro padrão de quatro réplicas. Para os casos em que propriedades físico-químicas não puderam ser tomadas em 96h de exposição (\circ) por conta de mortalidade completa dos girinos, são mostrados valores obtidos após 0h (\blacktriangle) ou 48h (\bullet). *indica diferença significativa ($p < 0,05$) relativa ao controle.

3.2 Experimento de exposição crônica

3.2.1 Experimento com larvas de *Hypsiboas faber*

Parâmetros físico-químicos

A manipulação de ingredientes ativos de pesticidas influenciou as propriedades físico-químicas da água do experimento. A concentração de oxigênio dissolvido variou apenas 0,1 mg/L entre os tratamentos (2,6 mg/L) e o controle (2,7 mg/L), mas houve diferença significativa para a maior concentração de 2,4-D (2,5 mg/L; Figura 13), estando 1,5 mg/L abaixo do recomendado. Todos os tratamentos levaram a uma diminuição no pH e um aumento na condutividade da água do experimento (Figura 13). Comparando-se as duas concentrações manipuladas de cada composto, os valores de pH estiveram ligeira, mas significativamente menores nas doses máximas recomendadas do que nas doses mínimas recomendadas para uso. Por outro lado, todos os tratamentos e o controle apresentaram valores dentro do esperado (pH 6,5 a 9). Já para a condutividade, houve um aumento dos valores com o aumento da dose de glifosato, mas uma diminuição para 2,4-D e metribuzim. A temperatura média no experimento foi de 23°C e não variou significativamente entre os tratamentos (dados não apresentados na Figura 13), estando dentro da variação esperada de 25°C ($\pm 2^\circ\text{C}$).



Mortalidade

Nenhuma das concentrações manipuladas causou efeito significativo sobre a mortalidade das larvas de *H. faber* (teste de Steel Many-One Rank: $p > 0,05$ para glifosato e metribuzim; teste de Dunnett: $p > 0,05$ para 2,4-D). No controle apenas 1,3% dos indivíduos morreram e para todos os tratamentos a mortalidade foi $< 2,7\%$ (Figura 14).

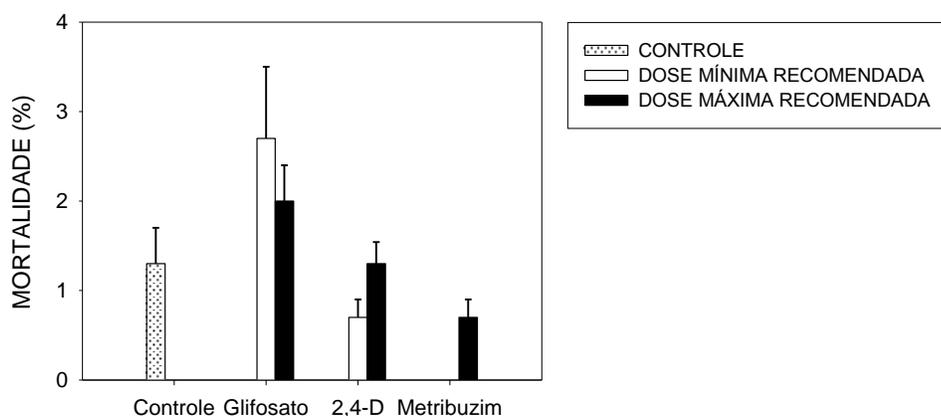


Figura 14. Mortalidade de *Hypsiboas faber* em exposição prolongada às doses mínimas e máximas recomendadas de glifosato (0,48 mg/L e 2,4 mg/L), 2,4-D (0,40 mg/L e 1,21 mg/L) e metribuzim (1,44 mg/L e 1,92 mg/L) no cultivo de cana-de-açúcar. Barras representam a média \pm 1 erro padrão de cinco réplicas. Note que a mortalidade observada ao longo de 23 dias de experimento foi inferior a 2,7%.

Massa e estágio de desenvolvimento

O crescimento de larvas de *Hypsiboas faber* não foi afetado significativamente pelos pesticidas manipulados, mesmo nas concentrações máximas recomendadas pelos fabricantes para culturas de cana-de-açúcar (teste de Steel Many-One Rank: $p > 0,05$ para todas as comparações entre tratamentos e controle; Figura 15).

Por sua vez, o desenvolvimento de larvas de *H. faber* foi significativamente reduzido pelo composto 2,4-D (teste de Chi-quadrado, $p = 0,000$), tanto para a concentração mínima recomendada (0,4 mg/L;

$p=0,004$) como para a concentração máxima recomendada (1,21mg; $p=0,000$). Houve uma redução significativa no desenvolvimento das larvas na maior concentração ($p= 0,014$) de glifosato. Já para o metribuzim o efeito significativo foi na menor concentração ($p= 0,016$).

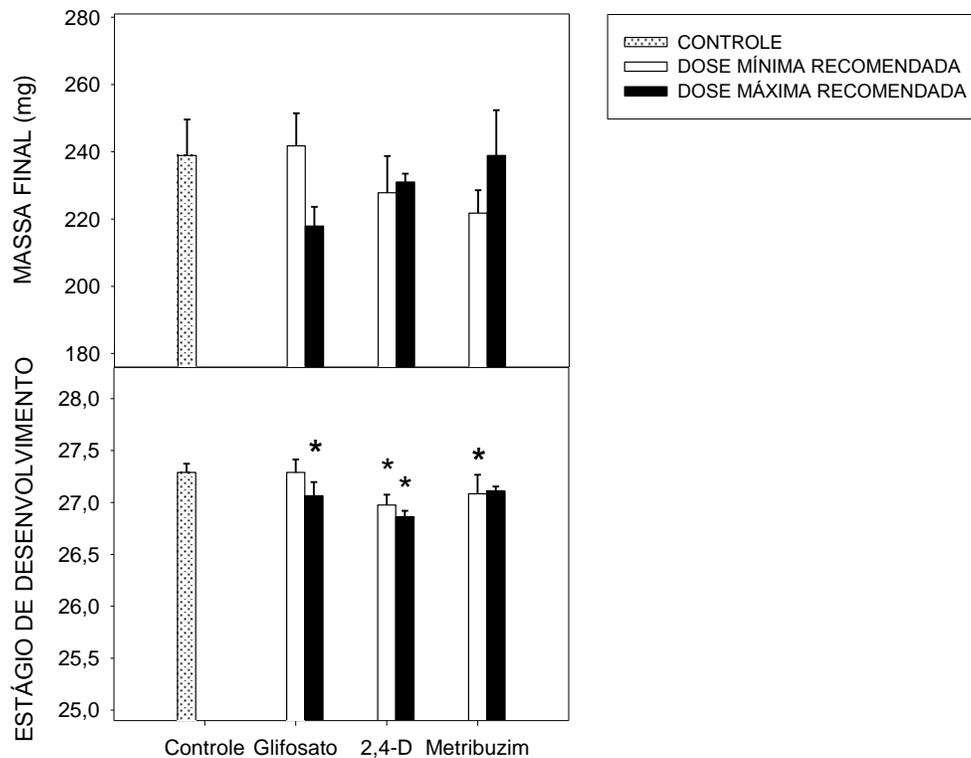


Figura 15. Massa final e estágio de desenvolvimento (Gosner, 1960) de *Hypsiboas faber* em exposição prolongada às doses mínimas e máximas recomendadas de glifosato (0,48 mg/L e 2,4 mg/L), 2,4-D (0,40 mg/L e 1,21 mg/L) e metribuzim (1,44 mg/L e 1,92 mg/L) no cultivo de cana-de-açúcar. Barras representam a média \pm 1 erro padrão de cinco réplicas. *indica diferença significativa ($p < 0,05$) relativa ao controle.

Análise de perfil leucocitário

A porcentagem média de leucócitos foi de 10,2% neutrófilos, 83,3% linfócitos, 2,2% eosinófilos, 1,2% basófilos, 3,2% monócito. A razão média neutrófilo/linfócito foi de 0,13.

Houve uma tendência à diminuição na porcentagem de neutrófilos e na razão neutrófilos/linfócitos do controle para o 2,4-D e do 2,4-D para o metribuzim. Também houve uma tendência para a diminuição na porcentagem de eosinófilos e basófilos do controle para os tratamentos (Figura 16). No entanto, não houve qualquer diferença significativa entre controle e tratamentos na porcentagem de cada tipo de célula ($p > 0,05$; Figura 16).

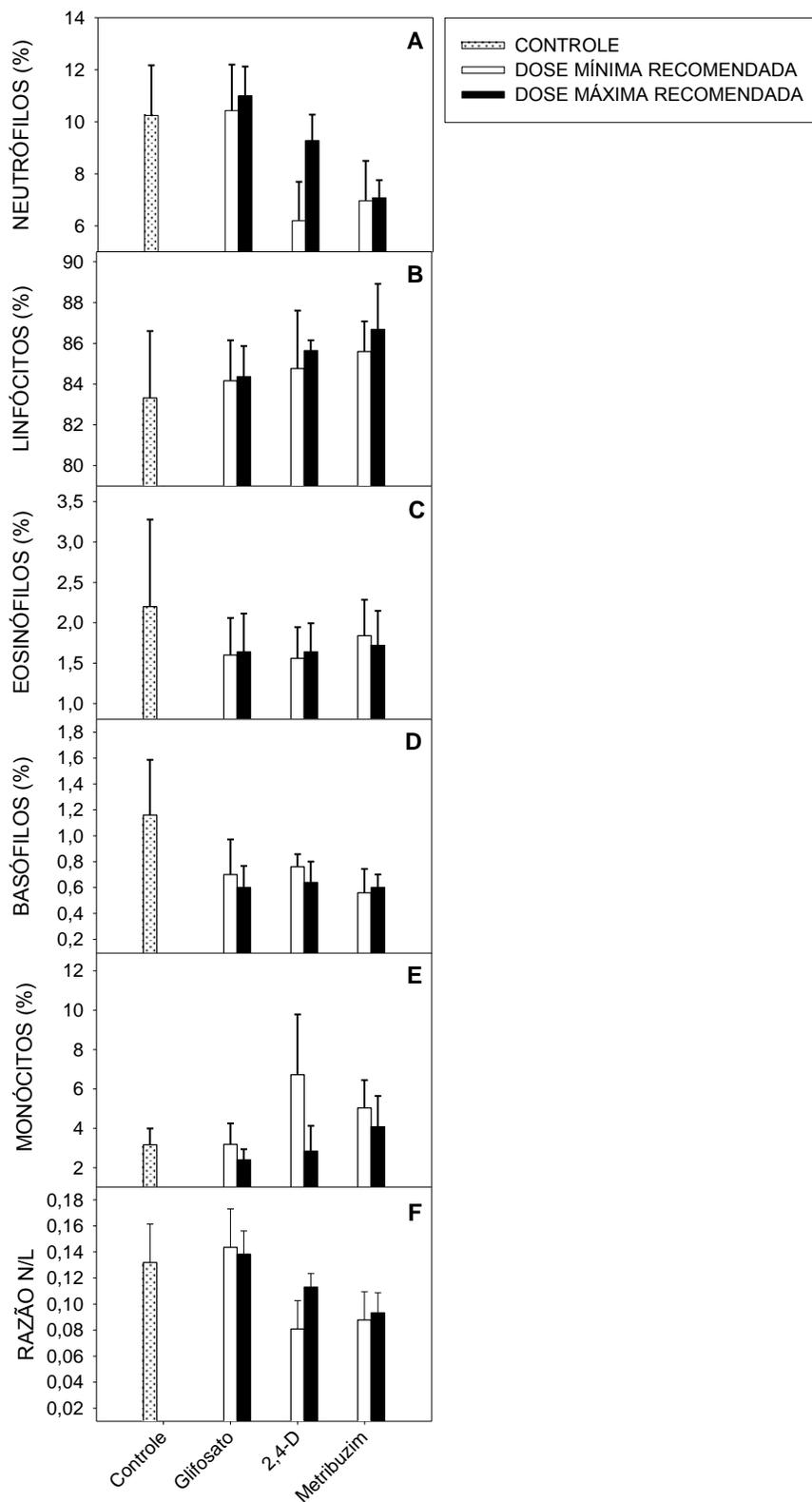


Figura 16. Porcentagem de **A.** neutrófilo **B.** linfócito **C.** eosinófilo **D.** basófilo **E.** monócito e razão neutrófilos/linfócitos (**F**) de *Hysiboas faber* em exposição prolongada às doses mínimas e máximas recomendadas de glifosato (0,48 mg/L e 2,4 mg/L), 2,4-D (0,40 mg/L e 1,21 mg/L) e metribuzim (1,44 mg/L e 1,92 mg/L) no cultivo de cana-de-açúcar. Barras representam a média \pm 1 erro padrão de cinco réplicas.

Atividade enzimática de AChE e GST

A atividade de AChE nas larvas de *H. faber* não foi significativamente afetada pela exposição ao glifosato e ao 2,4-D (ANOVA: $F = 0,372$, $p = 0,697$; $p > 0,05$, respectivamente). Por outro lado, o composto metribuzim na concentração 1,92mg/L foi capaz de inibir cerca de 1/3 a atividade desta enzima ($p < 0,05$; Figura 17).

Com relação à atividade de GST, no controle o valor médio foi de 0,111130 U/mg. Não houve diferença significativa entre a atividade de GST de *Hypsiboas faber* no controle quando comparada a qualquer um dos tratamentos experimentais (ANOVA: $F = 4,40$, $p = 0,039$ para glifosato; ANOVA: $F = 0,412$, $p = 0,671$ para 2,4-D; ANOVA: $F = 1,164$, $p = 0,345$ para metribuzim; Figura 17). No entanto, observou-se uma diferença significativa na atividade de GST entre as concentrações de glifosato (Teste de Tukey: $p = 0,045$): exposição à maior concentração de glifosato (2,4mg/L) levou a valores de atividade de GST pouco menores que a metade da exposição à menor concentração de glifosato (0,48mg/L).

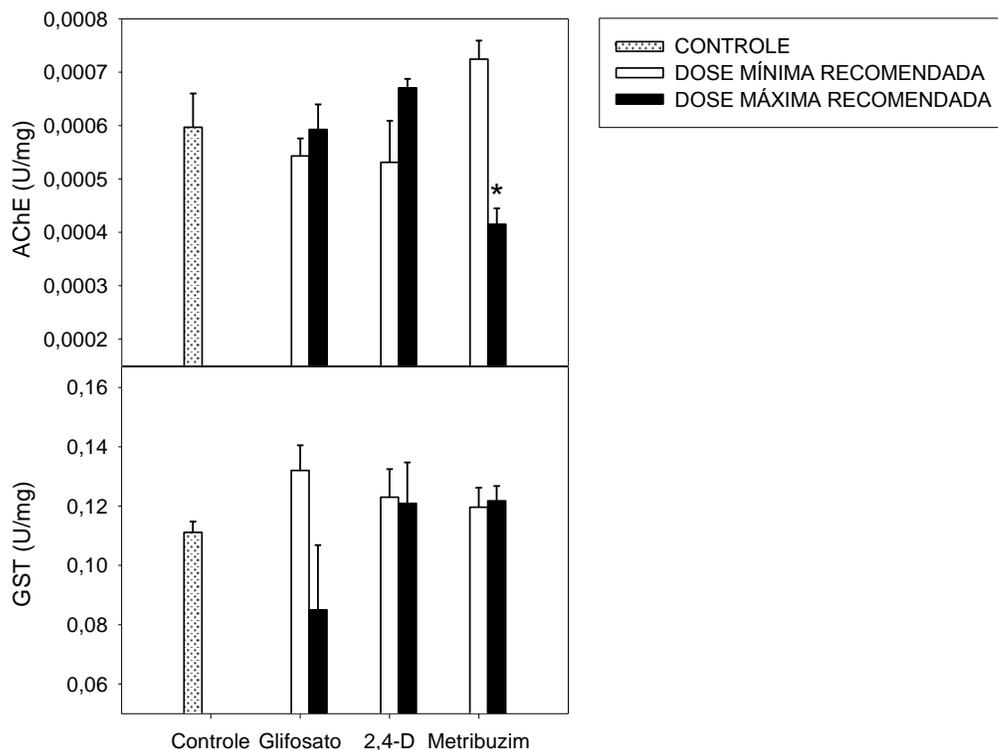


Figura 17. Atividade enzimática de acetilcolinesterase (AChE) e glutatona S-transferase (GST) em proteínas extraídas de *Hypsiboas faber* em exposição prolongada às doses mínimas e máximas recomendadas de glifosato (0,48 mg/L e 2,4 mg/L), 2,4-D (0,40 mg/L e 1,21 mg/L) e metribuzim (1,44 mg/L e 1,92 mg/L) no cultivo de cana-de-açúcar. Barras representam a média \pm 1 erro padrão de cinco réplicas. *indica diferença significativa ($p < 0,05$) relativa ao controle.

Taxa de atividade

No controle, em média 23% dos indivíduos apresentaram-se ativos em determinado momento do tempo. Nenhum dos tratamentos experimentais levou a uma alteração significativa nas taxas de atividade de *H. faber* ($p > 0,05$), sendo que a diferença entre os tratamentos com menor atividade (21,2%, dose máxima de metribuzim) e os tratamentos com maior atividade (25,2%, dose mínima de glifosato) foi de apenas 4% (Figura 18).

