



**I Workshop sobre Bases
Técnico-Científicas da
Avaliação de Risco
Ambiental de Agrotóxicos**

Avaliação de Risco Ambiental para répteis e anfíbios

Dra Juliane Silberschmidt Freitas

Universidade do Estado de Minas
Gerais, UEMG – Ituiutaba
juliane.freitas@uemg.br



Equipe Técnica
Editais de Chamamento Público nº 18/2021
Metas 4.1, 4.2, 4.3, 4.4

Dr Guarino Rinaldi Colli

Dr. Rogério Pereira Bastos

Dra Juliane Silberschmidt Freitas

Dr Eduardo Alves de Almeida

Dr Luis Cesar Schiesari

Dra Raquel Fernanda Salla Jacob

Dr Alessandro Ribeiro de Moraes

Dra Marcella Gonçalves Santos

Dr Michiel Adriaan Daam

Me Bruno Barros Bittar

Me Suelen Cristina Grott

Fundação de Empreendimentos Científicos e Tecnológicos - FINATEC



Equipe – Meta 4.4

Avaliação de Risco Ambiental para répteis e anfíbios



Coordenadores:

Profa. Dra. Juliane Silberschmidt Freitas (UEMG)

Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida (FURB)



Pesquisadores / Colaboradores:

Dra. Raquel Fernanda Salla Jacob (Pós Doc UFG)

Me Suelen Cristina Grott (Centro Universitário Avantis)

Michiel Adriaan Daam

(Universidade Nova de Lisboa)



Metas

Etapa 4.4.1: Levantamento de **dados da toxicidade** de agrotóxicos para espécies de **anfíbios e répteis nativos**, bem como para as **espécies padrão** utilizadas em testes de laboratório.

Etapa 4.4.2: Levantamento da **sensibilidade relativa** através da construção de **curvas de distribuição de sensibilidade de espécies (SSDs)** e cálculo de fatores de extrapolação (fatores de segurança) de toxicidade entre espécies para as seguintes relações.

- Anfíbios nativos (fase terrestre) x Aves (espécies padrão): exposição via oral;
- Répteis (nativos) x Aves (espécies padrão): exposição via oral;
- Anfíbios nativos (fase aquática) x Peixes (espécies padrão).

Etapa 4.4.3: Identificação de grupos de produtos agrotóxicos com **similaridade no potencial tóxico para répteis e anfíbios**

- Quais os tipos de produtos com maior potencial tóxico para as espécies.





I. Toxicidade aguda para os anfíbios

Etapa 4.1: Levantamento de **dados da toxicidade** de agrotóxicos para espécies de anfíbios e répteis nativos, bem como para as espécies padrão utilizadas em testes de laboratório.



Levantamento de dados para os anfíbios

1. Consulta de produtos agroquímicos que possuem registro no sistema AGROFIT no Brasil

Herbicidas: 173

Acaricidas: 24

Fungicidas: 94

Inseticidas: 89

Reguladores de crescimento: 11

Total = 391



2. AmphibiaWeb (<https://amphibiaweb.org>)

Identificação das espécies de anfíbios nativas brasileiras

Atualmente: 1159 espécies registradas



Etapa 4.1: Levantamento de **dados da toxicidade** de agrotóxicos para espécies de anfíbios e répteis nativos, bem como para as espécies padrão utilizadas em testes de laboratório.



3. Deliberação das espécies-modelo:



Xenopus laevis



Lithobates catesbeianus



Lithobates pipiens



Rana temporaria

4. Busca dados de toxicidade aguda (LC50) Ecotox Knowledgebase EPA

- Ingredientes ativos
- Nomes científicos das espécies nativas brasileiras
- Nome científico das espécies-modelo de anfíbios
- Confirmação do CAS number

