



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE ARAGUAÍNA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

DEYVID SOUSA MIRANDA

**TOXICIDADE AGUDA DO HERBICIDA 2,4-D + PICLORAM EM
GIRINOS DE *BOANA SEMILINEATA***

**ARAGUAÍNA (TO)
2021**

DEYVID SOUSA MIRANDA

**TOXICIDADE AGUDA DO HERBICIDA 2,4-D + PICLORAM EM
GIRINOS DE *BOANA SEMILINEATA***

Monografia apresentada à Universidade Federal do Tocantins (UFT) – Campus Universitário de Araguaína, para obtenção do título de Bacharel em Zootecnia sob a orientação do

Orientador: Prof. Dr. Sandro Estevam Moron.

**ARAGUAÍNA (TO)
2021**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

M672t Miranda, Deyvid Sousa.
 TOXICIDADE AGUDA DO HERBICIDA 2,4-D + PICLORAM EM
 GIRINOS DE BOANA SEMILINEATA. / Deyvid Sousa Miranda. –
 Araguaína, TO, 2021.
 28 f.

Monografia Graduação - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus
Universitário de Araguaína - Curso de Zootecnia, 2021.

Orientador: Sandro Estevan Moron

1. Agrotóxico . 2. CL50. 3. Anfíbio . 4. Girino . I. Título

CDD 636

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

DEYVID SOUZA MIRANDA

TOXICIDADE AGUDA DO HERBICIDA 2,4-D + PICLORAM EM GIRINC...
DE *BOANA SEMILINEATA*

Monografia foi avaliada e apresentada à UFT
– Universidade Federal do Tocantins –
Campus Universitário de Araguaína, Curso
de Zootecnia para a obtenção do título de
Bacharel e aprovada em sua forma final pelo
Orientador e pela Banca Examinadora.

Data de Aprovação 13/08/2021

Banca examinadora:



Prof.(a) Dr.(a) Sandro Estevan Moron (Orientador),
UFNT

Rosa Mara de Sousa S. Romano

Mestranda em Biologia Rosa Mara de Sousa Santos Romano (Examinadora), UFNT



Prof Dr Marcelo Gustavo Paulino (Examinador), UFNT

Dedico este trabalho a Deus, por ser autor de todas as obras de minha vida.

“ Entregue seu caminho ao senhor, confie nele e ele tudo fará .” Salmo 37:5.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar forças para conseguir alcançar todos os meus objetivos e me manter sempre forte em minha jornada.

Aos meus pais Jaira de Sousa Lima Miranda e Almir Batista Miranda que sempre me apoiaram e me incentivaram nos momentos em que pensei em desistir.

Aos meus colegas que me ajudaram Venucia Bourdon, Kamila Pereira, Gilzelle Maria, Liana Bezerra, obrigado por estarem comigo.

Ao Laboratório de Morfosiologia e Bioquímica-UFT

Ao meu Prof. D^a. Sandro Moron e Prof Dr Marcelo Paulino por suas orientações , por seu apoio e seus ensinamentos que foram de suma importância para me tornar uma pessoa melhor, pela disponibilidade em doar seu tempo para ensinar, me tirar dúvidas e acrescentar no meu conhecimento.

À Universidade Federal do Tocantins (UFT) e todo seu corpo docente por todo conhecimento e conselho, ampliando os horizontes para que hoje eu vislumbre essa grandiosa conquista.

E a todas as pessoas que participaram direta e indiretamente na minha formação, a todos vocês meu muito obrigado.

RESUMO

Os agrotóxicos são poluentes ambientais que podem ser importantes causas de mortalidade da fauna e da flora. A poluição ambiental por contaminantes agrícolas tem sido evidenciada e considerada um dos fatores na diminuição de anfíbios. Dentre os herbicidas utilizados nas pastagens, destaca-se os que apresentam em sua formulação os ingredientes ativos 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) + ácido 4-amino 3,5,6 triclora-2-piridinacarboxílico (Picloram). Os anfíbios são um dos grupos da fauna mais ameaçados de extinção, dentre os fatores que colaboram para sua extinção estão os herbicidas, nos quais sua utilização inadequada pode causar diminuição exacerbada deste grupo. Objetivou-se avaliar a toxicidade aguda de herbicida comercial a base de 2,4-D e Picloram em *Boana semilineata*. No experimento foram utilizadas 7 concentrações de 2,4 D + Picloram, comercialmente conhecido como Norton[®] (0; 7; 7,5; 8,5; 9; 10; 11; 12 g L⁻¹), sendo 2 repetições por tratamento com 5 animais cada, totalizando 70 animais. Há necessidade de se conhecer a influência dos defensivos agrícolas sobre as comunidades de anfíbios, para que possamos minimizar ao máximo o declínio da população desses animais em seu habitat. Portanto, a partir deste experimento foi determinado os valores obtidos do teste toxicológico, o qual apresentou 9,49 (g L⁻¹) como a concentração letal (CL50) do 2,4-D + Picloram. O presente estudo sugere que a aplicação de formulado comercial tem o potencial de causar mortalidade significativa em girinos de *Boana semilineata*.

Palavras-chave: Agrotóxico; CL50; Anfíbio.