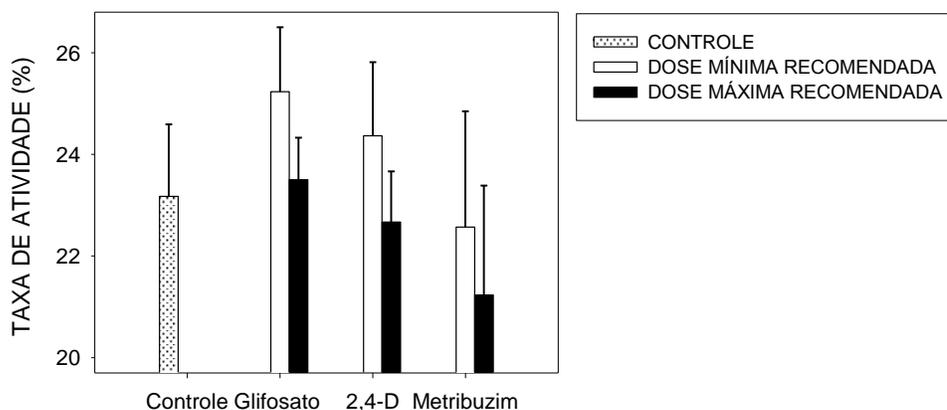


Figura 18. Taxa de atividade de *Hypsiboas faber* em exposição prolongada às doses mínimas e máximas recomendadas de glifosato (0,48 mg/L e 2,4 mg/L), 2,4-D (0,40 mg/L e 1,21 mg/L) e metribuzim (1,44 mg/L e 1,92 mg/L) no cultivo de cana-de-açúcar. Barras representam a média \pm 1 erro padrão de cinco réplicas.

3.2.2 Experimento com larvas de *Hypsiboas pardalis*

Parâmetros físico-químicos

No experimento de exposição crônica com *Hypsiboas pardalis* houve diferença nas propriedades físico-químicas da água. Todos os tratamentos com herbicidas levaram a uma diminuição do pH (pH 6,7) com diferença significativa em relação ao controle (pH 7,1) (ANOVA: $F = 6,02$, $p = 0,03$ para glifosato; ANOVA: $F = 9,57$, $p = 0,01$ para ametrina; ANOVA: $F = 9,42$, $p = 0,01$ para 2,4-D; ANOVA: $F = 8,94$, $p = 0,01$ para metribuzim; ANOVA: $F = 9,59$, $p = 0,01$ para acetocloro; Figura 19), porém dentro do recomendado pelo guia internacional FETAX (ASTM, 2004). Os herbicidas não influenciaram os valores de condutividade, exceto pelo acetocloro, que alterou significativamente a condutividade em relação ao controle (teste de Wilcoxon Rank Sum: $p > 0,05$). O oxigênio dissolvido no controle foi em média de 3,2 mg/L (Figura 19). Não se observou diferença significativa entre os valores de oxigênio dissolvido obtidos dos tratamentos com os herbicidas e o controle ($p > 0,05$), mantendo-se dentro da amplitude esperada. A temperatura se manteve na faixa dos 22,5°C no controle e nos tratamentos dos herbicidas, não apresentando nenhuma variação significativa (dados não apresentados na Figura 19), estando 0,5°C abaixo do limite esperado de 25°C ($\pm 2^\circ\text{C}$).

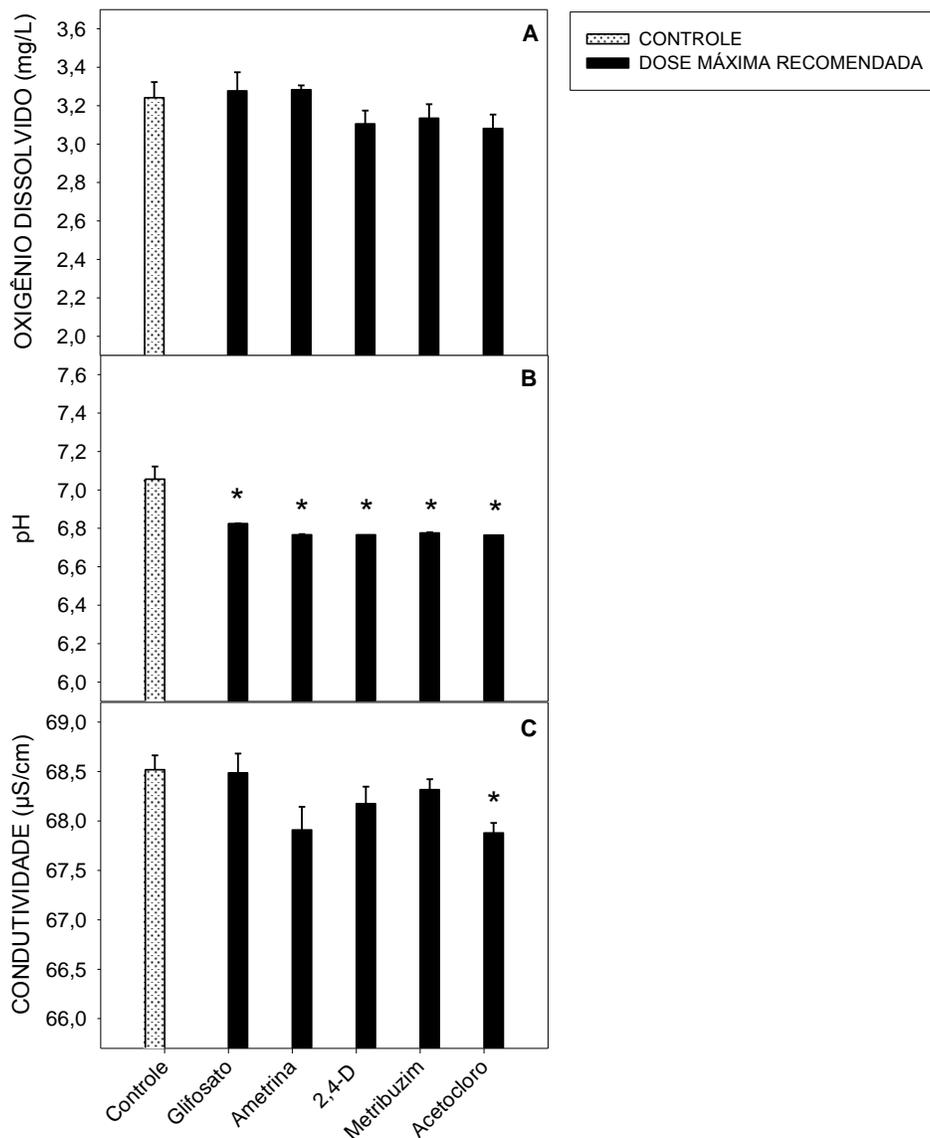


Figura 19. Propriedades físico-químicas medidas ao longo de experimento de exposição crônica de *Hypsiboas pardalis* à dose máxima recomendada para uso de glifosato (2,4mg/L), ametrina (4mg/L), 2,4-D (1,21mg/L), metribuzim (1,92mg/L) e acetocloro (3,34mg/L) no cultivo de cana-de-açúcar. **A.** Oxigênio dissolvido **B.** pH **C.** Condutividade. Barras representam a média \pm 1 erro padrão de oito réplicas do controle e quatro réplicas dos compostos. *indica diferença significativa ($p < 0,05$) relativa ao controle.

Mortalidade

A mortalidade dos indivíduos de *H. pardalis* no controle foi de 5%. Pode-se observar que os compostos glifosato (ANOVA: $F = 12,631$, $p = 0,005$), ametrina (ANOVA: $F = 356,52$, $p = 0,000$) e acetocloro (ANOVA: $F = 580,32$, $p = 0,000$) causaram uma mortalidade significativa das larvas de *H.*

pardalis, o que resultou em 15%, 68% e 76% de mortalidade, respectivamente (Figura 20). Por sua vez, não houve mortalidade significativa para o 2,4-D e o metribuzim ($p>0,05$).

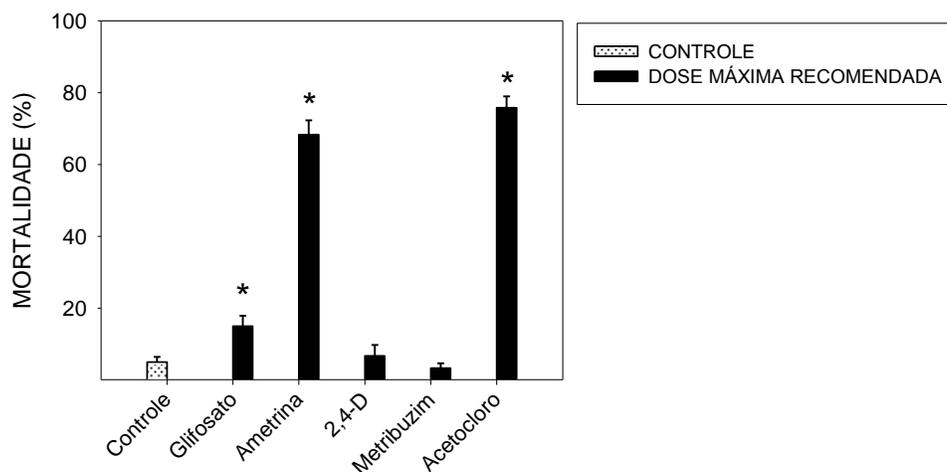


Figura 20. Mortalidade de *Hypsiboas pardalis* em exposição prolongada à dose máxima recomendada para uso de glifosato (2,4mg/L), ametrina (4mg/L), 2,4-D (1,21mg/L), metribuzim (1,92mg/L) e acetocloro (3,34mg/L) no cultivo de cana-de-açúcar. Barras representam a média \pm 1 erro padrão de oito réplicas do controle e quatro réplicas dos compostos. * indica diferença significativa ($p<0,05$) relativa ao controle.

Massa e estágio de desenvolvimento

As larvas expostas aos controles apresentaram cerca de 182mg de massa final e atingiram o estágio 30 (Gosner, 1960) depois de 23 dias de experimento. Dos cinco compostos manipulados, apenas a ametrina causou efeito significativo sobre a massa (Wilcoxon's Rank Sum: $p<0,05$) e a ametrina e o acetocloro reduziram significativamente o desenvolvimento das larvas de *H. pardalis* (Teste de chi-quadrado: $p= 0,000$ para ambos compostos). Larvas de *H. pardalis* expostas à ametrina apresentaram quase a metade da massa obtida pelos indivíduos do controle, e se desenvolveram apenas até o estágio 28 (Figura 21). Larvas expostas ao acetocloro tiveram uma tendência não-significativa à uma massa reduzida quando comparadas ao controle (Wilcoxon's Rank Sum: $p>0,05$).

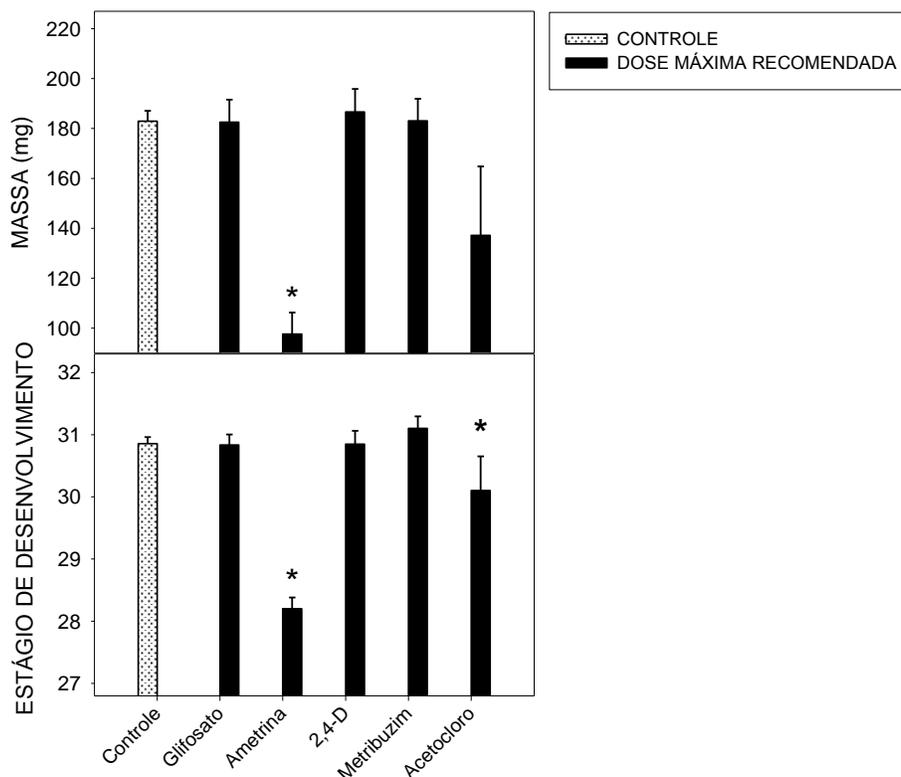


Figura 21. Massa final e estágio de desenvolvimento (Gosner, 1960) de *Hypsiboas pardalis* em exposição prolongada à dose máxima recomendada para uso de glifosato (2,4mg/L), ametrina (4mg/L), 2,4-D (1,21mg/L), metribuzim (1,92mg/L) e acetocloro (3,34mg/L) no cultivo de cana-de-açúcar. Barras representam a média \pm 1 erro padrão de oito réplicas do controle e quatro réplicas dos compostos. *indica diferença significativa ($p < 0,05$) relativa ao controle.

Atividade enzimática de AChE e GST

A atividade enzimática de acetilcolinesterase (AChE) nas larvas de *H. pardalis* não foi significativamente alterada pela exposição ao metribuzim e ao acetocloro (Teste T: $t = 0,243$, $p = 0,813$; $t = -1,5439$, $p = 0,8898$, respectivamente), mesmo este último tendo causado o maior aumento de atividade de AChE. Por outro lado, os compostos glifosato, ametrina e 2,4-D foram capazes de aumentar significativamente a atividade desta enzima (Teste T: $t = -2,879$, $p = 0,016$ para glifosato; $t = -6,394$, $p = 0,000$ para ametrina; $t = -3,426$, $p = 0,006$ para 2,4-D; Figura 22), com destaque à ação da ametrina que aumentou mais que o dobro da atividade de AChE em relação ao controle.

Com relação à atividade enzimática de glutathiona S-transferase (GST), no controle o valor médio foi de 0,274368 U/mg de proteína. Não houve diferença significativa entre a atividade de GST de *H. pardalis* no controle quando comparada com os tratamentos de glifosato (Teste T: $t = 0,771$, $p = 0,459$), 2,4-D (Teste T: $t = -0,724$, $p = 0,486$) e metribuzim (Teste T: $t = -0,792$, $p = 0,447$). No entanto, observou-se um aumento significativo na atividade desta enzima quando exposta aos compostos ametrina e acetocloro (Teste T: $t = -4,567$, $p = 0,001$; $t = -4,437$, $p = 0,001$, respectivamente; Figura 22), com uma diferença de aproximadamente 1,6 vezes maior que o registrado para o controle.

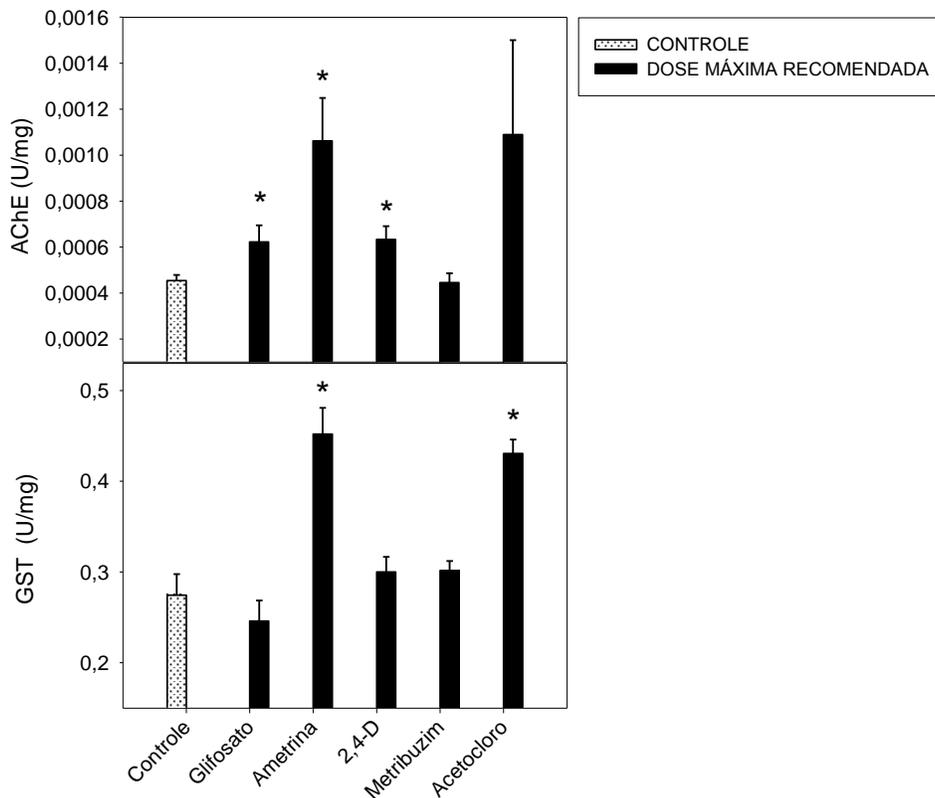


Figura 22. Atividade enzimática de Acetilcolinesterase (AChE) e glutathiona S-transferase (GST) em proteínas extraídas de *Hypsiboas pardalis* em exposição prolongada à dose máxima recomendada para uso de glifosato (2,4mg/L), ametrina (4mg/L), 2,4-D (1,21mg/L), metribuzim (1,92mg/L) e acetocloro (3,34mg/L) no cultivo de cana-de-açúcar. Barras representam a média \pm 1 erro padrão de oito réplicas do controle e quatro réplicas dos compostos. *indica diferença significativa ($p < 0,05$) relativa ao controle.

Taxa de atividade

No controle, em média 15% dos indivíduos apresentaram-se ativos em determinado momento do tempo. Os compostos glifosato, 2,4-D e metribuzim (14,8%, 16% e 14,1%, respectivamente), não causaram alteração significativa ($p > 0,05$) na taxa de atividade de *H. pardalis* em relação ao controle. No entanto, nos tratamentos de ametrina e acetocloro, houve uma redução significativa na atividade das larvas de *H. pardalis* (Teste T: $t = 4,557$, $p = 0,001$; $t = 7,237$, $p = 0,000$, respectivamente), sendo que para acetocloro esta diminuição foi menos da metade (6,6%) do observado no controle (Figura 23).

