

DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLO METODOLÓGICO PARA UTILIZAÇÃO DE ANFÍBIOS COMO BIOINDICADORES ECOTOXICOLÓGICOS DA CONTAMINAÇÃO POR AGROTÓXICOS

SUÉLEN ANDRESSA RINAS TRINDADE^{1,2*}, JÉSSICA HERÉK^{1,2}, LUANA VARGAS^{1,2}, MARILIA TERESINHA HARTMANN^{1,2}

¹Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Erechim; ²Laboratório de Ecologia e Conservação da Universidade Federal da Fronteira Sul;

*Autor para correspondência: Suélen Andressa Rinas Trindade (suuelentrindade@gmail.com)

1. Introdução

O uso de agroquímicos no Brasil vem crescendo a cada ano, devido aos processos produtivos agrícolas (EMBRAPA, 2017). As vendas anuais de agrotóxicos e afins no Brasil entre os anos de 2000 e 2014 tiveram um crescimento de 194,09% (IBAMA, 2016). O agrotóxico testado é um produto que dispõe como princípio ativo o glifosato, porém sua formulação comercial possui uma substância surfactante que detêm efeitos tóxicos mais significantes que o glifosato puro (LANGIANO, 2006).

Os animais aquáticos são expostos aos agrotóxicos devido à ingestão de alimentos contaminados, através da pele ao nadar em águas contaminadas e por meio da respiração, absorvendo esse produto químico pelas brânquias (NAKAGOME et al., 2006). A presença de agrotóxicos no ambiente aquático provoca um enorme impacto na biodiversidade aquática (BERTI et. al, 2009), fazendo com que ocorra uma redução das formas de vida deste meio, sendo que os anfíbios são os animais que mais sofrem diante da presença destes produtos no ambiente (VASCONCELOS, 2014).

Atualmente, utilizam-se espécies padronizadas para realização de estudos ecotoxicológicos para avaliar a toxicidade de agrotóxicos. Em ambientes aquáticos, têm sido utilizados como organismos os moluscos, vermes bentônicos, esponjas, anfíbios e peixes (SILVA, 2005). As características que tornam os anfíbios bons indicadores ambientais são ciclo bifásico, pois podem entrar em contato com o agrotóxico de duas formas, através do ambiente aquático (enquanto embriões e larvas) e também do terrestre (enquanto jovens e

adultos) (BRANDÃO et al., 2011). Os anfíbios possuem pele e ovos permeáveis, apresentando sensibilidade às alterações ambientais (GONÇALVES et al., 2014).

2. Objetivo

O objetivo desta pesquisa foi desenvolver protocolo para o uso do anfíbio *Physalaemus gracilis* como bioindicador ecotoxicológico da contaminação por agrotóxicos usando como teste a formulação comercial de glifosato.

3. Metodologia

O agrotóxico testado foi o herbicida glifosato N-(phosphonomethyl) glycine na formulação comercial que apresenta concentração de 445 g/L de sal de Di-amônio de Glifosato (370 g/L de ácido equivalente) e 751 g/L de outros ingredientes, classificado como altamente tóxico (MONSANTO, 2017).

Para obtenção dos embriões de *Physalaemus gracilis*, foram coletadas desovas com menos de 24 horas de oviposição em um charco em área rural no interior do município de Paulo Bento (latitude: -27.7016, longitude: -52.426). Os ensaios de toxicidade aguda foram realizados com 96 horas de duração, e de toxicidade crônica com duração de 168 horas em placas de cultura celular compostas por 24 poços com capacidade para 3 ml cada um. Em cada placa, 20 poços receberam 2 ml da concentração testada, e quatro poços receberam água desclorada sem agrotóxico. Os testes de toxicidade foram iniciados quando os embriões encontravam-se entre os estágios 17-19 segundo Gosner (1960). O teste agudo foi realizado em triplicata e o crônico em sextuplicata, com um controle negativo equivalente. No teste agudo foram testadas nove concentrações, entre 2500 e 50000 µg/L. No teste crônico todas as concentrações testadas são permitidas por lei no Brasil. Os testes foram observados diariamente, a cada 24 horas, quanto á mortalidade, ao desenvolvimento, atividade natatória e malformação.

Para determinação da CL₅₀, se utilizou o método Trimmed spearman-karber, com nível de confiança de 95%. Para avaliação dos dados utilizou-se os testes Anova one way, com teste post-hoc (Tuckey ou Dunnet).