ABSTRACT

Pesticides are environmental pollutants that can be important causes of mortality of fauna and flora. Environmental pollution by agricultural contaminants has been highlighted and considered one of the factors in the decline of amphibians. Among the herbicides used in pastures, the ones with the active ingredients 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) + 4-amino 3,5,6-trichloro-2-pyridinecarboxylic acid (Picloram) in their formulation stand out. Amphibians are one of the fauna groups most threatened with extinction. Among the factors that contribute to their extinction are herbicides, in which their inappropriate use can cause an exacerbated decrease in this group. The objective was to evaluate the acute toxicity of commercial herbicide based on 2,4-D and Picloram in *Boana punctata*. The experiment used 7 concentrations of 2,4-D + Picloram, commercially known as Norton® (0; 7; 7.5; 8.5; 9; 10; 11; 12 g L⁻¹), with 2 repetitions per treatment with 5 animals each, totaling 70 animals. There is a need to know the influence of pesticides on amphibian communities, so that we can minimize as much as possible the decline of the population of these animals in their habitat. Therefore, from this experiment we determined the values obtained from the toxicological test, which showed 9.49 (g L⁻¹) as the lethal concentration (LC50) of 2,4-D + Picloram. The present study suggests that the application of commercial formulate has the potential to cause significant mortality in tadpoles of *Boana semilineata*.

Keywords: Agrototoxic; CL50; Amphibian.

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

Figura 1 - Fórmula estrutural dos herbicidas Picloram (A) e 2,4-D (B).....	12
Figura 2 - Esquema das vias de contaminação de agrotóxicos aos corpos d'água.....	14
Figura 3 – <i>Boana semilineata</i>	15
Figura 4 – Girinos.....	16

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
Objetivo geral	13
Objetivo específico	13
REVISÃO DE LITERATURA	13
Herbicida	13
<i>Boana semilineata</i>	16
Efeitos dos agrotóxicos na população de anfíbios	17
MATERIAL E MÉTODOS	18
RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
CONCLUSÃO	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22

INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mercado, fazendo com que o país ocupe o primeiro lugar no ranking mundial de consumo (RIGOTTO; VASCONSELOS; ROCHA, 2014; PIGNATI et al., 2017). Entre os herbicidas utilizados nas pastagens, destaca-se os que apresentam em sua formulação os ingredientes ativos 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) + ácido 4-amino 3,5,6 triclora-2-piridinacarboxílico (Picloram).

A aplicação desses compostos é feita por meio de nebulização durante a fase de desenvolvimento das plantas infestadas (ADAPAR, 2020). É comum realizar o consórcio de dois ou mais princípios ativos na intenção de potencializar o efeito desejado (eliminar as invasoras que acometem as pastagens), efeito esse que não é conseguido quando os princípios ativos são utilizados isoladamente. Isso evidencia que há uma maior necessidade da utilização do consórcio de herbicidas para alcançar o efeito desejado (O'SULLIVAN, 1983; KRENCHINSK et al., 2015).

O 2,4-D mimetiza as auxinas naturais, fazendo com que há desequilíbrios hormonais nas plantas causando morte celular (RODRÍGUEZ-SERRANO et al., 2014). Perante a eficácia e o custo benefício que apresenta, 2,4-D tem sido utilizado em grande volume e em doses acima do recomendado causando preocupações com a interação desse elemento com o meio ambiente, devido seu tempo de permanência no solo (DIAS et al., 2011).

O Picloram também faz parte do grupo auxínicos, tendo ação intoxicante em dicotiledôneas de difícil controle (FRANCO et al., 2016). Devido sua alta solubilidade em água, apresenta baixa adsorção no solo e uma maior rota de dissipação por lixiviação. Apresentando grande potencial de contaminação de águas subterrâneas (STEFFENS et al., 2015; FRANCESCHI et al., 2019). Quando em contato no solo, é lentamente metabolizado por microrganismo e pela fotodegradação, fazendo com que a sua meia-vida oscile entre um mês a três anos dependendo do solo e condições climáticas (PASSOS et al., 2019).

As maneiras de disseminação dos agrotóxicos pelo meio ambiente são variadas, podendo depender da sua propriedade físico-química, solo, ambiente e clima (REBELO; CALDAS, 2014). Durante a aplicação, o produto pode ser desviado e alcançar outros ecossistemas mediante a deriva em decorrência da volatilização, fotodegradação e da sorção (adsorção e absorção) (WAUCHOPE et al., 2002; ORELLANA-GARCÍA et al., 2014; PRUEGER et al., 2017).

Os agrotóxicos são poluentes ambientais que podem ser uma das principais causas de mortalidade da fauna e da flora (RELYEA, 2005). A poluição ambiental por contaminantes

agrícolas tem sido evidenciada e considerada um dos fatores na diminuição de anfíbios (PEREZ-IGLESIAS et al. 2016; GONÇALVES et al., 2015; CARAFFA et al., 2013). Os anfíbios são um dos grupos de animais mais ameaçados de extinção em todo o mundo e vêm sofrendo uma queda de indivíduos de seu grupo em grandes proporções desde a década de 1980 (IUCN, 2013).

Os anfíbios são sensíveis aos contaminantes agrícolas por causa do seu ciclo de vida, pele semipermeável e as adaptações fisiológicas especializadas que os tornam específicos em determinados habitats, tornando-os bioindicadores para o biomonitoramento de contaminação ambiental por agrotóxicos. (GONÇALVES et al., 2015; CARAFFA et al., 2013; HAYES et al., 2010). O Brasil possui a fauna de anfíbios mais diversa do mundo (SEGALLA et al., 2019).

Para entender os efeitos de poluentes a qualquer tipo de animal aquático, o primeiro passo é conhecer a toxicidade aguda de compostos representantes das classes dos agrotóxicos, o que torna necessário a realização de experimentos para determinar sua concentração letal (CL_{50}) para os indivíduos testados (PERKINS; BOERMANS; STEPHENSEN, 2000).