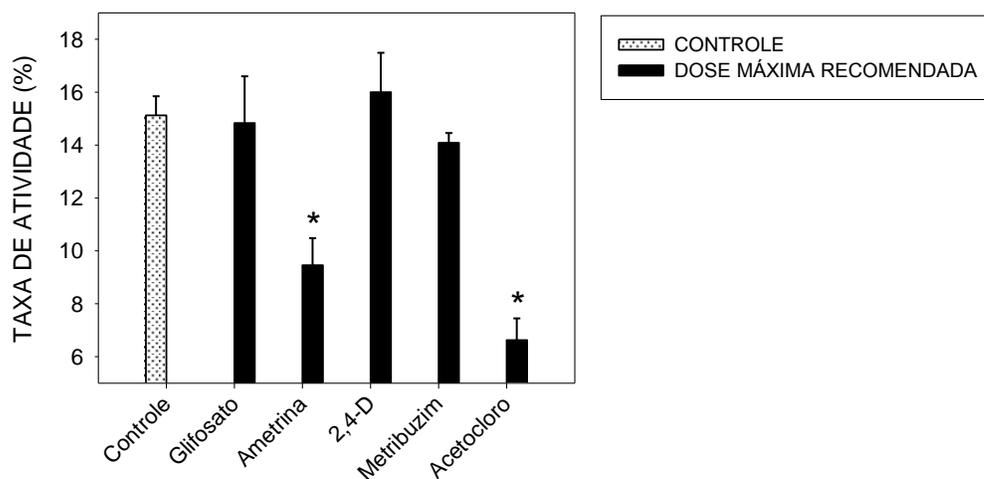


Figura 23. Taxa de atividade de *Hypsiboas pardalis* em exposição prolongada à dose máxima recomendada para uso de glifosato (2,4mg/L), ametrina (4mg/L), 2,4-D (1,21mg/L), metribuzim (1,92mg/L) e acetocloro (3,34mg/L) no cultivo de cana-de-açúcar. Barras representam a média \pm 1 erro padrão de oito réplicas do controle e quatro réplicas dos compostos. *indica diferença significativa ($p < 0,05$) relativa ao controle.

4. Discussão

O aumento na demanda pelo etanol promoveu nas últimas três décadas a expansão da cultura de cana-de-açúcar no Brasil, e, com ela, o aumento do consumo de pesticidas. Uma vez que estes compostos tem grande potencial de alcançar fontes de água potável e ambientes aquáticos por meio da lavagem da cana-de-açúcar e do escoamento superficial e infiltração da água da chuva, o uso de agrotóxicos compõem riscos à saúde humana e à biodiversidade dependente destes ecossistemas, como algas, crustáceos, peixes, e anfíbios. Hipotetiza-se que uma série de características morfológicas, fisiológicas e de história de vida tornaria os anfíbios particularmente vulneráveis à contaminação ambiental e, talvez por isso, os anfíbios constituam hoje a mais ameaçada classe de vertebrados do planeta. No entanto, poucos são os estudos que investigam efeitos de poluentes sobre anfíbios, particularmente sobre espécies do Brasil. Portanto, este trabalho se mostra de grande relevância, trazendo novas respostas com relação à toxicidade de herbicidas utilizados em cana-de-açúcar e seus efeitos letais e subletais para larvas de anfíbios anuros do Brasil.

4.1 Experimento de exposição aguda

Analisando os dados de toxicidade aguda expressa pelos valores de CL50 de *Physalaemus cuvieri* e *Hypsiboas pardalis*, observa-se uma ampla variação na letalidade causada pelos ingredientes ativos dos herbicidas testados: para *P. cuvieri* o CL50 variou 26 vezes e o de *H. pardalis* 13 vezes entre o composto mais tóxico e o composto menos tóxico (Figura 24). A maior variação observada para *P. cuvieri*, se deve ao fato das concentrações dos experimentos preliminares terem sido estabelecidas sobre a sensibilidade desta espécie, proporcionando uma variação ampla e desejada para a realização dos testes definitivos. Após a definição das concentrações para *P. cuvieri*, foi testada a sensibilidade de *H. pardalis* para as mesmas concentrações, o que gerou no caso uma variação mais estreita de valores de CL50. Dentre essas variações, houve uma clara e significativa hierarquia de toxicidade entre os ingredientes ativos dos herbicidas testados: para ambas as espécies, o glifosato foi sempre o composto menos tóxico, seguido do metribuzim. Para *P. cuvieri* a hierarquia continua com a ametrina, que é substancialmente mais tóxica que o metribuzim, seguida do acetocloro, que é o ingrediente ativo mais tóxico. Para *H. pardalis* não foi possível

definir a CL50 da ametrina porque a mortalidade subiu de 0% no controle para 93% na menor concentração manipulada (10 mg/L). Portanto, não podemos concluir se a ametrina é mais tóxica ou menos tóxica que o acetocloro para esta espécie através do CL50. Uma análise da menor concentração com efeito observado (CEO) de ametrina e acetocloro para *H. pardalis* mostra que os valores são bem próximos (10 e 12 mg/L para ametrina e acetocloro, respectivamente). Portanto, a única informação de que dispomos para esta espécie sugere que a toxicidade de ametrina é da mesma ordem de magnitude que a do acetocloro.

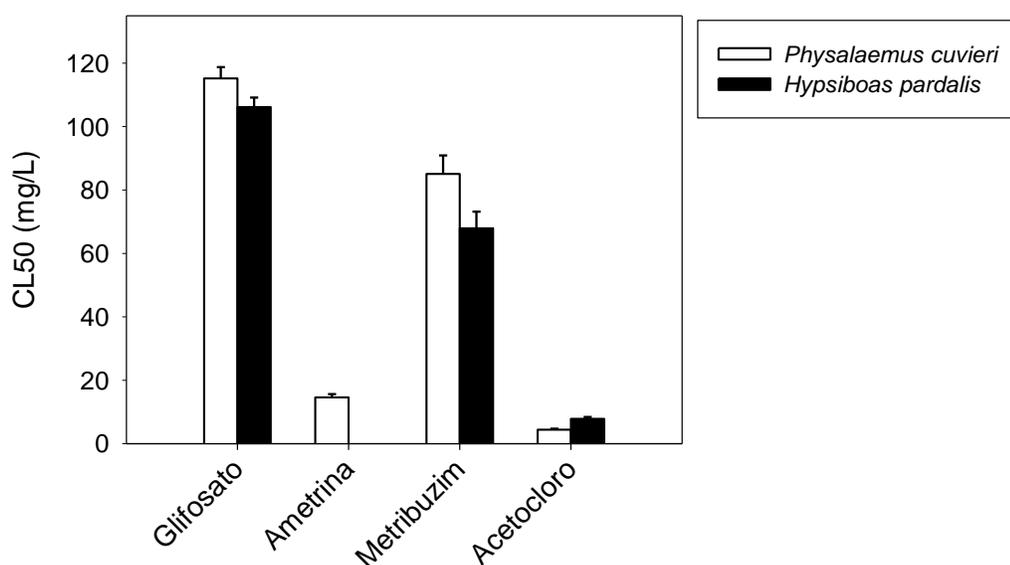


Figura 24. Comparação interespecífica da CL50 de glifosato, ametrina, metribuzim e acetocloro para as larvas de *Physalaemus cuvieri* e *Hypsiboas pardalis* em exposição aguda de 96h. Barras representam intervalo de confiança de 95%. Note que para ametrina não foi possível calcular a CL50 de *H. pardalis*, pois houve mortalidade acima de 90% na menor concentração manipulada.

Certas propriedades dos herbicidas podem ser consideradas para explicar a diferença entre as toxicidades dos compostos nos organismos aquáticos, como, por exemplo, sua capacidade de persistência na água, que reflete na capacidade de entrada nos organismos e, conseqüentemente, de se bioacumular.

Geralmente esta capacidade é quantificada pelo coeficiente de partição octanol-água (Kow) e é inversamente proporcional a sua solubilidade na água (EPA, 2012). No presente estudo, o acetocloro, seguido pela ametrina, foram os compostos que se mostraram mais tóxicos às duas espécies de anfíbios. O acetocloro apresenta um valor de $Kow=4,14$ (log P), sendo considerado um composto com alto potencial de bioacumular. Além disso, é muito persistente em água, sendo extremamente estável e de moderada solubilidade (PPDB, 2011). A ametrina apresenta um valor de $Kow=2,63$ (log P) muito próximo de ser considerado um composto com moderado potencial de bioacumular ($Kow=2,7$). Assim como o acetocloro, a ametrina também é muito persistente em água, estável e de moderada solubilidade (PPDB, 2011). Portanto, estas características podem vir a explicar o fato de estes dois compostos serem mais tóxicos as estas espécies de anfíbios do que os compostos glifosato e metribuzim, que apresentam valores de Kow bem menores ($Kow=-3,2$ e $1,65$, respectivamente). Desta forma, é muito provável que o acetocloro, por ser extremamente estável, manteve-se disponível na água em contato com as larvas ao longo das 96h de experimento sem sofrer degradação por hidrólise, ou seja, a concentração se manteve próxima à inicial. Observações como esta também foram feitas por He *et al.* (2013) que justificam a maior toxicidade do acetocloro as espécies testadas, em função do seu valor de Kow.

Com relação à diferença na sensibilidade interespecífica aos herbicidas testados, os resultados dos experimentos de exposição aguda demonstraram que os girinos de *Hypsiboas pardalis* foram em geral mais sensíveis que *Physalaemus cuvieri* aos pesticidas manipulados. O $CL50_{96h}$ de *H. pardalis* foi significativamente inferior ao de *P. cuvieri* para glifosato (8%), metribuzim (20%) e ametrina; mas significativamente superior ao de *P. cuvieri* para o acetocloro (43%). *Hypsiboas pardalis* também tendeu a ser mais sensível que *P. cuvieri* – mas nem sempre - em experimentos de exposição aguda de 96h a três formas de nitrogênio inorgânico (nitrito, nitrato e amônia; Ilha, 2010). Larvas de *H. pardalis* foram muito mais sensíveis ao nitrito ($CL50_{96h}$ 80% inferior) e ao nitrato ($CL50_{96h}$ 2% inferior) do que *P. cuvieri*, que por sua vez foi muito mais sensível ao amônio do que *H. pardalis*. Com isso, há uma tendência de padrão de sensibilidade para estas duas espécies, no qual *P. cuvieri* se mostrou mais resistentes que *H. pardalis* à maior parte dos herbicidas e fertilizantes manipulados. No entanto, *P. cuvieri* também apresentou especificidades, sendo mais sensível ao acetocloro e amônio. Tal variação na ordem de sensibilidade de diversas espécies a determinado composto e/ou na ordem de toxicidade de compostos a determinada

espécie não é inesperada. Já há tempos reconhece-se que a busca pela espécie mais sensível a todos os compostos não passaria de um mito (CAIRNS, 1986), e por esta razão que a investigação da ação de pesticidas sobre anfíbios torna-se mais cautelosa e dependente de um trabalho a longo prazo.

No mais, a busca por um entendimento da variação interespecífica na toxicidade dos compostos testados para outras espécies de anfíbios esbarra numa disponibilidade bastante limitada de dados publicados no mundo todo, e ainda mais para espécies neotropicais (SCHIESARI *et al.*, 2007). Por exemplo, glifosato é o herbicida mais usado no mundo, em termos de volume (20%; ARMAS *et al.*, 2005), mas poucos são os estudos que avaliam a toxicidade aguda do ingrediente ativo glifosato (BIDWELL & GORRIE, 1995; MANN & BIDWELL, 1999; LAJMANOVICH *et al.*, 2003; HOWE *et al.*, 2004; BERNAL *et al.*, 2009). Os valores de CL50_{96h} para larvas de *Hypsiboas pardalis* e de *Physalaemus cuvieri* foram respectivamente 106,2 mg/L e 115,2 mg/L. Entre os poucos estudos que manipularam o glifosato como ingrediente ativo, BIDWELL & GORRIE (1995) e MANN & BIDWELL (1999) encontraram valores de CL50 de 81,2 mg/L e 121 mg/L de glifosato em 48h de exposição para larvas de *Litoria moorei*. Uma vez que no presente estudo a exposição ao glifosato foi duas vezes mais longa que aquela dos experimentos realizados com *Litoria moorei* (96h ao invés de 48h), e que quanto maior o tempo de exposição menor a dose necessária para causar efeito, pode-se concluir que *P. cuvieri* e *H. pardalis* são mais tolerantes ao glifosato do que *Litoria*. Uma comparação com outros organismos de água doce também sugere que girinos de *P. cuvieri* e *H. pardalis* são relativamente tolerantes ao glifosato, uma vez que os valores de CL50_{96h} para estas espécies foram quase o triplo dos valores de CL50_{96h} medidos para truta arco-íris e para o crustáceo *Americamysis bahia*, e quase o triplo do CL50_{48h} medido para *Daphnia magna* (Tabela 8).

Dados da toxicidade aguda da ametrina são ainda mais escassos. A CL50_{96h} da ametrina para larvas de *P. cuvieri* foi 14,6 mg/L; para *H. pardalis* não foi possível calculá-la, uma vez que na menor concentração (10mg/L) foi registrado 92,5% de mortalidade. Segundo a Base de Dados de Propriedades dos Pesticidas (PPDB) e a base de dados do PAN (Pesticide Action Network), que inclusive são os únicos dados encontrados para efeito letal de ametrina, os valores de CL50 para anfíbios (*Bufo bufo japonicus*) foram de 3,8 a 5,6 mg/L em 24h de exposição aguda, 5 mg/L e 1,7 mg/L em 96h de exposição aguda para peixes (*Oncorhynchus mykiss*) e crustáceos (*Americamysis bahia*), respectivamente, 28 mg/L para *Daphnia*

magna em experimento de 48h e 0,0036 mg/L para algas (72h-EC50). Portanto a baixíssima quantidade de dados sobre o efeito letal da ametrina torna limitada a comparação da letalidade deste composto sobre anfíbios. No entanto, com as comparações que são possíveis parecem indicar que as duas espécies de anfíbios testadas nesta dissertação são relativamente menos sensíveis, ou mais tolerantes, à contaminação por ametrina que outros organismos aquáticos.

Tabela 8. Comparação dos valores de CL50 (Concentração Letal Mediana) de experimentos de exposição aguda com os ingredientes ativos glifosato, ametrina, metribuzim e acetocloro sobre diferentes organismos de água doce.

Espécie	Estágios manipulados	Composto manipulado	Duração do experimento	Variáveis de resposta	CL 50 (mg/L) ou (µg mg/L)	IC 95%	Referência
<i>Physalaemus cuvieri</i> (anuro)	25	glifosato	96h	mortalidade	115,2	111,6 - 118,8	presente estudo
<i>Hypsiboas pardalis</i> (anuro)	25	glifosato	96h	mortalidade	106,2	103,2 - 109,2	presente estudo
<i>Litoria moorei</i> (anuro)	25	glifosato ácido	48h	mortalidade	81,2	76,7 - 85,9	Mann & Bidwell, 1999
<i>Litoria moorei</i> (anuro)	25	glifosato ácido	48h	mortalidade	121	111 - 133	Bidwell & Gorrie, 1995
<i>Crinia insignifera</i> (anuro)	adulto	glifosato ácido	48h	mortalidade	83,6	67,4 - 103,6	Mann & Bidwell, 1999
<i>Rana clamitans</i> (anuro)	25	glifosato	96h	mortalidade	>38,9		Howe <i>et al.</i> , 2004
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (peixe)		glifosato	96h	mortalidade	38		PPDB, 2011
<i>Daphnia magna</i> (microcrustáceo aquático)		glifosato	48h	imobilidade	40		PPDB, 2011
<i>Americamysis bahia</i> (crustáceo aquático)		glifosato	96h	mortalidade	40		PPDB, 2011
<i>Scenedesmus quadricauda</i> (alga)		glifosato	72h	crescimento	4,4		PPDB, 2011
<i>Physalaemus cuvieri</i> (anuro)	25	ametrina	96h	mortalidade	14,6	13,6 - 15,7	presente estudo
<i>Hypsiboas pardalis</i> (anuro)	25	ametrina	96h	mortalidade	<10	-	presente estudo
<i>Bufo bufo japonicus</i> (anuro)		ametrina	24h	mortalidade	3,8 - 5,6		Kegley <i>et al.</i> , 2010
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (peixe)		ametrina	96h	mortalidade	5		PPDB, 2011
<i>Daphnia magna</i> (microcrustáceo aquático)		ametrina	48h	imobilidade	28		PPDB, 2011
<i>Americamysis bahia</i> (crustáceos aquáticos)		ametrina	96h	mortalidade	1,7		PPDB, 2011
<i>Raphidocelis subcapitata</i> (algas)		ametrina	72h	crescimento	0,0036		PPDB, 2011
<i>Physalaemus cuvieri</i> (anuro)	25	metribuzim	96h	mortalidade	85,1	79,3 - 91,3	presente estudo
<i>Hypsiboas pardalis</i> (anuro)	25	metribuzim	96h	mortalidade	67,9	62,6 - 73,8	presente estudo
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (peixe)		metribuzim	96h	mortalidade	74,6		PPDB, 2011
<i>Daphnia magna</i> (microcrustáceo aquático)		metribuzim	48h	imobilidade	49		PPDB, 2011
<i>Scenedesmus quadricauda</i> (alga)		metribuzim	72h	crescimento	0,02		PPDB, 2011
<i>Physalaemus cuvieri</i> (anuro)	25	acetocloro	96h	mortalidade	4,4	4,1 - 4,7	presente estudo
<i>Hypsiboas pardalis</i> (anuro)	25	acetocloro	96h	mortalidade	7,8	7,2 - 8,4	presente estudo
<i>Bufo bufo gargarizans</i> (anuro)		acetocloro	96h	mortalidade	1,32		Kegley <i>et al.</i> , 2010
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (peixe)		acetocloro	96h	mortalidade	0,36		PPDB, 2011
<i>Daphnia magna</i> (microcrustáceo aquático)		acetocloro	48h	imobilidade	8,6		PPDB, 2011
<i>Americamysis bahia</i> (crustáceos aquáticos)		acetocloro	96h	mortalidade	1,9		PPDB, 2011
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (algas)		acetocloro	72h	crescimento	0,00027		PPDB, 2011
<i>Daphnia carinata</i> (microcrustáceo aquático)		acetocloro	48h	mortalidade	11,8	11,3 - 12,3	He <i>et al.</i> , 2013
<i>Danio rerio</i> (peixe)	adulto	acetocloro	96h	mortalidade	0,37		Kovriznych & Urbancikova, 2001
<i>Danio rerio</i> (peixe)	juvenil	acetocloro	96h	mortalidade	0,61		Kovriznych & Urbancikova, 2001
<i>Poecilia reticulata</i> (peixe)	adulto	acetocloro	96h	mortalidade	1,7		Kovriznych & Urbancikova, 2001
<i>Poecilia reticulata</i> (peixe)	juvenil	acetocloro	96h	mortalidade	1,3		Kovriznych & Urbancikova, 2001

Com relação à toxicidade de metribuzim, os valores de CL50_{96h} foram quantificados em 85,1 mg/L e 67,9 mg/L para *P. cuvieri* e *H. pardalis*, respectivamente. Apesar dos valores de CEO (75mg/L) e CENO (46,64) terem sido iguais para as duas espécies, o metribuzim foi mais tóxico aos girinos de *H.pardalis*, pois na menor concentração de efeito observado (75mg/L) houve uma mortalidade de pouco mais de 62% de *H. pardalis*, duas vezes e meia a mais que a mortalidade de *P. cuvieri* (25%). Valores similares estão registrados na base de dados de PPDB (Pesticides Properties Database), por exemplo, para peixe da espécie *Oncorhynchus mykiss*, com o valor de CL50 de 74,6 mg/L e de 49 mg/L para *Daphnia magna* em exposição de 48h. Velisek *et al.* (2008) analisaram a toxicidade da formulação Sencor WG 70, que contém 70% do ingrediente ativo metribuzim, para juvenis de peixe da mesma espécie e registraram CL50 de 62,5 mg/L em 96h de experimento. Não foi encontrado nenhum estudo para anfíbios. Com esta pouca literatura, pode-se dizer que o metribuzim apresentou baixa toxicidade para estas espécies retratadas e que *P. cuvieri* e *H. pardalis* foram menos sensíveis que peixes e invertebrados.