4. Resultados e Discussão

Na metodologia proposta neste estudo foram utilizados embriões para testes agudos e 7 dias de exposição para testes crônicos, para avaliar a ocorrência de malformações e letalidade. Utilizou-se placas de cultura celular o que permitiu o controle individualizado dos organismos. Através deste método, foi possível obter dados claros sobre a toxicidade da formulação comercial de glifosato na espécie testada.

A CL_{50} de glifosato para embriões/larvas de *Physalaemus gracilis* foi de 10600 µg/L. A concentração influenciou na mortalidade dos embriões/larvas ($F_{8,18} = 73,82$; $p=0,00$; significativo a partir de 900 µg/L, tukey, $p<0,05$) ao contrário do tempo de exposição ($F_{3,32} = 0,73$; $p=0,54$). A formulação comercial de glifosato apresentou baixa toxicidade para os embriões/larvas, uma vez que, as maiores taxas de mortalidade foram registradas nas concentrações mais elevadas.

No teste crônico ao final das 168 horas, ocorreu mortalidade elevada de larvas em todas as concentrações, variando entre, aproximadamente, 53,3% a 67,5%. O tempo de exposição influenciou na mortalidade dos embriões/larvas ($F_{6,14} = 4,64$; $p<=0,01$; significativo em 120 e 168 horas de exposição, tukey, $p<0,05$) ao contrário das concentrações ($F_{2,6} = 0,58$; $p=0,59$).

Foram detectadas malformações, mas o número total delas por concentração não foram significativas em relação ao controle ($F_{3,8} = 0,49$; $p=0,70$). No entanto, quando analisados os tipos de malformação separadamente, a diferença foi significativa em relação ao controle ($F_{9,26} = 10,595$; $p<0,05$), sendo significativa a malformação na boca (Dunnet, $p<0,05$), que ocorreu em 40,74% das larvas em teste.

As concentrações utilizadas no teste crônico, são permitidas pela legislação vigente no Brasil, e comumente encontradas em águas doces, e causaram mortalidade e malformações nos embriões/larvas de *Physalaemus gracilis*. Isso significa que o valor permitido por lei para água de consumo humano está acima do que causa efeitos ecotoxicológicos crônicos em anfíbios. Desta maneira, *Physalaemus gracilis* foi um bom bioindicador ecotoxicológico para os efeitos de glifosato.

5. Conclusão

Através desta pesquisa foi possível concluir que o método utilizado para avaliação dos efeitos de glifosato foi eficiente, pois os dados mostraram efeitos de letalidade e malformação. Estudos ecotoxicológicos com organismos não alvo de agrotóxicos são de suma importância, uma vez que os mesmos proporcionam o monitoramento dos efeitos tóxicos. Contudo, são necessários mais estudos na área com intuito de confirmar os protocolos de análise, para que possa ser possível extrapolar os resultados a nível ambiental e biológico.

Referências

BRANDÃO, F. P. et al. Influência da temperatura na toxicidade de cobre em girinos de rã verde *Pelophylax perezi*. **Revista Captar: Ciência e Ambiente para Todos**, v. 3, n. 1, 2011.

GONÇALVES, M. W. et al. Avaliação de danos genômicos em anfíbios anuros do cerrado goiano. **Estudos**, Goiânia, v. 41, p.89-104, nov. 2014.

NAKAGOME, F.; NOLDIN, J. A.; RESGALLA JUNIOR, C.. Toxicidade aguda e análise de risco de herbicidas e inseticidas utilizados na lavoura do arroz irrigado sobre o cladóceros *Daphnia magna*. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 16, p.93-100, jan./dez. 2006.

VANCONCELOS, A. M.. **Avaliação dos efeitos do agrotóxico Vertimec® 18CE sobre girinos de *Lithobates catesbeianus* (Amphibia, Anura, Ranidae)**. 2014. 147 f. Tese 36 (Doutorado em Engenharia Ambiental) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

VIRGINIA HERPETOLOGICAL SOCIETY. **The Gosner(1960) staging system for Anurans**. 2016. Disponível em: <<http://www.virginiaherpetologicalsociety.com/amphibians/amphibian-development/amphibian-development.htm>>. Acesso em: 28 nov. 2016.

Palavras-chave: Agrotóxicos. Anfíbios. Toxicidade aguda. Toxicidade crônica

Fonte de Financiamento

PROBIT - FAPERGS