OBJETIVOS

Objetivo geral

- Avaliar a toxicidade aguda do agrotóxico 2,4-D + picloram (Norton[®]) em girinos da espécie *Boana semilineata*.

Objetivo específico

- Determinar a Concentração Letal Média (CL_{50}) de 2,4-D + picloram em girinos da espécie *Boana semilineata* em 96 horas de exposição.

REVISÃO DE LITERATURA

Herbicida

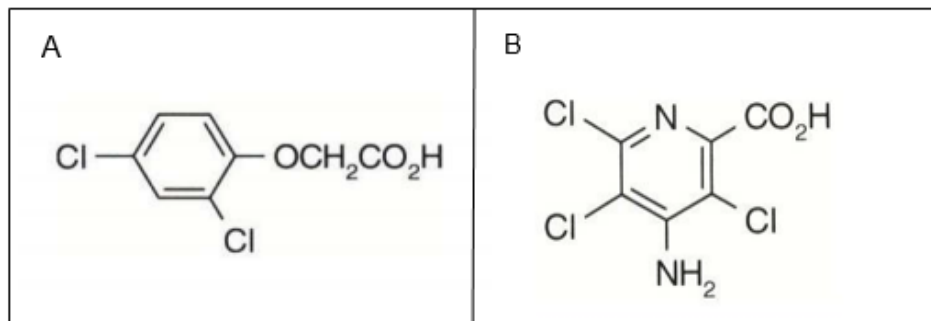
A fim de buscar uma gestão razoável da terra, um sistema agrícola envolvendo a integração da agricultura e pecuária surgiu nos últimos anos. Esses sistemas buscam maximizar

os rendimentos da terra e das colheitas (KLUTHCOUSKY; AIDAR, 2003). No entanto, um dos principais problemas que dificultam a aplicação dessa tecnologia em diferentes culturas são os efeitos residuais dos herbicidas utilizados na formação e manutenção de pastagens.

Nos sistemas tradicionais, para a formação de pastagens, o solo é arado e gradeado, raramente sendo utilizados corretivos e fertilizantes, mesmo em solos ácidos e de baixa fertilidade. No entanto, no controle de ervas daninhas, herbicidas persistentes são frequentemente usados. Quando cultivados sequencialmente, esses herbicidas podem causar envenenamento de espécies sensíveis como soja, feijão, algodão e outras dicotiledôneas (SILVA et al., 2006).

Portanto, o 2,4-D (Figura 1A) não apresenta controle estendido quando usado sozinho. Provando que uma mistura de dois compostos potencializa sua ação. O picloram (Figura 1B) aplicado com proporções equivalentes àqueles que existem em combinação com 2,4-D, não realiza o controle eficazmente de algumas ervas daninhas. Provando que uma mistura de dois compostos potencializa sua ação (O'SULLIVAN, 1983; KRENCHINSK et al., 2015).

Figura 1- Fórmula estrutural dos herbicidas 2,4-D (A) e Picloram (B).



Fonte: Anvisa (2019).

Os herbicidas do grupo das auxinas sintéticas têm efeitos seletivos e são responsáveis por mudanças metabólicas e bioquímicas da planta alvo, geralmente usadas para controlar o crescimento de ervas daninhas em todo o mundo (SONG, 2014). Deste grupo, picloram e 2,4-D constitui a maioria dos produtos registrados para uso agrícola (AGROFIT, 2013).

O 2,4-D é o primeiro herbicida seletivo sintetizado e comercializado industrialmente, seu uso é atribuído à folha larga por mais de 70 anos (POKORNY, 1941). O ácido 2,4-D pertencente ao grupo do ácido fenoxiacético é um herbicida conhecido como auxina sintética, devido à sua baixa adsorção (dependendo tipo do solo, por exemplo: argiloso). Esse composto químico mimetiza as auxinas naturais, que são hormônios importantes para o desenvolvimento

das plantas. Em quantidades alteradas, os hormônios comprometem o progresso e ocasionam óbito celular (RODRÍGUEZ-SERRANO et al., 2014). Devido a eficiência e o custo benefício que apresenta, o 2,4-D tem sido aplicado em larga escala e exageradamente acima do recomendado. Baseado nisso, tem erguido preocupações quanto aos aspectos ambientais, porque a degradação de suas moléculas pode perdurar por muito tempo no solo (4 a 10 dias) (DIAS et al., 2011).

Picloram, do grupo do ácido piridinocarboxílico, é um herbicida simulador de auxina, sendo capaz de provocar intoxicação em dicotiledôneas de difícil controle (FRANCO et al., 2016), com efeito de longo prazo no resíduo do solo, com características de alto risco de poluição da água subterrânea (BRITO et al., 2001; OLIVEIRA JUNIOR et al., 2011; SANTOS et al., 2006a). A persistência desses produtos no meio ambiente pode causar danos a lavouras sensíveis a resíduos desses produtos mediante o cultivo contínuo de pastagens degradadas (CARMO et al., 2008). Ao chegar no solo, é lentamente metabolizado por microrganismos e pela fotodegradação, portanto, sua meia-vida pode diversificar entre um mês a três anos dependendo do tipo de solo e condições climáticas (PASSOS et al., 2019).

Os meios pelos quais se dissipam os agrotóxicos para o meio ambiente são variados, pois mudam de acordo com suas propriedades físico-químicas, das características do solo, condições climáticas e ambientais (REBELO; CALDAS, 2014). Durante a nebulização, o produto pode ser desviado e alcançar outros ecossistemas mediante a deriva em decorrência da volatilização, fotodegradação e da sorção (adsorção e absorção) (WAUCHOPE et al. 2002; ORELLANA-GARCÍA et al., 2014; PRUEGER et al., 2017). Dentre as vias de contaminação, o ambiente aquático geralmente se torna o alvo final dos agrotóxicos.