Para o acetocloro os valores de CL50_{96h} foram quantificados em 4,4 mg/L e 7,8 mg/L para *P. cuvieri* e *H. pardalis*, respectivamente. O único outro dado da toxicidade de acetocloro para anfíbios – embora sem pormenores do delineamento experimental - foi para *Bufo bufo gargarizans* cujo valor de CL50_{96h} foi de 1,3 mg/L. Por sua vez, testes de 96h de exposição realizados com peixes juvenis registraram valores de CL50 de 0,6 mg/L e 1,3 mg/L para *Danio rerio* e *Poecilia reticulata* (KOVRIZNYCH & URBANCIKOVA, 2001) e 0,4 mg/L para *Oncorhynchus mykiss* (PPDB, 2011). Para invertebrados aquáticos os valores de 48h-CL50 foram de 11,8 mg/L para *Daphnia carinata* (HE *et al.*, 2013), 8,6 mg/L e 17,5 mg/L para *Daphnia magna* (PPDB, 2011; LOKHANSKAYA & SHCHERBAN, 2010) e 6,8 mg/L para *Ceriodaphnia affinis* (LOKHANSKAYA & SHCHERBAN, 2010). Portanto, mais uma vez, as espécies de larvas de anuros testadas aparentam ser mais tolerantes à contaminação pelo acetocloro do que outros organismos de água doce, especialmente mais tolerantes do que peixes.

Foram encontrados valores de CL50 para anfíbios para o composto alacloro, que é um herbicida similar ao acetocloro, pertencente ao mesmo grupo das cloroacetaminas. Howe *et al.* (1998) investigaram a toxicidade do alacloro em 96h de experimento em duas fases de desenvolvimento das espécies *Rana pipiens* e *Bufo americanus*. Em estágio 40 os indivíduos apresentaram valores próximos ao encontrado no

presente estudo (CL50=3,5 e 3,3 mg/L, respectivamente). Já em estágio 29 os valores de CL50 foram maiores, 11,5 mg/L e 3,9 mg/L, respectivamente. Da mesma forma que estágios iniciais de desenvolvimento são em geral considerados estágios mais sensíveis a agentes químicos devido às mudanças fisiológicas (ORTIZ-SANTALIESTRA *et al.*, 2006; SCHIESARI obs. pess.), é muito provável que estágios próximos a fase metamórfica também são considerados estágios mais sensíveis a ação de compostos tóxicos, pois se dá início aos processos de transição do ambiente aquático para o terrestre, o que pode explicar a maior sensibilidade das espécies no estágio 25, como observado no presente estudo, e no estágio 40 de Howe *et al.* (1998). Com isso, pode-se dizer que ambos os compostos acetocloro e alacloro apresentam média toxicidade aos anfíbios. Por outro lado, o acetocloro, segundo os dados obtidos na literatura, é altamente tóxico para peixes.

Além da escassez de trabalhos que avaliem a toxicidade aguda dos ingredientes ativos investigados nesta dissertação a anfíbios, diversos fatores influenciam de forma significativa a toxicidade de compostos e sua comparação, como o tempo de exposição, o regime de renovação das soluções-teste, a forma de manipulação do composto – se ingredientes ativo ou se formulação, e o estágio de desenvolvimento inicial dos indivíduos, entre outros. Por todos estes motivos, esta revisão evidencia, mais uma vez, a importância da utilização de experimentos ecotoxicológicos padronizados de exposição aguda como ferramenta para a avaliação da variação interespecífica da sensibilidade e do nível de ecotoxicidade de xenobióticos à organismos. Experimentos padronizados são essenciais para uma maior comparabilidade entre as espécies e entre taxa, como também um reconhecimento mútuo dos dados obtidos pelos vários setores envolvidos na avaliação de risco de produtos químicos – como academia, indústria e órgãos do governo.

4.2 Experimento de exposição crônica

Nos experimentos de exposição crônica procurou-se manipular condições realistas de aplicação dos principais ingredientes ativos de herbicidas usados na cultura de cana-de-açúcar no Brasil. Para tal, manipularam-se as doses de aplicação mínimas e máximas (experimento com *Hypsiboas faber*) ou doses de aplicação máximas (experimento com *Hypsiboas pardalis*) recomendadas pelos fabricantes para estes

compostos e para cultura de cana-de-açúcar. Uma vez que *H. faber* e *H. pardalis* colonizam pequenas poças temporárias (BERTOLUCI & RODRIGUES, 2002; LAVILLA *et al.*, 2010, SCHIESARI obs. pess.), e que poças temporárias são encontradas dentro de canaviais e são colonizadas por espécies de anfíbios, a manipulação direta de doses recomendadas por fabricantes é aproximação razoável de um cenário de exposição. Pode-se dizer ainda que a exposição às doses mais altas seria razoável se for considerado a aplicação direta sobre poças, somado ao escoamento superficial de pesticidas através do terreno. Neste cenário, todos os herbicidas manipulados – glifosato, ametrina, 2,4-D, metribuzim e acetocloro - tiveram efeito subletal e em alguns casos efeito letal, sobre as larvas de anfíbios manipuladas (Tabela 9).

Tabela 9. Comparação dos efeitos letais e subletais obtidos nos experimentos de exposição crônica com *H. faber* e *H. pardalis*

(S.E: sem efeito; C.E: efeito significativo).

	<i>H. faber</i>	<i>H. pardalis</i>	<i>H. faber</i>	<i>H. pardalis</i>	<i>H. faber</i>	<i>H. pardalis</i>	<i>H. faber</i>	<i>H. pardalis</i>	<i>H. faber</i>	<i>H. pardalis</i>	<i>H. faber</i>	<i>H. pardalis</i>	<i>H. faber</i>	<i>H. pardalis</i>
	Mortalidade		Massa		Estágio de desenvolvimento		Perfil leucocitário		AChE		GST		Atividade	
Glifosato	S.E.	C.E.	S.E.	S.E.	C.E.	S.E.	-	S.E.	C.E.	S.E.	S.E.	S.E.	S.E.	
Ametrina	-	C.E.	-	C.E.	-	C.E.	-	-	-	C.E.	-	C.E.	-	C.E.
2,4-D	S.E.	S.E.	S.E.	S.E.	C.E.	S.E.	S.E.	-	S.E.	C.E.	S.E.	S.E.	S.E.	S.E.
Metribuzim	S.E.	S.E.	S.E.	S.E.	C.E.	S.E.	S.E.	-	C.E.	S.E.	S.E.	S.E.	S.E.	S.E.
Acetocloro	-	C.E.	-	S.E.	-	C.E.	-	-	-	S.E.	-	C.E.	-	C.E.

Em termos de efeitos letais, nem 2,4-D nem metribuzim causaram mortalidade em *H. faber* ou *H. pardalis*, mesmo nas concentrações máximas recomendadas. Glifosato manipulado nas doses máximas recomendadas causou mortalidade de 15% em larvas de *H. pardalis* quando comparada a 5% no controle; não houve efeito da manipulação de glifosato na mortalidade de *H. faber*. Ametrina e acetocloro, não manipuladas em exposição crônica para *H. faber*, tiveram grande efeito em *H. pardalis* quando manipulado nas doses máximas recomendadas pelos fabricantes, causando 68,3% e 75,8% de mortalidade, respectivamente, ao final de 23 dias de exposição.

A maioria dos trabalhos publicados sobre os efeitos letais do glifosato em exposição prolongada, manipulou formulações comerciais, sem analisar separadamente os efeitos do ingrediente ativo dos efeitos do surfactante POEA (JAYAWARDENA *et al.*, 2010; JAYAWARDENA *et al.*, 2011;) presentes nas formulações, que é por si só sabidamente mais tóxico (PERKINS *et al.*, 2000; RELYEA, 2012). Em comparação com os dados do presente estudo de 15% de mortalidade de *H. pardalis* e ausência de efeito em termos de mortalidade em *H. faber* quando expostos a 2,4 mg/L de ingrediente ativo glifosato por 23 dias, encontramos os seguintes resultados: Jayawardena *et al.* (2010; 2011) expuseram larvas de *Polypedates cruciger* e *Bufo melanostictus* em estágio 25 por 30 dias a 1 mg ia/L de glifosato sob a forma de Roundup, e observaram mortalidade de 20% e 56%. Relyea (2012a) também encontrou valores comparáveis de letalidade para larvas de *Bufo americanus* (76%), *Rana pipiens* (62%) e *Rana sylvatica* (74%) expostas por 21 dias à formulação Roundup Original Max contendo no máximo 3 mg ia/L de glifosato. Esta dissertação demonstra que o ingrediente ativo glifosato pode causar mortalidade a larvas de anfíbios quando em cenários de exposição a concentrações realistas de aplicação; porém, como outros autores e os dados levantados acima sugerem, a letalidade é bastante aumentada quando o glifosato é apresentado na forma de formulações comerciais.

Nem *H. pardalis* nem *H. faber* expostas à concentração máxima recomendada de 1,21 mg/L do ingrediente ativo 2,4 D por 23 dias apresentaram mortalidade significativa. Um único trabalho encontrado na literatura com anfíbios expôs embriões de *Rhinella arenarum* ao 2,4 D por 7 dias; a maior concentração sem efeito observado em termos de mortalidade foi de 12,4 mg/L, sendo que no final do experimento os indivíduos encontravam-se em estágio 25 (GOSNER, 1960; ARONZON *et al.*, 2010). Da mesma forma,

trabalhos realizados com peixes que testaram concentrações similares e maiores de 2,4D que a do presente estudo, não encontraram efeito significativo sobre a mortalidade. Por exemplo, em 30 dias de exposição a doses de até 108 mg/L de 2,4 D, não houve mortalidade significativa de larvas e juvenis de *Onchorhynchus mykiss* (FAIRCHILD *et al.*, 2009) e em 28 dias de exposição a 30 mg/L de 2,4-D não houve mortalidade significativa de larvas de *Oryzias latipes* (HOLCOMBE *et al.*, 1995). Conclui-se que as concentrações recomendadas de 2,4-D para uso em plantações de cana-de-açúcar não causaria efeito letal significativo para estas espécies de anfíbios e peixes.

Similarmente ao 2,4-D, as concentrações registradas para uso de metribuzim – de até 1,92 mg/L de ingrediente ativo - não causaram efeito letal significativo sobre nenhuma das duas espécies de anfíbios testadas. Não foram encontrados na literatura dados de exposição crônica para outras espécies de anfíbios, mas estudos realizados com peixes e invertebrados mostram o mesmo padrão de toxicidade encontrado no presente estudo. Por exemplo, juvenis de *Danio rerio* expostos por 28 dias a uma concentração de 1,5 mg/L de metribuzim apresentaram 10% de mortalidade, mas esta mortalidade não foi significativamente superior à do controle; o efeito letal significativo só ocorreu nas duas concentrações mais altas (33 e 53mg/L) (PLHALOVA *et al.*, 2012). Em outro estudo com embriões de *Cyprinus carpio* expostos por 30 dias, observou-se mortalidade de apenas 4% e 8,7% nas concentrações de 0,9 mg/L e 4 mg/L, respectivamente, sendo que o efeito letal significativo só foi observado na maior concentração (32mg/L) (STEPANOVÁ *et al.*, 2012). Para invertebrados não foi diferente: não houve nenhuma mortalidade dos neonatos de *Ceriodaphnia dubia* em concentração de 3,12 mg/L de metribuzim expostas por 7 dias (ORT *et al.*, 1994). Todos estes trabalhos apresentaram não mais que 10% de mortalidade para peixe, 0% para uma espécie de invertebrado e não mais que 3,3% para anuros, o que indica que o metribuzim não apresenta efeito letal em exposição prolongada nestas espécies quando utilizado dentro das recomendações de uso (1,44 e 1,92 mg/L, concentrações mínima e máxima, respectivamente).

Diferentemente de todos os outros compostos acima, a ametrina em sua concentração máxima permitida para uso (4 mg/L) causou mortalidade significativa sobre a única espécie testada, *H. pardalis* (68% de mortalidade). Não foi encontrado nenhum trabalho na literatura que retratasse a toxicidade de ametrina em exposição prolongada sobre anfíbios, porém encontraram-se dados para invertebrados, algas e

bactérias marinhas. Para invertebrados (*Daphnia magna*) expostos por 21 dias, a menor concentração sem efeito observado foi de 0,32 mg/L (PPDB, 2011); para algas (*Symbiodinium hystrix*) associadas a corais, houve uma inibição na fotossíntese e consequente mortalidade em dose de apenas 0,3 µg/L (JONES, 2005); e para bactérias marinhas (*Vibrio fischeri*) houve uma redução de 29% de sua bioluminescência depois de 18 dias de exposição a ametrina a 9,9 mg/L (FARRÉ *et al.*, 2002). Estes dados mostram que invertebrados e algas foram mais sensíveis que a espécie de anuro utilizada no presente estudo quando é considerada a concentração máxima recomendada para uso em plantações de cana-de-açúcar e que está acima do limite para sobrevivência destas espécies. Devido a falta de informação da toxicidade letal deste composto em exposição prolongada, não se pode afirmar se para outras espécies de anfíbios e para outros taxa a concentração máxima recomendada para uso teria o mesmo efeito observado para *H. pardalis*, mas deve-se considerar a possibilidade de haver outras espécies tão sensíveis quanto a utilizada neste trabalho e que portanto a ametrina poderia causar efeito letal significativo sobre elas.

Dentre os herbicidas manipulados no presente estudo, o acetocloro foi o que causou a maior mortalidade sobre *H. pardalis* (76%) quando na sua concentração máxima recomendada (3,34 mg/L). Concentrações próximas à manipulada neste trabalho também apresentaram efeito letal sobre *Ceriodaphnia affinis*, cujas fêmeas expostas a concentrações de 2 mg/L e 4 mg/L de acetocloro por 15 dias geraram ovos inviáveis na terceira geração (LOKHANSKAYA & SHCHERBAN, 2010). Por outro lado, concentrações muito menores das manipuladas neste trabalho causaram mortalidade em *Oncorhynchus mykiss*, (concentração sem efeito observado em 21 dias de exposição de 0,13 mg/L) e em *Daphnia magna* (concentração sem efeito observado em 21 dias de exposição de 0,022 mg/L; PPDB, 2011). Portanto, para *Hypsiboas pardalis* e *Ceriodaphnia affinis* o acetocloro apresenta toxicidade letal na concentração máxima recomendada para uso em canaviais, e para a truta arco-iris e *Daphnia* em concentrações muito menores.

Sabe-se que, além da mortalidade, a exposição a contaminantes em concentrações relativamente baixas, mas realistas, podem causar inúmeros efeitos subletais sobre os organismos que incluem mudanças fisiológicas, morfológicas e comportamentais (WEIS *et al.*, 2001). Reduções no crescimento e desenvolvimento de anfíbios expostos a herbicidas podem gerar diversas consequências negativas no modo de vida e no ganho energético destes organismos. Uma redução no crescimento de girinos os tornam mais

vulneráveis a predação, por apresentarem capacidade locomotora reduzida e menor deslocamento, que por sua vez também reduzirá a área de forrageamento e competição por alimento (RELYEA & HOVERMAN, 2006). Indivíduos menores também irão apresentar perdas competitivas com relação ao acasalamento, ocasionando em um sucesso reprodutivo reduzido, além de gerarem um número menor de ovos (BERVEN, 1990). Já a redução no desenvolvimento pode ocasionar riscos de dessecação por permanecerem em poças temporárias por períodos mais prolongados do que indivíduos com desenvolvimento mais rápido (NEWMAN & DUNHAM, 1994). Da mesma forma, girinos que estão submetidos a um prolongamento do período larval também acabam se expondo e ficando mais suscetíveis à agentes químicos, doenças e predação reduzindo as chances de sobrevivência.

No presente trabalho, não houve efeito do glifosato, do 2,4-D, do metribuzim e do acetocloro sobre o crescimento de *H. faber* e *H. pardalis*, mesmo nas doses máximas recomendadas para uso destes compostos. Apenas a ametrina levou a uma redução significativa no crescimento das larvas de *H. pardalis*, que apresentaram quase a metade da massa obtida pelos indivíduos do controle.

Com relação ao desenvolvimento, o glifosato, o 2,4-D e o metribuzim causaram uma redução significativa no desenvolvimento nas larvas de *H. faber*, sendo que os dois últimos na dose mínima recomendada, com também a dose máxima de 2,4-D. Na verdade, um pequeno retardo no desenvolvimento foi o único efeito observado, entre todas as 12 variáveis de resposta medidas, quando *H. faber* foi exposta a doses mínimas recomendadas para cultivo de cana-de-açúcar. Por sua vez, a exposição à dose máxima recomendada de ametrina e acetocloro teve forte efeito sobre o desenvolvimento de *H. pardalis*: larvas nestes tratamentos atingiram em média o estágio 28 de Gosner (GOSNER, 1960), quando comparado ao estágio 31 atingido por larvas no controle.

Outros trabalhos também demonstraram que herbicidas podem influenciar o crescimento e desenvolvimento de larvas de anfíbios. O glifosato na formulação Roundup não causou redução na massa final de *Rana sylvatica*, mas influenciou negativamente o desenvolvimento das larvas, prolongando o período para metamorfose (GAHL *et al.*, 2011). Para a mesma formulação também foi registrado uma extensão do período de desenvolvimento de *Bufo melanostictus* exposto às concentrações de 0,75 e 1 mg

ia/L (JAYAWARDENA *et al.*, 2011). Embora no presente estudo e nos estudos citados anteriormente o glifosato não tenha apresentado redução na massa dos girinos, Relyea *et al.* (2005) demonstraram que a mesma formulação Roundup reduziu até 41% da biomassa de três espécies de anfíbios. As concentrações manipuladas nos três experimentos citados acima e no presente estudo são próximas (0,48 e 2,4 mg/L no presente estudo; 0,21 e 2,89 mg ia/L em GAHL *et al.*, 2011; 1,3 mg ia/L em RELYEA *et al.*, 2005, respectivamente), podendo sugerir que em exposição prolongada o ingrediente ativo glifosato pode apresentar a mesmo grau de toxicidade que a formulação que contém outras substâncias inertes consideradas mais tóxicas que o ingrediente ativo glifosato para espécies de anfíbio.

Já para o composto 2,4-D, a exposição de embriões de *Rhinella arenarum* em estágio inicial até o momento em que completaram o estágio 25, ocasionou uma redução de 28% no seu desenvolvimento larval e crescimento (ARONZON *et al.*, 2010). No entanto, para peixes expostos por 30 dias a 7 mg/L de 2,4-D não foi observado nenhuma mudança no crescimento em relação ao controle (FAIRCHILD *et al.*, 2009). Para o composto metribuzim, foram encontrados dados de efeito sobre o crescimento e desenvolvimento para invertebrados e peixes, principalmente. Estudo realizado com *Daphnia magna* mostra que não houve alteração nem na massa e nem no desenvolvimento dos indivíduos quando expostos ao metribuzim, porém a maior concentração manipulada foi muito abaixo (0,1 mg/L) da menor concentração recomendada para uso de 1,44 mg/L (KASHIAN & DODSON, 2002). Stepanová *et al.* (2012) expuseram larvas de *Cyprinus carpio* por 30 dias ao metribuzim e registraram uma diminuição de massa em todas as concentrações (0,9 mg/L a 32 mg/L), como também um retardamento no desenvolvimento e uma inibição de 11,6% do crescimento na menor concentração manipulada. Os resultados de outro trabalho com peixes mostram que a espécie *Danio rerio* exposta por 28 dias ao metribuzim apresentou uma redução no crescimento a partir de 16 mg/L de metribuzim, mas esta diminuição só foi significativa nas duas maiores concentrações utilizada (33 e 53 mg/L) (PLHALOVA *et al.*, 2012).

Para a ametrina não foram encontrados dados de efeitos sobre o crescimento e desenvolvimento de anfíbios, mas a atrazina, composto pertencente ao mesmo grupo de substância das triazinas, não causou alterações no crescimento e desenvolvimento de *Limnodynastes tasmaniensis* exposta por 4 semanas a concentrações de 0,1 a 30 µg/L (SPOLYARICH *et al.*, 2010). Da mesma forma, larvas de *Xenopus laevis*

expostas à maior concentração de 25 µg/L (CARR *et al.*, 2003) e larvas de *Rana pipiens* expostas a 0,2 mg/L de atrazina (ALLRAN & KARASOV, 2000) não apresentaram redução no desenvolvimento e nem no crescimento. Entretanto, as concentrações de atrazina que não causaram nenhum efeito sobre estas variáveis são muito menores do que as recomendadas para uso de ametrina. Por outro lado, em concentrações maiores (2 mg/L) e mais próximas às do presente estudo, larvas de *Hyla versicolor* apresentaram uma redução de 10% da massa e um aumento de 5% no período larval na maior concentração (DIANA *et al.*, 2000).

No presente estudo o acetocloro – testado apenas para *H. pardalis* – levou a uma diminuição não-significativa na massa e uma diminuição significativa no desenvolvimento das larvas. Para larvas de *Rana pipiens*, o acetocloro não causou nenhum efeito sobre o crescimento e o desenvolvimento (CHEEK *et al.*, 1999). Já para duas espécies de cladóceros, o desenvolvimento dos juvenis de *Ceriodaphnia affinis* foi mais lento, atrasando também o crescimento em concentrações de 2 e 4 mg/L (LOKHANSKAYA & SHCHERBAN, 2010) e para *Daphnia magna*, adultos expostos a apenas 0,1 mg/L apresentaram menor crescimento (KASHIAN & DODSON, 2002). Da mesma forma em que o acetocloro não apresentou efeito significativo sobre o crescimento de *H. pardalis*, o composto alacloro, pertencente ao mesmo grupo das cloroacetaminas, não influenciou o crescimento de *Carassius auratus* expostos a no máximo 0,5 mg/L (YI *et al.*, 2007) e nem o crescimento de *Cyprinus carpio* a uma concentração de 2,4 mg/L de alacloro (MIKULA *et al.*, 2009).

A exposição a herbicidas pode alterar também o comportamento de anfíbios, através de alterações diretas no sistema nervoso central e periférico (WEIS *et al.*, 2001), genericamente denominadas efeitos neurotóxicos. Efeitos neurotóxicos podem se manifestar por sinais e sintomas severos no organismo causados por agentes químicos, biológicos e/ou por fatores abióticos (COSTA *et al.*, 2008), sendo comuns os efeitos neurotóxicos causados por contaminantes. Por exemplo, girinos expostos a α -cipermetrina apresentaram anormalidades no comportamento como diminuição à reação ao contato, espasmos e movimentos em círculos (GREULICH & PFLUGMACHER, 2003).

Nesta dissertação, quantificamos como variável comportamental a taxa de atividade dos indivíduos expostos a contaminantes. Esta variável foi escolhida pelo papel fundamental que taxa de atividade exerce

em diversas atividades relacionadas à aptidão darwiniana, como na mediação do tradeoff entre evitar predadores e obter alimento (ANHOLT *et al.*, 1996; RELYEA & WERNER, 1999; RELYEA, 2005).

De um modo geral, no presente estudo os indivíduos de *H. faber* foram mais ativos que *H. pardalis*, com uma diferença de 10% entre as espécies nos controles. *H. faber* não apresentou nenhuma alteração no comportamento quando exposta aos herbicidas, mesmo nas doses máximas recomendadas. Por outro lado, a ametrina e o acetocloro causaram efeito significativo sobre as larvas de *H. pardalis*. A atividade desta espécie foi reduzida a 6% quando exposta a 4 mg/L de ametrina e a 7% quando exposta a 3,3 mg/L de acetocloro. Em ambos os tratamentos os girinos permaneceram a maior parte do tempo imóveis no fundo do aquário. Estas alterações comportamentais foram observadas em girinos de *Rana pipiens* e *Bufo americanus* expostos à atrazina, que apresentaram lentidão na locomoção e debilitação nos sentidos (HOWE *et al.*, 1998).

O estudo dos efeitos de contaminantes em níveis de organização mais basais como moléculas, células e tecidos podem ajudar a esclarecer seus mecanismos de ação bem como o porquê induzem diferentes níveis de efeito sobre as espécies (WEIS *et al.*, 2001). Para alguns pesticidas dos grupos dos organofosforados e carbamatos sabe-se que seus efeitos tóxicos envolvem mudanças nas atividades de B-esterases, como a acetilcolinesterase (AChE), e de glutathione S-transferase (GST), que são neurotransmissores (LEITE *et al.*, 2010; LAJMANOVICH *et al.*, 2010; 2011). Estes pesticidas agem sobre os receptores destas enzimas, podendo inibir as sinapses durante uma transmissão nervosa e impedindo que haja um feedback positivo para execução da função de estímulos nervosos e sensoriais e desintoxicação bioquímica (AMIARD-TRIQUET *et al.*, 2013). Além disso, o efeito dos compostos pode gerar mudança nos níveis dos neurotransmissores que pode aumentar ou diminuir, representando um estímulo à enzima frente à presença de um agente tóxico ou uma inibição quando o agente tóxico se liga ao receptor interrompendo a realização de sinapses (WEIS *et al.*, 2001).

Nenhum dos herbicidas manipulados no presente estudo é considerado inibidor de colinesterases (PPDB, 2011). Entretanto, o metribuzim na concentração máxima recomendada para uso em canaviais inibiu a atividade enzimática de AChE de *H. faber* em 67% em relação ao controle. Em confronto aos dados

publicados em base de dados, a inibição de AChE por metribuzim indica que não é possível estabelecer um padrão consistente entre as espécies e taxa, pois há uma variabilidade na sensibilidade das espécies a cada pesticida e conseqüentemente uma variabilidade na resposta das enzimas frente a tal exposição (LAJMANOVICH *et al.*, 2010).

Por outro lado, para *H. pardalis* observou-se uma indução das atividades de AChE pelos compostos glifosato (aumento de 37%), 2,4-D (aumento de 39%) e ametrina (aumento de 3x). Os girinos expostos ao acetocloro apresentaram atividade de AChE ainda mais alta, porém para este composto o efeito não foi significativo devido à alta variabilidade dos dados. A atividade de GST de *H. faber* e *H. pardalis* permaneceu inalterada pela exposição ao glifosato, 2,4-D e metribuzim, mesmo nas doses máximas recomendadas para cultura de cana-de-açúcar. Por sua vez, larvas de *H. pardalis* expostas à ametrina e ao acetocloro tiveram indução da atividade de GST de 64% e 57%, respectivamente. Respostas variadas destas duas enzimas foram encontradas em outros estudos quantificando respostas enzimáticas de organismos aquáticos expostos aos herbicidas manipulados. Por exemplo, larvas de *Rhinella arenarum* expostas ao glifosato tiveram atividade de AChE e GST inibidas (LAJMANOVICH *et al.*, 2011); peixes (*Carassius auratus*) expostos ao alacloro tiveram a atividade de GST induzida com um aumento máximo de 44% (YI *et al.*, 2007); outra espécie de peixe (*Leporinus obtusidens*) exposta a 1 e 10 mg/L de 2,4-D apresentou inibição enzimática de AChE no músculo e no cérebro apenas na maior concentração (FONSECA *et al.*, 2008); e carpas (*Cyprinus carpio* L.) expostas à atrazina apresentaram depois de 40 dias inibição enzimática de AChE nos rins (XING *et al.*, 2013).

Os resultados encontrados no presente trabalho e na literatura podem indicar que os níveis de AChE e GST são dependentes da concentração e do composto. Portanto para as concentrações máximas recomendadas de glifosato, 2,4-D e ametrina a atividade enzimática de AChE em *H. pardalis* é mantida e elevada em resposta à presença de composto tóxico. Por outro lado, a concentração do metribuzim agiu de forma mais severa sobre o neurotransmissor AChE, inibindo sua ação no período de 23 dias de exposição ou até podendo ocorrer degradação da enzima. Alguns trabalhos verificaram a capacidade de recuperação da atividade enzimática após o término de exposição aos pesticidas, demonstrando que esta capacidade é dependente da concentração, do tempo de exposição e até da idade dos organismos, sendo os jovens mais

capazes de se recuperar do que os adultos (VIOQUE-FERNADEZ *et al.*, 2007; LEITE *et al.*, 2010; XING *et al.*, 2013). Mas, deve-se lembrar de que neste trabalho houve troca total da solução a cada 7 dias e que portanto os girinos foram expostos constantemente as mesmas concentrações ao longo do experimento não permitindo uma recuperação por diminuição da concentração ou quebra do composto em subprodutos por longo período.

A atividade de GST foi induzida pelas concentrações máximas recomendadas para uso de ametrina e acetocloro. Os níveis de GST também são dependentes da concentração do composto, onde um aumento da sua síntese pode ocorrer em resposta a um mecanismo de adaptação por exposição a um estresse oxidativo relativamente baixo. Porém, quando este estresse torna-se severo pode suprimir os níveis de GST (YI *et al.*, 2007). Portanto, no caso da ametrina e do acetocloro, as concentrações utilizadas não causaram danos severos a atividade desta enzima, sendo o aumento consequência da exposição e tentativa de detoxificação.

O estudo do perfil leucocitário é outro método de ensaio utilizado para analisar o efeito dos pesticidas como agentes estressores em nível celular e que traz informações importantes dos efeitos sobre o sistema imunitário. Podem detectar efeitos de imunossupressão, quando decai a resistência do organismo ou imunoestimulação quando há hipersensibilidade na resistência do organismo pelo aumento de células fagocitárias (AMIARD-TRIQUET *et al.*, 2013).

No presente trabalho não se observou nenhuma alteração significativa do perfil leucocitário aos herbicidas manipulados nas concentrações recomendadas para uso em plantações de cana-de-açúcar. Houve uma tendência não-significativa à diminuição na porcentagem de neutrófilos e na razão neutrófilos/linfócitos do controle para o 2,4-D, e do 2,4-D para o metribuzim. Também houve uma tendência não significativa para a diminuição na porcentagem de eosinófilos e basófilos do controle para os três herbicidas manipulados. Outros estudos que analisaram perfil leucocitário de anfíbios registraram uma variedade de alterações decorrentes da exposição a pesticidas. Por exemplo, Shutler & Marcogliese (2011) extraíram amostra de sangue de anuros adultos (*Lithobates pipiens*) expostos à atrazina e ao metolacoloro e encontraram uma menor porcentagem de eosinófilos, porém não houve diferença na porcentagem de

neutrófilos e linfócitos; girinos da mesma espécie tiveram sua quantidade de linfócitos suprimida quando expostos a uma mistura de pesticidas que continha atrazina e metribuzim (CHRISTIN *et al.*, 2004); indivíduos de *Rhinella arenarum* expostos a pesticidas apresentaram um aumento na porcentagem de linfócitos (CABAGNA *et al.*, 2005); em uma revisão da toxicidade de 2,4-D realizada por Garabrant & Philbert (2002) eles citam que não há evidências deste composto alterar o sistema imunológico em mamíferos.

Esta variedade de resultados pode ser explicada pela diferença existente na metodologia dos experimentos realizados tanto em campo quanto em laboratório, envolvendo principalmente diferenças no manuseio dos indivíduos que por si só podem gerar estresse ao organismo. Além disso, a localização anatômica da extração da amostra de sangue nos indivíduos parece interferir nos resultados do perfil leucocitário, como por exemplo, a maior porcentagem encontrada de linfócitos no sangue periférico quando comparado à amostra retirada diretamente do coração (SHUTLER & MARCOGLIESE, 2011). É importante ressaltar também a evidência na diferença do perfil leucocitário entre os sexos em época de reprodução (FRENCH & MOORE, 2008) onde estão envolvidas alterações hormonais, bem como nos estágios de metamorfose e por esta razão não se sabe ao certo como o perfil leucocitário se comporta frente a diferenças na ontogenia (SHUTLER & MARCOGLIESE, 2011).

Davis e colaboradores (2008) ressaltam a importância da análise das outras células como eosinófilos e monócitos, além da análise usual da razão neutrófilo:linfócito, pois segundo os autores uma redução na quantidade de eosinófilos pode indicar uma resposta a exposição a um estresse do que uma resposta a uma doença. O que de fato foi observado no presente estudo entre o controle e os tratamentos, mas não foi significativamente diferente. Recomenda-se também para estudos futuros que juntamente a análise de perfil leucocitário, seja analisada as alterações morfológicas do indivíduo, bem como alterações das células, pois em observação pessoal relatou-se abdômen estendido em alguns indivíduos e a lise ou deformidade das células.

Com relação as propriedades físico-químicas da água registradas nos dois experimentos crônicos, observou-se uma variação em todos os dados entre os experimentos. A diferença encontrada na

concentração de oxigênio pode ser devido a instalação de compressores de ar no experimento com *H. pardalis*. Esta medida foi tomada justamente por ter sido registrado na primeira semana do experimento uma diminuição do oxigênio e aumento de turbidez, o que não ocorreu no experimento com *H. faber*. Esta variação da água na primeira semana de experimento não interferiu na mortalidade dos indivíduos de *H. pardalis* quando comparamos estatisticamente a letalidade antes e após instalação dos compressores de ar. Após a instalação dos compressores, os níveis de oxigênio dissolvido aumentaram para 3,2mg/L e consequentemente a condutividade foi mais baixa quando comparada ao experimento de *H. faber*. Os valores de pH também foram menores no experimento de *H. pardalis* do que no de *H. faber*. A presença dos compostos em água por si só já fazem com que o meio torne-se mais ácido (RELYEA & HOVERMAN, 2006), sendo visível entre os resultados dos tratamentos e do controle. Devido a movimentação da coluna d'água gerada pelos compressores, fez com que os compostos se mantivessem por mais tempo na superfície e com isso sendo registrados valores de pH mais baixos (JONES *et al.*, 2011), uma vez que as medições foram realizadas a uma profundidade de no máximo 15 cm (comprimento da sonda).