A forma base de depósito de herbicidas em ecossistemas aquáticos está agregada ao escoamento superficial, que é o curso de água na superfície do solo, quando expostos a intensa precipitação, gerando o carregamento de suas moléculas presas às partículas do solo (SANTOS; CORREIA; BOTELHO, 2013; SOUSA et al., 2016b). Esses elementos podem ainda alcançar os ambientes aquáticos por algumas rotas, como por exemplo, pela utilização direta nos corpos d'água para contenção de macrófitas competidoras (SESIN et al., 2018). Uma vez aplicado, esses produtos também podem chegar aos recursos hídricos (águas superficiais e subterrâneas) pelo processo de lixiviação, que é a retirada de sais por dissolução do solo por meio da corrente de água. Por conta deste fato, os herbicidas oriundos de pastagem e terras agrícolas podem se mover juntamente com esse fluxo após precipitação ou irrigação (EL ALFY; FARAJ, 2017).

As sequelas adversas causadas pela ação direta e indireta dos compostos de herbicidas nos ambientes aquáticos, influenciam em diferentes graus de organização biológica, provocando perturbação na dinâmica das populações bases e o declínio dos níveis primários da cadeia alimentar e, dessa forma, resulta em alterações nos níveis tróficos superiores (HASENBEIN; LAWLER; CONNON, 2017). Os efeitos em organismos não alvos reduzem a diversidade de espécies que reflete na queda da biodiversidade, visto que esses contaminantes podem eliminar completamente algumas comunidades e assim induzir à instabilidade desse ecossistema (RELYEA, 2005).

Boana semilineata

Boana semilineata é uma espécie de perereca endêmica do Brasil com ampla distribuição, ocorrendo desde Pernambuco até o Estado de Santa Catarina. Seus habitats naturais são florestas subtropicais ou tropicais úmidas de baixa altitude, matagais, lagos de água doce, pântanos de água doce, pântanos de água doce sazonais, pastagens, antigas florestas degradadas, áreas de armazenamento de água e lagoas. Folhas e galhos servem de sítios de vocalização para os machos (Lisboa et al., 2011).



Fonte: Acervo pessoal

Um membro do grupo *Boana semilineata* se caracteriza pela presença de uma membrana palpebral reticulada.; Pré-pollex ampliado; espinha dorsal projetada; almofadas nupciais ausentes; dedos III- IV e IV – V extensivamente membranosos; apresentam uma franja tarsal; abdômen imaculado (uniformemente colorido, manchas ausentes); flancos com numerosas listras marrom-escuras ou pretas; vocaliza com uma ou duas notas; (13) pulsos por nota variando de 29-74; chamada frequência dominante variando de 1378–2067 Hz (PELOSO et al., 2018).

Efeitos dos agrotóxicos na população de anfíbios

Estressores causados pela ação do homem no ambiente como agrotóxicos aumentam significativamente fatores que podem declinar a resposta imune de anfíbios aos agentes patogênicos, aumentando a prevalência de doenças nesses animais (CAREY et al., 1999a; CHRISTIN et al., 2013). A exposição de anfíbios ao herbicida atrazina pode ser exemplo disso, mesmo em pequenas concentrações, danifica as defesas antivirais desses animais (SIFKAROVSKI et al., 2014). Sabe-se que o uso prolongado de agrotóxicos tem sido destacado como um dos fatores responsáveis por abalar diretamente o desenvolvimento, a reprodução e a sobrevivência de populações de anfíbios no mundo (BLAUSTEIN; JOHNSON, 2003).

A grande causa da decadência de anfíbios parece ser a carência de habitat, porém vários outros motivos têm sido apontados, dentre esses predadores, parasitas, doenças, radiação UV e pesticidas (KIESECKER et al., 2001). Patógenos têm provocado o declínio populacional de anfíbios (FISHER et al., 2009), sendo que estressores antropogênicos no ecossistema aumentam as causas que podem diminuir a resposta imune de anfíbios a agentes patogênicos. (CAREY et al., 2001b; CHRISTIN et al., 2013).

MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio foi realizado no Laboratório de Morfofisiologia e Bioquímica de Peixes Neotropicais. Os experimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).

Foram coletados *Boana semilineata* em estágio de 26 dias de vida, aproximadamente, nas lagoas da vila Araçulândia pertencente à cidade de Araguaína (TO), as quais foram imediatamente levadas ao laboratório para aclimação em aquários de vidro com capacidade para 20 litros. Os girinos foram alimentados com ração comercial para peixe e frutas.

O ensaio experimental foi realizado em um delineamento inteiramente casualizado (DIC). Para avaliar a sensibilidade da espécie e definir as concentrações a serem utilizadas nos tratamentos, realizou uma primeira etapa para determinar as concentrações que foram utilizadas no teste definitivo para determinação da CL₅₀. Tanto os testes preliminares como o definitivo tiveram duração de 96 horas, em sistema estático. Após a primeira etapa, determinou-se 7 concentrações (0; 7; 7,5; 8,5; 9; 10; 11; 12 g L⁻¹) utilizadas nos testes definitivos, as quais foram adicionadas na água em mesmo instante, com 2 repetições, e 5 animais por repetição, totalizando 70 animais, respeitando-se a densidade máxima 1 girino/0,7 L. Os animais mediam em média 5 centímetros com peso médio de 0,010 g.

A água utilizada no teste de toxicidade foi a mesma do controle negativo (água de poço) coletado no campus EMVZ-UFNT, utilizada no máximo 24 h após a coleta. A temperatura, oxigênio dissolvido e pH da água permaneceu em 26±2°C, 4±2 mg/L e 7, respectivamente, durante todo o período do ensaio.

Os aquários foram dotados de aeração individual e de fluxo leve, para evitar perdas de água por evaporação e conseqüente elevação da concentração do herbicida na água. Durante o período de exposição, os animais foram mantidos sem alimentação. A avaliação da mortalidade foi diária e os indivíduos mortos foram retirados dos recipientes. Os girinos foram considerados mortos quando não reagiram ao toque, contados após 24 h, 48 h, 72 h e 96 h de experimento. Os dados foram analisados pelo programa TSK (*Trimmed Spearman-Kärber Program*, Versão 1.5), para calcular os valores de CL₅₀ e os seus intervalos de confiança em nível de 95% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estágio larval dos girinos pode ser um fator responsável pela variação da sensibilidade à toxicidade aguda e as características comportamentais são grandes indicadores de sensibilidade a substâncias tóxicas (DAVID et al., 2012). Durante o período de exposição, os girinos apresentavam agitados no momento da aplicação do agrotóxico e posterior letargia e quietude dos girinos que se mantiveram no fundo do recipiente, movimentando-se apenas quando estimulados. Temperatura, pH e oxigênio da água se mantiveram em níveis normais de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, 7 e 4 ± 2 mg/L respectivamente. Os girinos estavam em estágio larval 26. Geralmente estudos eco toxicológicos são realizados quando as brânquias dos anfíbios se tornam internas, entre os estágios 25 e 32 (GOSNER, 1960). Supõe-se esses estágios estão mais sujeitos a intoxicação do que estágios posteriores, que possuem as brânquias cobertas pela pele, já que além das trocas iônicas as brânquias podem ser responsáveis também pela absorção de componentes tóxicos, pois a intoxicação pode ser mais acentuada quando as brânquias estão em exposição direta com produto (POUGH et al., 2008).

De acordo com os dados apresentados na Tabela 1, o valor CL_{50} foi 9,49 (g L^{-1}). Nas concentrações de 11 e 12 (g L^{-1}), todos os indivíduos morreram nos 30 primeiros minutos de exposição ao herbicida. Já nas concentrações de 9 e 10 (g L^{-1}) os indivíduos apresentaram mortalidade nas 69 horas de exposição. Nas demais concentrações controle; 7; 7,5; 8,5 g L^{-1} do agrotóxico após 96 horas de exposição, todos os animais se mantiveram vivos.

Tabela 1. Concentração letal média (CL_{50-96h}) do herbicida à base de 2,4-D+ Picloram (Norton[®]) para o *Boana semilineata*, estimado de acordo com dados de mortalidade após 96 horas de exposição e respectivos níveis de segurança.

CL_{50-96h} (g L^{-1}) Norton	Intervalo de confiança (g L^{-1})		Concentração (g L^{-1}) 2,4 D + Picloram
	Limite inferior	Limite superior	
9,49	9,41	9,88	0,59 + 0,14

Existem vários trabalhos relacionando teste de toxicidade em girinos com outras formulações de agrotóxicos. Por exemplo, Sparling e Fellers (2007) avaliaram a toxicidade aguda de inseticidas organofosforados para girinos de *Rana boylii*, e obtiveram os seguintes valores de CL_{50} : 3,0 g L^{-1} para clorpirifós (24 h); 7,488 mg L^{-1} para o diazinon (96 h) e 2,137 mg L^{-1} para malation (96 h). Almeida et al. (2019) avaliaram a toxicidade aguda de um composto

comercial com o princípio de glifosato em girinos de *Physalaemus cuvieri* e *Rhinella icterica* e observou-se que a CL50 para o tempo de 96 horas foi de 7,12 g L⁻¹.

Luo et al. (2003) testaram a toxicidade do paration metílico a girinos de *Rana tigrina*, fazendo o uso de cinco concentrações (2,0; 3,1; 4,8; 7,8 e 12 g L⁻¹). Encontraram valores de CL50 de 4,9; 3,9; 3,3 e 3,1 g L⁻¹ para 24, 48, 72 e 96 h de exposição, respectivamente. Válido citar que as soluções utilizadas para girinos de *Boana semilineata*, foram formulações comerciais que contém ingredientes inertes, que podem interferir e potencializar a toxicidade do produto. Enquanto os autores citados utilizaram em seus estudos soluções com 99% de pureza, portanto usaram os princípios ativos sem a adição de ingredientes inertes, fazendo com que a letalidade do herbicida seja menor comparada com a solução comercial usada no presente trabalho.

Segundo Magalhães e Ferrão Filho (2008) essa relação entre tempo de exposição e mortalidade pode ser explicada pelo tempo que o agrotóxico se acumula nos tecidos do organismo até atingir uma concentração limiar, a partir da qual o efeito é evidenciado. As primeiras 24 horas são importantes, pois alguns organismos podem adquirir resistência após as primeiras horas de exposição (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008) como ocorrido no presente estudo, exceto para as maiores doses (11 e 12 ml).

Esses dados evidenciam que existem distinções consideráveis entre os valores da CL50 para indivíduos de diferentes espécies, e salientam a importância de realizar mais estudos dessa natureza para evidenciar o comportamento e os efeitos que esses compostos podem causar ao ambiente quando presentes em ambientes aquáticos. A concentração à base de 2,4-D+ Picloram causa mortalidade de 50% nesse estágio da metamorfose nos girinos de *Boana semilineata* em 96 horas de exposição quando exposto a uma concentração de 9,49 (g L⁻¹). O resultado obtido no presente trabalho evidencia a necessidade de estudos complementares sobre a exposição desse pesticida em *Boana semilineata*.