Considerando que todos os compostos apresentam degradação em meio aeróbico no mínimo 10 dias para mais e hidrólise acima de 365 (PPDB, 2011) e que a cada sete dias trocou-se toda a solução dos tratamentos, pode-se dizer que a instalação de compressores de ar não influenciou na quebra dos compostos em seus subprodutos.

As concentrações utilizadas no presente estudo são consideradas de grande relevância ecológica, uma vez que são concentrações recomendadas pelas indústrias e por isso são concentrações realistas para uso em plantações de cana-de-açúcar. Além disso, as concentrações foram convertidas para um cenário de contaminação de uma poça de 10 cm de profundidade, inseridas num canavial. Esta profundidade é mais próxima de um cenário realista das poças encontradas em cultura de cana-de-açúcar e colonizadas por anfíbios (ver exemplo na Figura 2). Trabalhos que analisaram amostras ambientais encontraram concentrações de herbicidas menores da utilizada no presente estudo. Por exemplo, Thompson *et al.* (2004) encontraram concentrações médias de glifosato de 0,33 mg/L e um máximo de 1,95mg/L em lagos que receberam aplicações diretas deste pesticida; em córregos e lagoas rodeadas de plantações em Washington, nos Estados Unidos, foram encontradas concentrações máximas de 0,32mg/L de glifosato,

0,02mg/L de atrazina e 0,77µg/L de 2,4-D (BATTAGLIN *et al.*, 2009); concentrações de 1µg/L de ametrina, 0,22 µg/L de acetocloro e 0,12 µg/L de alacloro foram registradas em estuários da França (CAQUE *et al.*, 2013). Estas concentrações provavelmente não causariam letalidade sobre anfíbios e peixes, mas talvez para invertebrados e algas, no entanto deve-se ressaltar que todos estes trabalhos analisaram amostras de grandes rios e lagos, onde há um maior aporte de água para diluição destes compostos, o que não é observado em brejos, poças e lagoas, pois apresentam um volume menor de água e baixa renovação.

Somado ao fato de que os corpos d'água de plantações de cana-de-açúcar são de pequeno porte e temporários e que a maioria dos anfíbios os utilizam em seu ciclo de vida, há o período de aplicação dos pesticidas que coincide com o período de reprodução de muitas espécies de anfíbios. Na maioria das plantações de cana-de-açúcar é aderido o uso do sistema de um ano e meio, com aplicações de pesticidas logo no início do ciclo do cultivo que ocorre entre os meses de janeiro e março, o que coincide, por exemplo, com o período de reprodução de *H. faber* que é entre setembro e março e com pico em janeiro e fevereiro; com a reprodução de *H. pardalis* que ocorre entre julho e janeiro; como também com a reprodução de *P. cuvieri* que ocorre entre outubro e março. Considerando este cenário, deve-se ainda lembrar que uma quantidade variada de herbicidas, bem como outros grupos de pesticidas (por exemplo, inseticidas e fungicidas), são utilizados ao mesmo tempo (ARMAS *et al.*, 2005; MANN *et al.*, 2009) aumentando o impacto sobre os anfíbios (RELYEA, 2009).

No que diz respeito à comparação dos efeitos dos compostos nos experimentos de exposição aguda com os experimentos de exposição crônica, pode-se notar que o ranqueamento dos compostos é diferente em relação à letalidade dos organismos. Nos experimentos de exposição aguda o composto menos tóxico foi o glifosato, seguido do metribuzim, ametrina e acetocloro sendo este o mais tóxico tanto para *P. cuvieri*, quanto para *H. pardalis*. Já nos experimentos de exposição crônica o composto menos tóxico para ambas as espécies estudadas foi o metribuzim, seguido do 2,4-D e o glifosato, sendo este o mais tóxico para *H. faber* e depois seguindo a sequência para *H. pardalis*, ametrina e acetocloro sendo este último o mais tóxico para esta espécie. Portanto, nota-se que os compostos considerados menos tóxicos em exposição aguda podem ser considerados mais tóxicos quando utilizados em experimento com exposição mais prolongada, como por exemplo o glifosato que foi o composto menos tóxico em concentrações altas e

exposição de 96h, porém em concentrações realistas e exposição de 23 dias apresentou ser mais tóxico ficando em terceiro lugar para *H. pardalis* e em primeiro lugar para *H. faber*, com a ressalva de que para esta última espécie a mortalidade não foi significativa. Por outro lado, os compostos considerados mais tóxicos em exposição aguda, como a ametrina e o acetocloro, mantiveram suas posições em experimento de exposição prolongada.

Esta evidência se torna de grande importância quando abrangemos estes resultados somados aos efeitos subletais para a compreensão da dinâmica populacional de anfíbios. Um dos compostos mais tóxicos, a ametrina, além de poder causar um efeito direto sobre a densidade de *H. pardalis*, os girinos que sobreviveram a exposição prolongada deste composto, apresentaram um menor crescimento e desenvolvimento em relação aos girinos do controle, como também tiveram as atividades enzimáticas de AChE e GST aumentadas. Em consequência da alta atividade enzimática em resposta do sistema nervoso para a detoxificação do organismo, pode ter gerado um aumento no custo metabólico em função do aumento da síntese de proteínas (VENESKY *et al.*, 2011) e por consequência houve uma redução na taxa de atividade, como também uma redução no ganho energético e uma desregulação hormonal influenciando o desenvolvimento. Ou seja, considerando apenas o fator exposição ao herbicida, os girinos desta espécie em um ambiente aquático por apresentarem baixa mobilidade, eles estariam mais suscetíveis a predação e o espaço de forrageamento seria reduzido. Por serem menores e seu desenvolvimento ser mais lento aumentando assim o período larval, haveria perdas competitivas para reprodução quando adultos, um maior risco a predação, doenças e ao dessecamento em poças temporárias.

Estas consequências poderiam ser observadas da mesma forma para os girinos de *H. pardalis* que foram expostos ao acetocloro e para os girinos de *H. faber* expostos ao glifosato, 2,4-D e metribuzim. Entretanto, em um ecossistema aquático os indivíduos não estão expostos somente a agentes químicos, mas também a outros fatores bióticos e abióticos gerando um cenário de estresse múltiplo. Trabalhos que avaliaram os efeitos cruzados dos pesticidas com fatores biótico e/ou abióticos mostram que o efeito dos compostos sobre as espécies de anfíbios pode ser potencializado ou não, como por exemplo, na presença de fungos e parasitas (ROHR *et al.*, 2008; BUCK *et al.*, 2012); na presença de radiação ultravioleta (PUGLIS & BONNE, 2011); em diferentes níveis de pH (EDGINTON *et al.*, 2004) e disponibilidade de alimentos

(CHEN *et al.*, 2008); na presença de predadores (RELYEA, 2012) e em diferentes densidades da espécie aumentando o estresse por competitividade (BONNE & JAMES, 2003; JONES *et al.*, 2010).

Por outro lado, foram observados na literatura que poucos são os estudos voltados para a análise dos ingredientes ativos dos herbicidas utilizados no presente estudo, principalmente em cenários de estresse múltiplo. Ficou evidente neste trabalho que os ingredientes ativos podem ser responsáveis pela toxicidade encontrada nas formulações, uma vez que em concentrações baixas e em exposições prolongadas causaram efeitos subletais aos girinos o que pode levar a severas consequências no seu ciclo de vida. Um exemplo importante é o glifosato, que por apresentar baixíssima toxicidade letal em concentrações altas e em exposição aguda, é considerado como um ingrediente ativo sem muita relevância toxicológica quando tratamos de avaliar as formulações que o compõem. O que seria equivocado, uma vez que foi provado que em concentrações realistas de aplicação este composto pode causar mortalidade e interferir no sistema nervoso gerando modificações no desenvolvimento, dependendo da espécie. Portanto, estudos futuros que avaliem a toxicidade dos ingredientes ativos frente à interação com outros fatores externos estressantes trarão novas respostas para uma melhor avaliação do risco ambiental por contaminação de herbicidas.

Por último, mas não menos importante, deve-se considerar quando avaliamos o efeito dos pesticidas sobre uma comunidade, a diferença na sensibilidade interespecífica a estes compostos. No presente estudo, a espécie *H. pardalis* se mostrou ser mais sensível que *P. cuvieri* e *H. faber* nos dois modos de exposição. Esta diferença pode ser explicada pelo fato de *H. pardalis* apresentar uma distribuição mais restrita e por isso não ser tão bem adaptada a variações ambientais quanto *P. cuvieri* e *H. faber*. Da mesma forma que através dos experimentos deste trabalho podemos evidenciar esta diferença na sensibilidade entre espécies, é muito provável que esta característica seja observada em muitas outras espécies e que este fato pode levar a mudanças na estrutura de comunidades, uma vez que algumas espécies são eliminadas por um pesticida específico e outras mais tolerantes se tornam dominantes (Relyea, 2005).

5. Conclusão

O presente trabalho teve como objetivo testar a hipótese de que os principais herbicidas utilizados na cultura de cana-de-açúcar no Brasil, embora desenvolvidos especificamente para o controle de ervas daninhas, são capazes de causar danos letais e subletais a larvas de anfíbios mesmo em cenários de exposição que são compatíveis com as recomendações agrônômicas de uso adequado. Esta hipótese foi de forma geral corroborada, uma vez que todos os herbicidas testados causaram algum efeito, seja ele letal e/ou subletal, sobre os girinos de espécies nativas. Estes efeitos por sua vez, podem ocasionar além de consequências diretas a estas espécies, consequências indiretas a uma comunidade e um desequilíbrio ecológico.

Em exposição aguda, todos os compostos manipulados – glifosato, ametrina, metribuzim e acetocloro – levaram à mortalidade de larvas de anfíbios, embora alguns deles apenas em concentrações bastante elevadas. Uma comparação com os dados disponíveis da toxicidade dos mesmos herbicidas para outras espécies de anfíbios, e para outros animais aquáticos como peixes e dafnídeos, sugere que as espécies testadas nesta dissertação tendem a ser relativamente robustas. Apesar dos experimentos de exposição aguda serem muito úteis na comparação da sensibilidade interespecífica e com isso os resultados servirem como indicativo das espécies mais suscetíveis à contaminantes (KERBY *et al.*, 2009), deve-se ressaltar que as respostas obtidas nestes tipos de experimentos não abrangem um cenário completo de exposição das espécies frente à compostos tóxicos. Além disso, muitos efeitos só se manifestam a períodos mais prolongados de exposição. Desta forma, para os experimentos de exposição aguda, as espécies testadas se mostraram mais robustas que outras taxas, bem como outras espécies de anfíbios em uma revisão realizada por Kerby *et al.* (2009), porém deve-se ter cautela ao considerar este fato como verdadeiro e único, pois quando são analisados a interação de outros fatores bióticos e abióticos, e a utilização de certo contaminante sobre a comunidade, os efeitos podem ser mais severos, mesmo sobre as espécies antes consideradas robustas.

Conforme esperado, um prolongamento da exposição condicionou efeitos de mortalidade em concentrações muito inferiores àquelas necessárias para causar efeito em exposição aguda. Por exemplo,

mais de 100 mg/L de glifosato foram necessários para causar mortalidade de 50% da população experimental de *Hypsiboas pardalis* ao longo de 96h; mas 2,4 mg/L foram suficientes para causar 15% de mortalidade ao longo de 23 dias de exposição. É de se esperar, portanto, que mortalidade adicional viria a ser detectada se fossem manipulados períodos de exposição ainda maiores; tal observação é particularmente relevante para espécies de longo período de desenvolvimento larval, como *H. faber*.

De forma similar, todos os compostos manipulados tiveram algum tipo de efeito subletal. Glifosato, 2,4-D e metribuzim retardaram significativamente o desenvolvimento de *H. faber*, enquanto que ametrina, testada apenas para *H. pardalis*, levou a uma diminuição no ganho de massa e no estágio de desenvolvimento final atingido pelas larvas. A atividade de AChE foi inibida pelo metribuzim em *H. faber* e estimulada pelo glifosato, ametrina e 2,4-D em *H. pardalis*; por sua vez, a atividade de GST, inalterada pela exposição a herbicidas em *H. faber*, foi estimulada pela ametrina e pelo acetocloro em *H. pardalis*. Nenhum composto induziu alterações significativas no perfil leucocitário. Herbicidas também tiveram efeitos comportamentais: a taxa de atividade de *H. pardalis* foi significativamente reduzida sob exposição à ametrina e ao acetocloro.

Esta dissertação sugere, portanto, que a exposição a doses recomendadas para uso dos principais herbicidas utilizados em cultura de cana-de-açúcar no Brasil pode causar efeitos letais e subletais em larvas de espécies nativas de anfíbios. Alguns destes efeitos subletais, como uma diminuição nas taxas de atividade, de crescimento e de desenvolvimento, podem ter importantes consequências diretas para o sucesso dos indivíduos, como por exemplo, diminuir a sua performance, prolongar o período larval e reduzir o sucesso reprodutivo, modificando assim todo o ciclo de vida e ecologia da espécie, além de causar efeitos indiretos na comunidade.

Estudos futuros devem buscar realismo adicional rumo a uma análise de risco para larvas de anfíbios da contaminação ambiental por herbicidas. Este trabalho mostrou a importância do estudo dos efeitos dos ingredientes ativos, porém a busca por realismo deveria incluir a manipulação não apenas de ingredientes ativos, mas também de formulações comerciais, afinal, é nesta forma que herbicidas são aplicados no campo. A importância do teste com formulações comerciais pode ser bem ilustrada pelo

glifosato, cujas formulações tendem a ser mais tóxicas que o ingrediente ativo. Outro componente importante para a incorporação de realismo é o monitoramento e manipulação de concentrações efetivamente medidas em campo. Estudos que analisaram amostras ambientais encontraram concentrações de herbicidas menores que as utilizadas no presente estudo. Por exemplo, Thompson *et al.* (2004) encontraram concentrações médias de glifosato de 0,33 mg/L e um máximo de 1,95mg/L em lagos que receberam aplicações diretas deste pesticida; em córregos e lagoas rodeadas de plantações em Washington, nos Estados Unidos, foram encontradas concentrações máximas de 0,32mg/L de glifosato, 0,02mg/L de atrazina e 0,77µg/L de 2,4-D (BATTAGLIN *et al.*, 2009); concentrações de 1µg/L de ametrina, 0,22µg/L de acetocloro e 0,12µg/L de alacloro foram registradas em estuários da França (CAQUE *et al.*, 2013). No entanto deve-se ressaltar que todos estes trabalhos analisaram amostras provenientes de grandes rios e lagos, onde há um maior aporte de água e, portanto diluição de contaminantes. Tal cenário desvia de forma pronunciada do que é observado em brejos e lagoas, e, especialmente, nas pequenas poças temporárias inseridas em canaviais onde frequentemente encontramos larvas de anfíbios. Deve-se lembrar também que um crescente corpo de evidência mostra que a interação entre estressores químicos, físicos ou biológicos, frequentemente de natureza sinérgica, tem grande influência sobre a performance dos organismos e precisa, portanto, ser também testada.

Por fim, considerando as espécies utilizadas no presente estudo e os testes manipulados, sugere-se para estudos futuros a utilização da espécie *P. cuvieri* quando a finalidade for testar os efeitos letais em exposição aguda, além da obtenção de resultados morfológicos e comportamentais. Esta espécie se mostrou ser menos sensível que *H. pardalis*, fator importante em experimentos que manipulam altas concentrações. Ao mesmo tempo, *P. cuvieri* apresenta um período mais extenso de reprodução e fácil obtenção das desovas, fornecendo um grande número de indivíduos necessários para este tipo de experimento. Por outro lado, caso a finalidade for testar efeitos subletais, recomenda-se o uso da espécie *H. pardalis*, pois foi mais sensível aos agrotóxicos, e apresenta características importantes para este tipo de experimento, como por exemplo, ser de médio porte, necessário para a realização de certos testes que exigem maior massa, gera um grande número de indivíduos por desova, sendo necessárias poucas desovas para o desenvolvimento do teste e são encontradas em maior número que *H. faber*. Considerando a busca

por métodos que respondam um maior número de questões possíveis dos efeitos de pesticidas sobre anfíbios, os testes de exposição crônica são os mais recomendados, podendo obter respostas fisiológicas, morfológicas e comportamentais, além da disponibilidade da adição de testes de efeitos de biomarcadores, que dentre os utilizados no presente estudo, o teste de análise da atividade enzimática se mostrou mais expressivo. Estes testes permitem respostas mais precisas da ação do composto sobre o indivíduo e de forma indireta sobre o ecossistema em que estão inseridos.

6. Referências Bibliográficas

- AGEITEC. Agência Embrapa de Informação Tecnológica. 2011. Árvore do Conhecimento da cana-de-açúcar. 2011. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/cana_de_acucar.html>. Acesso em 07 maio 2013.
- AGEITEC. Agência Embrapa de Informação Tecnológica. 2013. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/03_000fxggj1i702wyiv80soht9h0kawrk0.pdf>. Acesso em 10 maio 2013.
- AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. 2011. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em 17 set 2011
- ALFORD, R. A. Declines and the global status of amphibians. 2010. In: Sparling, D. W.; Linder, G.; Bishop, C. A. & Krest, S. K. (Eds.). *Ecotoxicology of amphibians and reptiles*. 2ed. SETAC, p. 13-45.
- ALLRAN, J. W., & KARASOV, W. H. 2000. Effects of atrazine and nitrate on northern leopard frog (*Rana pipiens*) larvae exposed in the laboratory from posthatch through metamorphosis. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(11), 2850-2855.
- AMIARD-TRIQUET C.; AMIARD J-C; RAINBOW P. S. 2013. Ecological Biomarkers-Indicators of ecotoxicological effects. Ed. CRC Press Taylor & Francis Group. 450pg.
- ANDRADE, G. V. de. 1995. A história de vida de *Physalaemus cuvieri* (anura:Leptodactylidae) em um ambiente temporário. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas.
- ANHOLT, B. R., SKELLY, D. K., & WERNER, E. E. 1996. Factors modifying antipredator behavior in larval toads. *Herpetologica*, 301-313.
- ANVISA. SIA - Sistema de Informações sobre Agrotóxicos. 2000. Disponível em: <http://www4.anvisa.gov.br/AGROSIA/asp/frm_dados_ingrediente.asp?iVarAux=1&CodIng=219>. Acesso em 11 out. 2010.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). 2010. Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimento (PARA) - Relatório de atividades de 2009. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 22pp. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d214350042f576d489399f536d6308db/RELAT%C3%93RIO+DO+PARA+2009.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em 14 ago. 2010.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). 2013. Monografias de agrotóxicos. Disponível em: <<http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/i>>. Acesso em 02 jun. 2013.

- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). 2013a. Critérios de classificação toxicológica. Disponível em: <<http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/bUI0>>. Acesso em 02 jun. 2013.
- APHA-AWWA-WEF. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION & WATER ENVIRONMENT FEDERATION. 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21sted. American Public Health Association, Washington, D.C.
- ARMAS, E. D.; MONTEIRO, R. T. R.; AMÂNCIO, A. V.; CORREIA, R. M. L.; GUERCIO, M. A. 2005. Uso de agrotóxico em cana-de-açúcar na bacia de Rio Corumbataí e o risco de poluição hídrica. *Química Nova*. 28(6): 975-982.
- ARONZON, C. M.; SANDOVAL, M. T.; HERKOVITS J.; PÉREZ-COLL, C. S. 2010. Stage-Dependent Toxicity of 2,4-Dichlorophenoxyacetic on the Embryonic Development of a South American Toad, *Rhinella arenarum*. *Environmental Toxicology*. DOI 10.1002/tox.20564.
- ASTM. American Society for Testing and Materials. Active standard: E1439-98. 2004. Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus (FETAX).
- BATTAGLIN, W. A.; RICE, K. C.; FOCAZIO, M. J.; SALMONS S.; BARRY R. X. 2009. The occurrence of glyphosate, atrazine, and other pesticides in vernal pools and adjacent streams in Washington, DC, Maryland, Iowa, and Wyoming, 2005-2006. *Environ. Monit. Assess.* 155:281-307.
- BERNAL, M. H.; SOLOMON, K. R.; CARRASQUILLA, G. 2009. Toxicity of Formulated Glyphosate (Glyphos) and Cosmo-Flux to Larval and Juvenile Colombian Frogs 2. Field and Laboratory Microcosm Acute Toxicity. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Parte A*. 72: 966-973.
- BERTOLUCI, J.; RODRIGUES, M. T. 2002. Seasonal patterns of breeding activity of Atlantic Rainforest anurans at Boracéia, Southeastern Brazil. *Amphibia-Reptilia*. 23: 161-167.
- BERVEN, K. A. 1990. Factors affecting population fluctuations in larval and adult stages of the wood frog (*Rana sylvatica*). *Ecology*, 71(4), 1599-1608.
- BIDWELL, J. R.; GORRIE, J. R. 1995. Acute toxicity of a herbicide to selected frog species. Department of Environmental Protection, Technical Series 79, Perth.
- BONNE, M. D. & BRIDGES, C. M. 2003. Effects of pesticides on amphibian populations. In: *Amphibian Conservation*. Smithsonian Books Washington and London. p. 152-167.
- BONNE, M. D. & JAMES S. M. 2003. Interactions of an insecticide, herbicide, and natural stressors in amphibian community mesocosms. *Ecological Applications*. 13(3): 829-841.

- BUCK, J. C.; SCHEESSELE, E. A. REAYLEA, R. A.; BLAUSTEIN, A. R. 2012. The effects of multiple stressors on wetland communities pesticides, pathogens and competing. *Freshwater Biology*. 57: 61-73.
- CAIRS, J. JR. 1986. The Myth of the Most Sensitive Species. *BioScience*, 36(10): 670-672.
- CANASAT. Monitoramento da cana-de-açúcar. 2012. Disponível em: <dsr.inpe.br>. Acesso em 17 maio 2013.
- CAQUET, T.; ROUCAUTE, M.; MAZZELLA, N.; DELMAS, F.; MADIGOU, C.; FARCY, E.; BURGEOT T.; ALLENOU J. P.; GABELLEC R. 2013. Risk assessment of herbicides and booster biocides along estuarine continuums in the Bay of Vilaine area (Brittany, France). *Environ. Sci. Pollut Res*. 20:651–666.
- CARR, J. A., GENTLES, A., SMITH, E. E., GOLEMAN, W. L., URQUIDI, L. J., THUETT, K., & VAN DER KRAAK, G. 2003. Response of larval *Xenopus laevis* to atrazine: assessment of growth, metamorphosis, and gonadal and laryngeal morphology. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22(2), 396-405.
- CHEEK, A. O., IDE, C. F., BOLLINGER, J. E., RIDER, C. V., & MCLACHLAN, J. A. 1999. Alteration of leopard frog (*Rana pipiens*) metamorphosis by the herbicide acetochlor. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 37(1), 70-77.
- CHEN C. Y.; HATHAWAY K. M.; THOMPSON D. G.; FOLT C. L. 2008. Multiple stressor effects of herbicide, pH and food on wetland zooplankton and a larval amphibian. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 71: 209-218.
- CHRISTIN M. S.; MENARD L.; GENDRON A. D.; RUBY S.; CYR D.; MARCOGLIESE D. J.; ROLLINS-SMITH L.; FOURNIER M. 2004. Effects of agricultural pesticides on the immune system of *Xenopus laevis* and *Rana pipiens*. *Aquatic Toxicology*. 67: 33-43.
- CONDEZ, T. H.; SAWAYA, R. J.; DIXO, M. 2009. Herpetofauna dos remanescentes de Mata Atlântica da região de Tapiraí e Piedade, SP, sudeste do Brasil. *Biota Neotrop*. 9(1): 157-185.
- COOKE, A. S. 1981. Tadpoles as indicators of harmful levels of pollution in the field. *Environmental Pollution* (Series A). 25: 123-133.
- COSTA, M. J.; MONTEIRO, D. A.; OLIVEIRA-NETO, A.; RATIN, F. T.; KALININ, A. L. 2008. Oxidativestress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Origina. *Ecotoxicology*, 17: 153-163.

- DAVIS, A. K., MANEY, D. L., & MAERZ, J. C. 2008. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Functional Ecology*, 22(5), 760-772.
- DIANA, S. G., RESETARITS, W. J., SCHAEFFER, D. J., BECKMEN, K. B., & BEASLEY, V. R. 2000. Effects of atrazine on amphibian growth and survival in artificial aquatic communities. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(12), 2961-2967.
- EDGINTON, A. N.; SHERIDAN P. M.; STEPHENSON G. R.; THOMPSON D. G.; BOERMANS H. J. 2004. Comparative effects of pH and Vision herbicide on two life stages of four anuran amphibian species. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 23(4): 815-822.
- EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 2006. Plano Nacional de Agroenergia 2006-2011.
- EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 2006a. Plano Nacional de Agroenergia 2006-2011, 2a. edição.
- EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 2013. Disponível em: <<http://www.cnpae.embrapa.br/>> . Acesso em 22 jun. 2013.
- EPA. Environmental Protect Agency. 1998. R.E.D. Facts Metribuzin.
- EPA. Environmental Protect Agency. 2005. R.E.D. Facts Ametryn.
- EPA. Environmental Protect Agency. 2013. Glossário de termos técnicos. Disponível em: <<http://www.epa.gov/oust/cat/tumgloss.htm#o>>. Acesso em 02 jun. 2013.
- EPA. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. 1985. 3a. edição. Washington, DC.
- EPA. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. 2002. 5a. edição. Washington, DC.
- EPA. Short-Term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms. 2008. 3a. edição. Cincinnati, Ohio.
- EPA. U.S. Environmental Protection Agency. 1993. R.E.D. Facts. Prevention, Pesticides and Toxic Substances (7508W). 7pp. Disponível em: <<http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/factsheets/0178fact.pdf>>. Acesso em 01 ago. 2010.
- EXTOXNET. Extension Toxicology Network Pesticide Information Profiles. 1996. Disponível em: <<http://extoxnet.orst.edu>>. Acesso em 01 ago. 2010.

- FAIRCHILD, J. F., FELTZ, K. P., ALLERT, A. L., SAPPINGTON, L. C., NELSON, K. J., & VALLE, J. A. 2009. An ecological risk assessment of the exposure and effects of 2, 4-D acid to rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). *Archives of environmental contamination and toxicology*. 56(4), 754-760.
- FAIRCHILD, J. F.; SAPPINGTON, L. C. 2002. Fate and Effects of the Triazione Herbicide Metribuzin in Experimental Pond Mesocosms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 43, 198-202.
- FAO. (Food and Agricultural Organization) 2012. The state of food and agriculture. Rome, Italy: Food and Agricultural Organization of the United Nations, Global Bioenergy Partnership. 302pp.
- FAO. (Food and Agricultural Organization). 1996. Control of water pollution from agriculture. Ongley, E. D. Burlington, Canada: Food and Agricultural Organization of the United Nations, Global Bioenergy Partnership. 302pp.
- FAO. (Food and Agricultural Organization). 2008. A review of the current state of bioenergy development in G8 + 5 countries. Rome, Italy: Food and Agricultural Organization of the United Nations, Global Bioenergy Partnership. 302pp.
- FAOSTAT. (Food and Agricultural Organization). 2013. Disponível em: <faostat.fao.org>. Acesso em 18 maio 2013.
- FARRÉ, M., FERNANDEZ, J., PAEZ, M., GRANADA, L., BARBA, L., GUTIERREZ, H. & BARCELO, D. 2002. Analysis and toxicity of methomyl and ametryn after biodegradation. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 373(8), 704-709.
- FISCHER, G.; SHAH, M.; VELTHUIZEN, H.; NACHTERGAELE, F. Global Agro-ecological Assessment for Agriculture in the 21st Century. 2001. Laxenburg, Austria and Rome, Italy: Internacional Institute for Applied Systems Analyses and the Food and Agriculture Organization of the United Nations. 33pp.
- FONSECA, M. B. da; GLUSCZAK, L.; MORAES, B. S.; MENEZES, C. C. de; PRETTO, A.; TIerno, M. A.; ZANELLA, R.; GONÇALVES, F. F.; LORO, V. L. 2008. The 2,4-D herbicide effects on acetylcholinesterase activity and metabolic parameters of piava freshwater fish (*Leporinus obtusidens*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 69:416 – 420.
- FRENCH, S. S., & MOORE, M. C. 2008. Immune function varies with reproductive stage and context in female and male tree lizards, *Urosaurus ornatus*. *General and comparative endocrinology*, 155(1), 148-156.

- GAHL, M. K., PAULI, B. D., & HOULAHAN, J. E. 2011. Effects of chytrid fungus and a glyphosate-based herbicide on survival and growth of wood frogs (*Lithobates sylvaticus*). *Ecological Applications*, 21(7), 2521-2529.
- GARABRANT, D. H., & PHILBERT, M. A. 2002. Review of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) epidemiology and toxicology. *CRC Critical Reviews in Toxicology*, 32(4), 233-257.
- GASCON, C.; COLLINS, J. P.; MOORE, R. D.; CHURCH, D. R.; MCKAY, J. E.; MENDENSON III, J. R. (Org). 2005. Amphibian Conservation Action Plan. Gland, Switzerland: The World Conservation Union. 62pp.
- GHS. Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals. 2011. Fourth Edition. United Nations, New York and Geneva, 2011. 561 pg.
- GOSNER, K. L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larval with notes on identification. *Herpetologica*. 16: 183-190.
- GREULICH, K., & PFLUGMACHER, S. 2003. Differences in susceptibility of various life stages of amphibians to pesticide exposure. *Aquatic toxicology*, 65(3), 329-336.
- GULLEY, D. D. & WEST, Inc. 1994. TOXSTAT version 3.4. Fish Physiology and Toxicology Laboratory. Department of Zoology and Physiology. University of Wyoming. Laramie, Wyoming.
- HAMILTON, M. A., RUSSO, R. C., & THURSTON, R. V. 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science & Technology*, 11(7), 714-719.
- HE, H.; CHEN, G.; YU, J.; HE, J.; HUANG, X.; LI, S.; GUO, Q.; YU, T.; LI, H. 2013. Individual and Joint Toxicity of Three Chloroacetanilide Herbicides to Freshwater Cladoceran *Daphnia carinata*. *Bull Environ Contam Toxicol*, 90:344–350.
- HEYER, W. R., RAND, A. S., GONCALVES DA CRUZ, C. A., PEIXOTO, O. L., & NELSON, C. E. 1990. Frogs of Boracéia. *Arquivos de Zoologia*. 31(4): 231-410.
- HOLCOMBE, G. W., BENOIT, D. A., HAMMERMEISTER, D. E., LEONARD, E. N., & JOHNSON, R. D. 1995. Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Archives of environmental contamination and toxicology*. 28(3), 287-297.
- HOWE, C. M., BERRILI, M., PAULI, B. D., HELBING, C. C., WERRY, K., & VELDHOEN, N. 2004. Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(8), 1928-1938.

- HOWE, G. E., GILLIS, R., & MOWBRAY, R. C. 1998. Effect of chemical synergy and larval stage on the toxicity of atrazine and alachlor to amphibian larvae. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(3), 519-525.
- IUCN. International Union of conservation of Nature and Natural Resources. 2012. <<http://maps.iucnredlist.org>>. Acesso em 05 jun. 2012.
- JAYAWARDENA, U. A., NAVARATNE, A. N., AMERASINGHE, P. H., & RAJAKARUNA, R. S. 2011. Acute and chronic toxicity of four commonly used agricultural pesticides on the Asian common toad, *Bufo melanostictus* Schneider. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*, 39(3), 267-276.
- JAYAWARDENA, U. A.; RAJAKARUNA, R. S.; NAVARATNE, A. N. AMERASINGHE, P. H. 2010. Toxicity of Agrochemicals to Common Houglass Tree Frog (*Polypedates cruciger*) in Acute and Chronic Exposure. *International Journal of Agriculture & Biology*.12: 641-648.
- JONES, D. K.; HAMMOND, J. I.; RELYEA, R. A. 2009. Very highly toxic effects of endosulfan across nine species of tadpoles: lag effects and family-level sensitivity. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 28(9): 1939-1945.
- JONES, D. K.; HAMMOND, J. I.; RELYEA, R. A. 2011. Competitive stress can make the herbicide Roundup more deadly to larval amphibians. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 30(2): 446-454.
- JONES, R. 2005. The ecotoxicological effects of Photosystem II herbicides on corals. *Marine Pollution Bulletin*. 51(5), 495-506.
- KASHIAN, D. R., & DODSON, S. I. 2002. Effects of common-use pesticides on developmental and reproductive processes in *Daphnia*. *Toxicology and industrial health*, 18(5), 225-235.
- KEGLEY, S. E.; HILL, B. R.; ORME, S.; CHOI, A. H. PAN Pesticides Database, Pesticides Action Network, North America. San Francisco, CA. 2010. Disponível em: <<http://www.pesticideinfo.org>>. Acesso em 01 ago. 2010.
- KERB, J. L.; RICHARDS-HRDLIČKA, K. L.; STORFER, A.; SKELLY, D. K. 2009. An examination of amphibian sensitivity to environmental contaminants: are amphibians poor canaries? *Ecology Letter*, 12: 1-8.
- KUBITZA, F. Qualidade da água no cultivo de peixes e camarões. 1 ed. Jundiaí: F. Kubitza, 2003. 265p.
- LAJMANOVICH, R. C., SANDOVAL, M. T., & PELTZER, P. M. 2003. Induction of mortality and malformation in *Scinax nasicus* tadpoles exposed to glyphosate formulations. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 70(3), 0612-0618.

- LAJMANOVICH, R. C.; ATTADEMO, A. M.; PELTZER, P. M.; JUNGES, M.; CABAGNA, M. C. 2011. Toxicity of Four Herbicide Formulations with Glyphosate on *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) Tadpoles: B-esterases and Glutathione S-transferase Inhibitors. *Arch Environ Contam Toxicol*. 60: 681-689.
- LAJMANOVICH, R. C.; PELTZER, P. M.; JUNGES, C. M.; ATTADEMO, A. M.; SANCHEZ, L. C.; BASSÓ, A. 2010. Activity levels of B-esterases in the tadpoles of 11 species of frogs in the middle Paraná River floodplain: Implication for ecological risk assessment of soybean crops. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 73: 1517-1524.
- LAVILLA, E.; AQUINO, L.; KWET, A.; BALDO, D. 2010. *Hypsiboas faber*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em 05 jun. 2012
- LEITE, P. Z., MARGARIDO, T. C. S., de LIMA, D., de CERQUEIRA ROSSA-FERES, D., & de ALMEIDA, E. A. 2010. Esterase inhibition in tadpoles of *Scinax fuscovarius* (Anura, Hylidae) as a biomarker for exposure to organophosphate pesticides. *Environmental Science and Pollution Research*, 17(8), 1411-1421.
- LEITE, R. C. C. & LEAL M. R. 2007. O biocombustível no Brasil. *Novos Estudos-CEBRAP*, (78), 15-21.
- LENKOWSKI, J. R.; SANCHEZ-BRAVO, G.; MCLAUGHLIN, K. A. 2010. Low concentrations of atrazine, glyphosate, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, and triadimefon exposures have diverse effects on *Xenopus laevis* organ morphogenesis. *Journal of Environmental Sciences*. 22(9): 1305-1308.
- LOKHANSKAYA, V. I. 2010. Study of toxicity of the herbicide “genius” in acute and chronic experiments on cladocera. *Hydrobiological Journal*, 46(3). Depois Tabela 8
- MANN R. M.; HYNE, R. V.; CHOUNG, C. B.; WILSON, S. P. 2009. Amphibians and agricultural chemicals: review of the risks in a complex environment. *Environmental Pollution*. 157:2903-2927.
- MANN, R. M.; BIDWELL, J. R. 1999. The Toxicity of Glyphosate and Several Glyphosate Formulations to Four Species of Southwestern Australian Frog. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 36, 193-199.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Anuário Estatístico da Agroenergia. Brasília. 2009. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/imagens/MAPA/arquivos_portal/anuario_cana.pdf>. Acesso em 29 jun. 2010.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2009a. Zoneamento Agroecológico da Cana-de-açúcar – expandir a produção, preservar a vida, garantir o futuro. Documento 110. Organização:

Celso Vainer Manzatto; Eduardo Delgado Assad; Jesus Fernando Mansilla Bacca; Maria José Zaroni; Sandro Eduardo Marschhausen Pereira. Rio de Janeiro: Embrapa Solos. 55 p.