CONCLUSÃO

No Brasil, por ocasião do registro de agroquímicos, são exigidos pelo Ministério da Saúde, entre outros testes, ensaios de toxicidade a organismos não alvos para avaliar a forma de ação dessas substâncias nos organismos constituintes da cadeia alimentar. Embora os testes com anfíbios não constituam exigência regulatória, tais ensaios têm sido extremamente importantes para demonstrar a periculosidade e o grau de interferência dos produtos sobre os ecossistemas aquáticos e seu comportamento no ambiente.

O presente estudo sugere que a aplicação de formulado comercial, Norton, tem o potencial de causar mortalidade significativa em girinos de *Boana semilineata* nesse estágio da metamorfose quando expostos a uma concentração de 9,49 g L⁻¹.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAPAR - AGÊNCIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO PARANÁ. **Registro ADAPAR/PR N°466**. Agrotóxicos- Herbicida Norton. Disponível em: http://https://www.adapar.pr.gov.br/sites/adapar/arquivos_restritos/files/documento/2020-12/norton.pdf. Acesso em: 20 de maio de 2021.

AGROFIT - SISTEMA DE AGROTÓXICOS FITOSSANITÁRIOS: **Sistema de acesso as informações de agrotóxicos e afins com fins agrícolas registrados em nível federal**. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 22 de junho de 2021.

ALMEIDA, P.R.; RODRIGUES, M.V.; IMPERADOR, A.M. Toxicidade aguda (LC50) e efeitos Comportamentais e morfológicos de formulado comercial com princípio ativo glifosato em girinos de *Physalaemus cuvieri* (Anura, *Leptodactylidae*) e *Rhinella icterica* (Anura, *Bufo*). **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.24, n.6, p. 1115-1125, 2019.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Agrotóxicos**. Dispõe sobre a manutenção do ingrediente ativo ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) em produtos agrotóxicos, no País. 2019, Brasília.

BLAUSTEIN, A.R.; JOHNSON, P.T. The complexity of deformed amphibians. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 1, n. 2, p. 87-94, 2003.

BRUNETTI, A.E.; TABOADA, C.A.; FAIVOVICH, J. The reproductive biology of *Hypsiboas punctatus* (Anura: Hylidae): male territoriality and the possible role of different signals during female choice. **Salamandra**, v. 50, n. 1, p. 215-224, 2014.

BRITO, N.M.; AMARANTE JÚNIOR, O.P.; ABAKERLI, R.; SANTOS, T.C.R.; RIBEIRO, M.L. Risco de contaminação de águas por pesticidas aplicados em plantações de eucaliptos e coqueiros: análise preliminar. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v.2, n. 1, p. 93-104, 2001.

CARAFFA, E.; BIONDA, C.; POLLO, F.; SALAS, N.; MARTINO, A. Determinación de la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos de *Bufo arenarum* que habitan ambientes urbanizados. **Acta Toxicológica Argentina**, v. 21, n.2, p. 78-84, 2013.

CAREY, C.; COHEN, N.; ROLLINS-SMITH, L. Amphibian declines: na immunological perspective. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 23, n. 6, p. 459-472, 1999a.

CAREY, C.; HEYER, W.R.; WILKINSON, J.; ALFORD, R.A.; ARNTZEN, J.W.; HALLIDAY, T.; HUNGERFORD, L., LIPS, K.R.; MIDDLETON, E.M.; ORCHARD, S.A.; RAND, A. S. Amphibian Declines and Environmental Change: Use of Remote-Sensing Data to Identify Environmental Correlates. **Conservation Biology**, v. 15, n. 4, p. 903-913, 2001b.

CARMO, M.L.; PROCÓPIO, S.O.; PIRES, F.R.; CARGNELUTTI FILHO, A.; BRAZ, G.B.P.; SILVA, W.F.P.; BARROSO, A.L.L.; SILVA, G.P.; CARMO, E.L.; BRAZ, A.J.B.P.; ASSIS, R.L. Influência do período de cultivo de **Panicum maximum** (cultivar Tanzânia) na fitorremediação de solo contaminado com picloram. **Planta Daninha**, v. 26, n. 2, p. 315-322, 2008.

CHRISTIN, M.S., MÉNARD, L., GIROUX, I., MARCOGLIESE, D.J., RUBY, S., CYR, D., FOURNIER, M., BROUSSEAU, P. Effects of agricultural pesticides on the health of *Rana pipiens* frogs sampled from the field. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 2, p. 601-611, 2013.

DAVID, M.; MARIGOUDAR, S.R.; PATIL, V.K.; HALAPPA, R. Behavioral, morphological deformities and biomarkers of oxidative damage as indicator of sublethal cypermethrin intoxication on tadpoles of *D. melanostictus* (Schneider, 1799). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 103, n.2, p. 127-134, 2012.

DIAS, J. R. M.; DUBBERSTEIN, D.; TAVELLA, L. B.; FERREIRA, E.; STACHIW, R. Lixiviação de 2, 4-D em solo de pastagem na amazônia ocidental. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 7, n.4, p. 15-20, 2011.

EL ALFY, M.; FARAJ, T. Spatial distribution and health risk assessment for ground-water contamination from intensive pesticide use in arid areas. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 39, n. 1, p. 231–253, 2017.

FISHER, M.C., GARNER, T.W., WALKER, S.F. Global emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and amphibian chytridiomycosis in space, time, and host. **Annual review of microbiology**, v. 63, n. 1, p. 291-310, 2009.