- MARTINELLI, L. A.; FILOSO, S. 2008. Expansion of sugarcane ethanol production in Brazil: Environmental and Social challenges. *Ecological Applications*. 18(4): 885-898.
- MARTINS, M. 1993. Observations on the reproductive behavior of the smith frog, *Hyla faber*. *Herpetological Journal*. Vol. 3: 31-34.
- MARTINS, M.; HADDAD, C. F. B. 1988. Vocalizations and reproductive behavior in the smith frog, *Hyla faber* Wied (amphibian: Hylidae). *Amphibia-Reptilia*. 9: 49-60.
- MIJARES, A.; RODRIGUES, M. T.; BALDO, D. 2010. *Physalaemus cuvieri*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em 05 jun. 2012.
- MIKULA, P., BLAHOVA, J., KRUIKOVA, K., HAVELKOVA, M., NEMETHOVA, D., HULAK, M., & SVOBODOVA, Z. 2009. Effects of the herbicide LASSO MTX (alachlor 42% W/V) on biometric parameters and liver biomarkers in the common carp (*Cyprinus carpio*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 93(1), 13-17.
- MOORE, L. J.; FUETES, L.; RODGERS JR, J. H.; BOWERMAN, W. W.; YARROW, G. K.; CHAO, W. Y.; BRIDGES JR, W. C. 2012. Relative toxicity of the components of the original formulation of Roundup to five North American anurans. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 78: 128-133.
- NASCIMENTO, L. B.; CARAMASCHI, U.; SILVANO, D. 2004. *Hypsiboas pardalis*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em 05 jun. 2012.
- NEWMAN, R. A., & DUNHAM, A. E. 1994. Size at metamorphosis and water loss in a desert anuran (*Scaphiopus couchii*). *Copeia*, 372-381.
- NIMMO, D. R.; MCEWEN, L. C. 1994. Pesticides. In: Handbook of Ecotoxicology. Oxford Blackweel *Scientific Publications*. Vol.2, p.155-197.
- OLIVEIRA, M. D.; VAUGHAN, B. E.; RYKIEL JR., E.J. 2005. Ethanol as Fuel: Energy, Carbon Dioxide Balances, and Ecological Footprint. *BioScience*. 55(7):593-602.
- OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 13: 57-149.

- ORT, M. P., FAIRCHILD, J. F., & FINGER, S. E. 1994. Acute and chronic effects of four commercial herbicide formulations on *Ceriodaphnia dubia*. *Archives of environmental contamination and toxicology*. 27(1), 103-106.
- ORTIZ-SANTALIESTRA, M. E.; MARCO, A.; FERNANDEZ, M. J.; LIZANA, M. 2006. Influence of developmental stage on sensitivity to ammonium nitrate of aquatic stages of amphibians. *Environ Toxicol Chem.*, 25(1):105-11.
- PERKINS, P. J., BOERMANS, H. J., & STEPHENSON, G. R. 2000. Toxicity of glyphosate and triclopyr using the frog embryo teratogenesis assay—*Xenopus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(4), 940-945.
- PETROBRÁS. 2007. Biocombustíveis 50 perguntas e respostas sobre este novo mercado. Comunicação Institucional do Abastecimento da Petrobras.
- PETROBRÁS. 2013. Memórias Petrobrás. Disponível em: <<http://memoria.petrobras.com.br/linha-do-tempo?ano=1975&filtro=texto#.UcZJsPk3uSo>>. Acesso em 22 jun. 2013.
- PLHALOVA, L., STEPANOVA, S., PRASKOVA, E., CHROMCOVA, L., ZELNICKOVA, L., DIVISOVA, L. & SVOBODOVA, Z. 2012. The Effects of Subchronic Exposure to Metribuzin on *Danio rerio*. *The Scientific World Journal*. doi:10.1100/2012/728189
- POMBAL JR., J. P.; HADDAD, C.F.B. 2005. Estratégias e modos reprodutivos de anuros (Amphibia) em uma poça permanente na Serra de Paranapiacaba, Sudeste do Brasil. *Papéis Avulsos de Zoologia*. 45(15): 201-2013.
- POUNDS, A.; CARNAVAL, A. C. O. Q.; CORN, S. 2005. Climate change, biodiversity loss, and amphibian declines. In: Gascon, C.; Collins, J. P.; Moore, R. D.; Church, D. R.; McKay, J. E.; Mendelson III, J. R. (Org). *Amphibian Conservation Action Plan*. Gland, Switzerland: The World Conservation Union (IUCN). p. 19-20.
- PPDB. Pesticide Properties Database. 2011. Disponível em: <<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/en/index.htm>>. Acesso em: 23 maio. 2013
- PUGLIS, H. J., & BOONE, M. D. 2011. Effects of technical-grade active ingredient vs. commercial formulation of seven pesticides in the presence or absence of UV radiation on survival of green frog tadpoles. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 60(1), 145-155.
- RELYEA, R. A. 2009. A cocktail of contaminants: how mixtures of pesticides at low concentrations affect aquatic communities. *Oecologia*. 159: 363-376.

- RELYEA, R. A. 2012. New effects of Roundup on amphibians: Predator reduce herbicide mortality; herbicides induce antipredator morphology. *Ecological Applications*. 22(2): 634-647.
- RELYEA, R. A. . 2010. Multiple stressors and indirect food web effects of contaminants on herptofauna. Pages 475-486 in D. Sparling, ed. *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles*, 2nd edition.
- RELYEA, R. A., & JONES, D. K. 2009. The toxicity of Roundup Original MAX® to 13 species of larval amphibians. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(9), 2004-2008.
- RELYEA, R. A., & WERNER, E. E. 1999. Quantifying the relation between predator-induced behavior and growth performance in larval anurans. *Ecology*, 80(6), 2117-2124.
- RELYEA, R. A.; HOVERMAN, J. 2006. Assessing the ecology in ecotoxicology: a review and synthesis in freshwater systems. *Ecology Letters*. 9: 1157-1171.
- RELYEA, R. A.; SCHOEPPNER, N. M.; HOVERMAN, J. T. 2005. Pesticides and Amphibians: the importance of community context. *Ecological Applications*. 15(4): 1125-1134.
- ROHR, J. R.; RAFFEL, T. R.; SESSIONS, S. K.; HUDSON, P. J. 2008. Understanding the net effects of pesticides on amphibian trematode infections. *Ecological Application*. 18(7): 1743-1753.
- SCHIESARI, L.; GRILLITSCH, B. 2010. Pesticides meet megadiversity in the expansion of biofuel crops. *Frontiers in Ecology and the Environment*. no prelo.
- SCHIESARI, L.; GRILLITSCH, B.; GRILLITSCH, 2007. H. Biogeographic biases in research and their consequences for linking amphibian declines to pollution. *Conservation Biology*. 21(2): 465-471.
- SCHIESARI, L.C. 2004. Performance tradeoffs across resource gradients in anuran larvae. PhD Dissertation. University of Michigan, Ann Arbor, Michigan, USA.
- SCHWARZENBACH, R. P.; ESCHER, B. I.; FENNER, K.; HOFSTETTER, T. B.; JOHNSON, C. A.; GUNTER, U.; WEHRLI, B. 2006. The challenge of micropollutants in aquatic systems. *Science*. 313: 1072-1077.
- SEMLITSCH, R. D. 2003a. Introduction: General Threats to amphibians. In: *Amphibian Conservation*. Smithsonian Books Washington and London. p.1-7.
- SEMLITSCH, R. D. 2003b. Conservation of pond-breeding amphibians. In: *Amphibian Conservation*. Smithsonian Books Washington and London. p. 8-23.
- SHUTLER, D., & MARCOGLIESE, D. J. 2011. Leukocyte Profiles of Northern Leopard Frogs, *Lithobates pipiens*, Exposed to Pesticides and Hematozoa in Agricultural Wetlands. *Copeia*, 2011(2), 301-307.

- SINDAG. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola. 2013. Notícia de 29/04/13. Disponível em: <http://www.sindag.com.br/noticia.php?News_ID=2319>. Acesso em 10 maio 2013.
- SPOLYARICH, N., HYNE, R., WILSON, S., PALMER, C., & BYRNE, M. 2010. Growth, development and sex ratios of Spotted Marsh Frog (*Limnodynastes tasmaniensis*) larvae exposed to atrazine and a herbicide mixture. *Chemosphere*, 78(7), 807-813.
- ŠTĚPÁNOVÁ, S., DOLEŽELOVÁ, P., PLHALOVÁ, L., PROKEŠ, M., MARŠÁLEK, P., ŠKORIČ, M., & SVOBODOVÁ, Z. 2012. The effects of metribuzin on early life stages of common carp (*Cyprinus carpio*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*.
- STUART, S. N.; CHANSON, J. S.; COX N. A.; YOUNG, B. E.; RODRIGUES, A. S. L.; FISCHMAN, D. L.; WALLER, R. W. 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science*. 306: 1783-1786.
- THOMPSON, D. G., WOJTASZEK, B. F., STAZNIK, B., CHARTRAND, D. T., & STEPHENSON, G. R. 2004. Chemical and biomonitoring to assess potential acute effects of Vision® herbicide on native amphibian larvae in forest wetlands. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(4), 843-849.
- VELISEK, J.; SVOBODOVA, Z.; PIACKOVA, V.; NOVOTNY, L.; BLAHOVA, J.; SUDOVA, E.; MALY, V. 2008. Effects of metribuzin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Veterinarni Medicina*, 53(6): 324–332.
- VELISEK, Josef; STARA, Alzbeta; SVOBODOVA, Zdenka. 2011. The effects of pyrethroid and triazine pesticides on fish physiology. Pesticides in the modern world: pests control and pesticides exposure and toxicity assessment. Rijeka: InTech, p. e377-402.
- VENESKY, M. D.; WILCOXEN, T. E.; RENSEL, M. A.; ROLLINS-SMITH, L.; KERBY, J. L.; PARRIS, M. J. 2011. Dietary protein restriction impairs growth, immunity, and disease resistance in southern leopard frog tadpoles. *Oecologia*. DOI 10.1007/s00442-011-2171-1.
- VERDADE, V.K. ; RODRIGUES, M.T. & PAVAN, D. 2009. Anfíbios Anuros da região da Estação Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba. In Lopes, M.I.M.S.; Kirizawa M. & MELO, M.M.R.F. (Eds), Patrimônio da Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba. A antiga Estação Biológica do Alto da Serra. São Paulo: Editora Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, Pp. 579-604.
- VERDADE, V.K.; CARNAVAL, A.C.; RODRIGUES, M.T.; SCHIESARI, L.C.; PAVAN, D. & BERTOLUCI, J.A. 2011. Decline of amphibians in Brazil. In. Heatwole, H. & Wilkinson, J.W. (Eds), *Amphibian Biology v*

9. Status of Decline of Amphibians: Western Hemisphere. Part 2: Uruguay, Brazil, Ecuador and Colombia. Chipping Norton, Australia: Surrey Beatty and Sons, p. 85-127.

- VIOQUE-FERNÁNDEZ, A.; ALVES DE ALMEIDA, E.; LÓPEZ-BAREA, J. 2007. Esterases as pesticide biomarkers in crayfish (*Procambarus clarkii*, Crustacea): Tissue distribution, sensitivity to model compounds and recovery from inactivation. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*.145: 404-412.
- WEIS, J. S., SMITH, G., ZHOU, T., SANTIAGO-BASS, C., & WEIS, P. 2001. Effects of contaminants on behavior: biochemical mechanisms and ecological consequences. *Bioscience*, 51(3), 209-217.
- WHO. World Health Organization. 2009. WHO recommended classification of pesticides by hazard & guidelines to classification. Disponível em: <<http://www.who.int/publications/en/>>. Acesso em: 12 maio 2013.
- XING, H.; Wu H.; Sun G.; Zhang Z.; Xu S.; Li S. 2013. Alterations in activity and mRNA expression of acetylcholinesterase in the liver, kidney and gill of common carp exposed to atrazine and chlorpyrifos. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 35: 47–54.
- YI, X., DING, H., LU, Y., LIU, H., ZHANG, M., & JIANG, W. 2007. Effects of long-term alachlor exposure on hepatic antioxidant defense and detoxifying enzyme activities in crucian carp (*Carassius auratus*). *Chemosphere*, 68(8), 1576-1581.
- ZAGATTO, P. A. & BERTOLETTI, E. 2008. Ecotoxicologia Aquática - Princípios e Aplicações. São Carlos: RiMa. 2ed. 486pp.

Anexo 1. Doses mínimas e máximas de produtos formulados contendo glifosato, ametrina, 2,4-D, metribuzin e acetocloro recomendadas para uso em cultura de cana-de-açúcar e os valores de massa de ingrediente ativo por produto em dose mínima e máxima (g/ha) (AGROFIT, 2011).

Ingrediente ativo	Produto formulado	Concentração de I.A.	unidades	Dose		unidades	massa de I.A. em dose mín. /ha	massa I.A. em dose máx./ha
				Mínima	Máxima			
glifosato	Fera	480	g/L			5000 ml/ha		2400
glifosato	Gliato	480	g/L	1000		5000 ml/ha	480	2400
glifosato	Glifos	480	g/L	1000		2000 ml/ha	480	960
glifosato	Glifos Plus	600	g/L			3200 ml/ha		1920
glifosato	Glifosato Atar 48	480	g/L	1000		6000 ml/ha	480	2880
glifosato	Glifosato Cropchem 480 SL	480	g/L	1000		5000 ml/ha	480	2400
glifosato	Glifosato Nortox	480	g/L	1000		6000 ml/ha	480	2880
glifosato	Glifosato Nutritop	480	g/L	1000		5000 ml/ha	480	2400
glifosato	Glifosato Zamba	480	g/L	1000		6000 ml/ha	480	2880
glifosato	Glifosato 480 Agripec	480	g/L	1000		6000 ml/ha	480	2880
glifosato	Glifosato 480 Helm	480	g/L			4000 ml/ha		1920
glifosato	Glifosato 480 Pikapau	480	g/L					
glifosato	Glifoxin	480	g/L			4000 ml/ha		1920
glifosato	Gliphogan 480	480	g/L	500		4000 ml/ha	240	1920
glifosato	Gliz 480 SL	480	g/L	2000		6000 ml/ha	960	2880
glifosato	GLYOX	480	g/L	1000		6000 ml/ha	480	2880
glifosato	Glyphotal	480	g/L	750		5000 ml/ha	360	2400
glifosato	Pilarsato	480	g/L	1000		5000 ml/ha	480	2400
glifosato	Polaris	480	g/L	500		5000 ml/ha	240	2400
glifosato	Pretorian	480	g/L	1000		6000 ml/ha	480	2880
glifosato	Rodeo	648	g/L			4000 ml/ha		2592
glifosato	Ronat-A	480	g/L	1000		6000 ml/ha	480	2880
glifosato	Roundup original	480	g/L	500		6000 ml/ha	240	2880
glifosato	Roundup Ready	480	g/L					
glifosato	Roundup Transorb	648	g/L	750		4500 ml/ha	486	2916
glifosato	Roundup WG	792,5	g/kg	500		3500 g/ha	396,25	2773,75
glifosato	Rustler	480	g/L	500		5000 ml/ha	240	2400
glifosato	Samurai	480	g/L	1000		5000 ml/ha	480	2400
glifosato	Shadow 480 SL	480	g/L					
glifosato	Stinger	480	g/L	500		5000 ml/ha	240	2400
glifosato	Trop	480	g/L	1000		6000 ml/ha	480	2880

Anexo 1. Continuação

Ingrediente ativo	Produto formulado	Concentração de I.A.	unidades	Dose		unidades	massa de I.A. em dose mín. /ha	massa I.A. em dose máx./ha
				Mínima	Máxima			
ametrina	Ametrex WG	800	g/Kg	3000	5000	g/ha	2400	4000
ametrina	Ametrex 500 SC	500	g/L	6000	8000	ml/ha	3000	4000
ametrina	Ametrina Atanor 50 SC	500	g/L	4500	6000	ml/ha	2250	3000
ametrina	Gesapax 500 Ciba-Geigy	500	g/L	4000	8000	ml/ha	2000	4000
ametrina	Herbipak WG	800	g/Kg	3000	5000	g/ha	2400	4000
ametrina	Herbipak 500 BR	500	g/L	4000	8000	ml/ha	2000	4000
ametrina	Metrimex	800	g/Kg	3000	4000	g/ha	2400	3200
ametrina	Metrimex 500 SC	500	g/L	5000	6000	ml/ha	2500	3000
2,4-D	Bratt	806	g/L	500	1500	ml/ha	403	1209
2,4-D	Brion	806	g/L	500	1500	ml/ha	403	1209
2,4-D	Capri	868	g/L		2500	ml/ha		2170
2,4-D	Deferon	502	g/L					
2,4-D	DEZ	806	g/L	500	1500	ml/ha	403	1209
2,4-D	Grant	806	g/L	500	1500	ml/ha	403	1209
2,4-D	Navajo	970	g/Kg	800	1300	g/ha	776	1261
2,4-D	Tento 867 SL	867	g/L	1000	2000	ml/ha	867	1734
metribuzim	Sencor 480	480	g/L	3000	4000	ml/ha	1440	1920
metribuzim	Soccer SC	480	g/L	3000	4000	ml/ha	1440	1920
metribuzim	Unimark 700 WG	700	g/Kg	2000	2700	g/ha	1400	1890
acetocloro	Fist EC	900	g/L	3000	4000	ml/ha	2700	3600
acetocloro	Surpass	768	g/L		4000	ml/ha		3072