FRANCESCHI, M.; ARANTES, S. A.; DO C. M.; ANDRADE, E. A.; ROCHA, A.M.; ARANTES, K. R.; YAMASHITA, O. M. Liming on picloram leaching in dystrophic Red Yellow Latosol. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 23, n.2, p. 103–108, 2019.

FRANCO, M.H.R.; LEMOS, V.T.; FRANÇA, A.C.; SCHIAVON, C.; ALBUQUERQUE, M. T.; ALECRIM, A.O.; D'ANTONINO, L. Physiological and morphological characteristics of

Phaseolus vulgaris L. grown in soil with picloram residues. **Pesquisa Agropecuária tropical**, v. 46, n. 3, p. 276-283, 2016.

GONÇALVES, M.W.; VIEIRA, T.B.; MACIEL, N.M.; CARVALHO, W.F.; LIMA, L.S.; GAMBALE, P.G.; CRUZ, A.D.; NOMURA, F. ; BASTOS, R.P.; SILVA, D.M. Detecting genomic damages in the frog *Dendropsophus minutus*: preserved versus perturbed areas. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n.5, p. 3947-3954, 2015.

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

HADDAD, C.; PRADO, C. Reproductive Modes in Frogs and Their Unexpected Diversity in the Atlantic Forest of Brazil. **BioScience**, v. 55, n. 3, p. 207-217, 2005.

HASENBEIN, S. P.; LAWLER, S.; CONNON, R. An Assessment of Direct and Indirect Effects of Two Herbicides on aquatic Communities. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 36, n. 8, p. 2234-2244, 2017.

HAYES, T.B.; FALSO, P.; GALLIPEAU, S.; STICE, E.M. The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's perspective. **The Journal of Experimental Biology**, v. 213, n.6, p. 921-933, 2010.

IUCN - INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE'S. **IUCN Red List** – The IUCN Red List of Threatened Species, Version 2013.2. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em: 22 de junho de 2021.

IUCN - INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE'S. (2016) **Hypsiboas punctatus**. The IUCN Red List of Threatened Species. 2016. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org/details/full/55620/0>. Acesso em 22 de junho de 2021.

KIESECKER, J.M., BLAUSTEIN, A.R., BELDEN, L.K. Complex causes of amphibian population declines. **Nature**, v. 410, n. 6829, p. 681–684, 2001.

KLUTHCOUSKI, J.; AIDAR, H. Uso da integração lavoura pecuária na recuperação de pastagens degradadas. In: KLUTHCOUSKI, J. et al. Integração lavoura pecuária. Santo Antônio de Goiás: **Embrapa Arroz e Feijão**, p. 185-223, 2003.

KRENCHINSKI, F.H.; ALBRECHT, A.J.P.; ALBRECHT, L.P.; CESCO, V.J.S.; RODRIGUES, D.M.; FILHO, R.V. Application rates and herbicide in weed control in pasture. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v.14, n.4, p.271-279, 2015.

Lisboa, E. B. F., de Moura, G. J. B., de Melo, I. V. C., de Andrade, E. V. E., & de Figuerêdo Júnior, J. M. (2011). Aspectos ecológicos de *Hypsiboas semilineatus* (SPIX, 1824) (AMPHIBIA, ANURA, HYLIDAE) em fragemento de Mata Atlântica, nordeste do Brasil. *Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais*, 2(1), 21-30

LUO, Y.C.; ZENG, Q.R.; WU, G.; LUAN, Z.K.; LIAO, B.H. Effect of beta- cyclodextrin compounds on the solubilization of three selected pesticides and their toxicity with methyl-parathion to *Rana tigrina* tadpoles. **Bulletin of Environmental Contamination Toxicology**, v. 70, n.5, p. 998–1005, 2003.

MAGALHÃES, D.P.; FERRÃO FILHO, A.S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n.3, p. 355 – 381, 2008.

OLIVEIRA JÚNIOR, R.S.; CONSTANTIN, J.; OLIVEIRA NETO, A.M.; SANTOS, G.; JUMES, T.M.C. Persistência de trifloxysulfuron-sodium e pyriithiobac-sodium em diferentes tipos de solo. **Planta Daninha**, v. 29, n. 3, p.673-681, 2011.

ORELLANA-GARCÍA, F.; ÁLVAREZ, M. A.; LÓPEZ-RAMÓN, V.; RIVERA-UTRILLA, J.; SÁNCHEZ-POLO, M.; MOTA, A. J. Photodegradation of herbicides with different chemical natures in aqueous solution by ultraviolet radiation. Effects of operational variables and solution chemistry. **Chemical Engineering Journal**, v. 255, n.1, p. 307–315, 2014.

O'SULLIVAN, P. A. Influence of Picloram Alone or Plus 2,4-D on Control of Wild Oats (*Avena fatua*) with Four Postemergence Herbicides. **Weed Science**, v. 31, n.6, p. 889-891, 1983.

PASSOS, A.B.R.; SOUZA, M.F.; SARAIVA, D.T.; DA SILVA, A.A.; QUEIROZ, M.E.L.; CARVALHO, F.P.; SILVA, D.V. Effects of liming and urochloa brizantha management on leaching potential of picloram. **Water Air and Soil Pollution**, v. 230, n.12, p.12, 2019.

PELOSO, P.L.V.; OLIVEIRA, R.M.; STURARO, M.J.; RODRIGUES, M.T.; LIMA-FILHO, G.R.; BITAR, Y.O.C.; WHEELER, W.C.; ALEIXO, A. Phylogeny os map tree frogs, Boana semilineata species group, with a new Amazonian Species J (Anura:Hylidae). *South American Journal of Herpetology*, v.13, n. 2, p. 150-169, 2018

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

PIGNATI, W. A.; LIMA, F.A.N.S; LARA, S.S; CÔRREA, M.L.M.; LEÃO, L.H.C.; PIGNATTI, M.G. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. **Ciência e saúde coletiva [online]**, v. 22, n.10, p.3281-3293, 2017.

POKORNY, R. Some chlorophenoxyacetic acids. **Journal of the American Chemical Society**, v.63, n.6 p.1768, 1941.

POUGH, F.H.; JANIS, C.M.; HEISER, J.B. **A vida dos vertebrados**. 4º Ed. Atheneu Editora, São Paulo, 750p. 2008.

PRUEGER, J.H.; ALFIERI, J.; GISH, T.J.; KUSTAS, W.P.; DAUGHTRY, C.S.T.; HATFIELD, J.L.; MCKEE, L.G. Multi-year measurements of field-scale metolachlor volatilization. **Water Air and Soil Pollution**, v. 228, n.84, p. 11, 2017.

REBELO, R.M.; CALDAS, E.D. Avaliação de risco ambiental de ambientes aquáticos afetados pelo uso de agrotóxicos. **Química Nova**, v. 37, n.7, p.1199–1208, 2014.

RELYEA, R.A. The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. **Ecological Applications**, v.15, n.2, p. 618–627, 2005.

RIGOTTO, R. M.; VASCONCELOS, D.P.; ROCHA, M. M. Pesticide use in Brazil and problems for public health. **Caderno de Saude Publica**, v. 30, n. 7, p. 1360-1362, 2014.

RODRÍGUEZ-SERRANO, M.; PAZMIÑO, D.M.; SPARKES, I.; ROCHETTI, A.; HAWES, C.; ROMERO-PUERTAS, M.C.; SANDALIO, L.M. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid promotes S-nitrosylation and oxidation of actin affecting cytoskeleton and peroxisomal dynamics. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n.17, p. 4783–4793, 2014.

SANTOS, J.B.; PROCÓPIO, S.O.; PIRES, F.R.; SILVA, A.A.; SANTOS, E.A. Fitorremediação de solo contaminado com Trifloxysulfuron-sodium por diferentes densidades populacionais de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis* (L). DC.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 3, p.444-449, 2006a.

SANTOS, E.A.; CORREIA, N.M.; BOTELHO, R G. Resíduos de herbicidas em corpos hídricos - Uma revisão. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 12, n. 2, p. 188-201, 2013.

SCHULZE, A.; JANSEN, M.; KÖHLER, G. Tadpole diversity of Bolivia's lowland anuran communities: molecular identification, morphological characterisation, and ecological assignment. **Zootaxa**, v. 4016, n. 1, p. 001-111, 2015.

SEGALLA, M.V., CARAMASCHI, U., CRUZ, C.A.G., GARCIA, P.C.A., GRANT, T., HADDAD, C.F.B., SANTANA, D.J., TOLEDO, L.F.; LANGONE, J.A. Brazilian Amphibians: List of Species. **Herpetologia Brasileira**, v. 8, n.1, p.65-96, 2019.

SESN, V.; DALTON, R.L.; BOUTIN, C.; ROBINSON, S.A.; BARTLETT, A.J.; PICK, F. R. Macrophytes are highly sensitive to the herbicide diquat dibromide in test systems of arying complexity. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 165, n. 1, p. 325-333, 2018.

SIFKAROVSKI, J.; GRAYFER, L.; DE JESÚS EINO, F.; LAWRENCE, B.P.; ROBERT, J. Negative effects of low dose atrazine exposure on the development of effective immunity to FV3 in *Xenopus laevis*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 47, n. 1, p. 52-8, 2014.

SILVA, L. L.; FERREIRA, L.R.; SANTOS, J.B.; BELO, A.F.; SILVA, A.A. **Seleção de espécies sensíveis aos herbicidas triclopyr e 2,4-D + picloram**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 25. 2006, Brasília. Anais... Brasília, DF: 2006. p. 229.

SONG, Y. Insight into the mode of action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) as na herbicide. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 56, n. 2, p. 106-113, 2014.

SPARLING, D.W.; FELLERS, G. Comparative toxicity of chlorpyrifos, diazinon, malathion and their oxon derivatives to larval *Rana boylei*. **Environmental Pollution**, v. 147, n.3, p. 535-539, 2007.

STEFFENS, K.; JARVIS, N.; LEWAN, E.; LINDSTRÖM, B.; KREUGER, J.; KJELLSTRÖM, E., MOYES, J. Direct and indirect effects of climate change on herbicide leaching—a regional scale assessment in Sweden. **Science Total Environment**, v. 514, n.1, p. 239-249, 2015.

TOMITA, R.Y.; BEYRUTH, Z. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. **Biológico**, v.64, n.2, p.135-142, 2002.

UETANABARO, M.; PRADO, C.P.A.; RODRIGUES, D.J.; GORDO, M.; CAMPOS, Z. **Guia de Campo dos Anuros do Pantanal Sul e Planaltos de Entorno**. Campo Grande, Editora UFMS, 196p, 2008.

WAUCHOPE, R. D.; YEH, S.; LINDERS, J. B. H. J.; KLOSKOWSKI, R.; TANAKA, K.; RUBIN, B.; UNSWORTH, J. B. Pesticide soil sorption parameters: theory, measurement, uses, limitations and reliability. **Pest Manage Science**, v. 58, n.5, p.419–445, 2002.