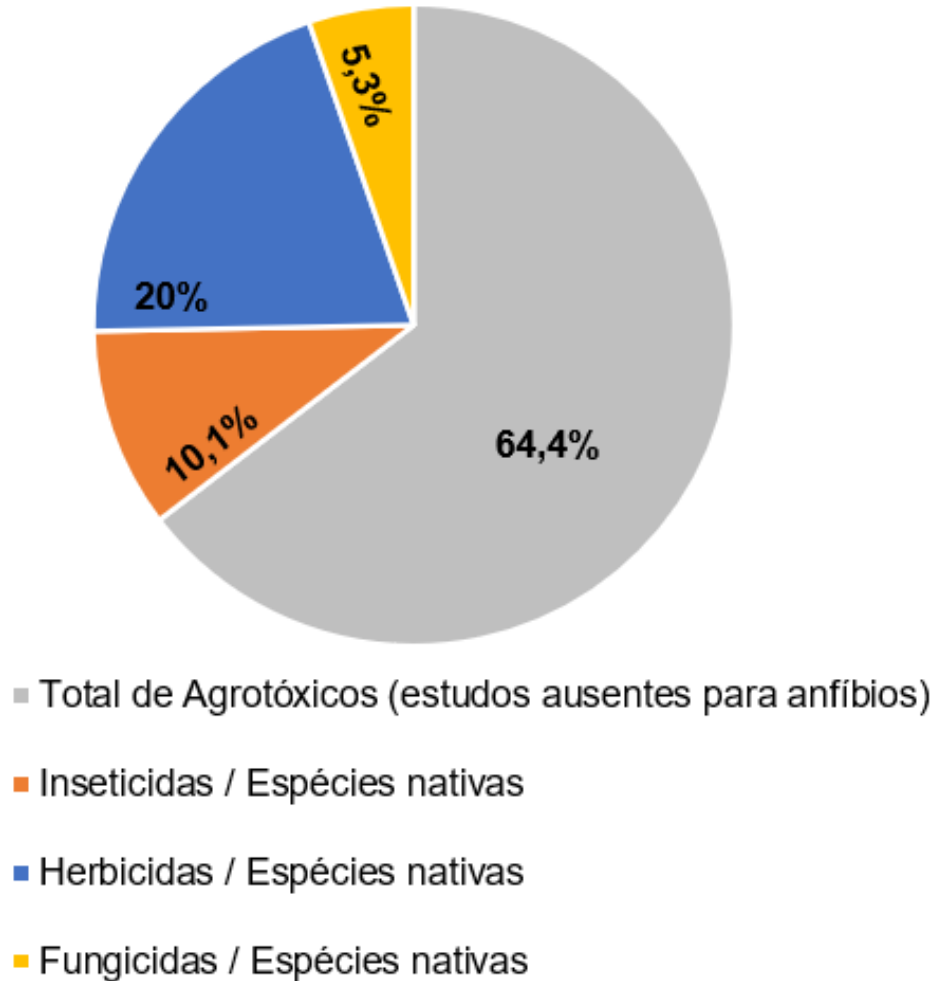


Etapa 4.1: Levantamento de dados da toxicidade de agrotóxicos para anfíbios (fase aquática)

RESULTADOS

- 1376 linhas de dados → espécies nativas
- 2574 linhas de dados → espécies modelo
- Não encontramos estudos com reguladores de crescimento
- Observações:
- Alguns valores fornecidos pelo sistema diferiam nas unidades de medida (checagem individual nos artigos).
- Muitos dados faltavam registros das condições experimentais (ex. pH, temperatura) ou parâmetros biológicos (gênero, peso, estágio).

Porcentagem de Estudos Ecotoxicológicos com Anfíbios Nativos



Agrotóxicos sem nenhum registro de toxicidade aguda para os anfíbios: 64.4%

Registros de toxicidade aguda: Considerando CL50, NOEC, LC10, EC10

Dos 89 inseticidas registrados na Agrofit:

- **Espécies nativas:**
 - 9 inseticidas testados
 - 10,1% dos inseticidas
- **Espécies modelo:**
 - 24 inseticidas testados
 - 26.5% dos inseticidas

Dos 115 herbicidas:

- **Espécies nativas:**
 - 23 herbicidas testados
 - 20% dos herbicidas
- **Espécies modelo:**
 - 23 herbicidas testados
 - 20% dos herbicidas

Dos 94 fungicidas:

- **Espécies nativas:**
 - 5 fungicidas testados
 - 5.3% dos fungicidas
- **Espécies modelo:**
 - 18 fungicidas testados
 - 19.1% dos fungicidas

Etapa 4.1: Levantamento de dados da toxicidade de agrotóxicos para anfíbios (larvas)

Filtrando valores de CL50 para espécies brasileiras:

- 5 inseticidas (azadiractina, carbaril, cipermetrina, clorpirifós e malationa)
- 3 fungicidas (mancozebe, tebuconazol, e trifloxistrobina)
- 16 herbicidas (acetocloro, ametrina, atrazina, dicamba, diurom, glifosato, e glifosato-sal de amônio, glifosato-sal de isopropilamina, imazetapir, metolacoloro, metribuzim, metsulfuron, picloram, simazina, sal de dimetilamina do ácido 2,4-D)

Estudos de CL50
contemplam **13 espécies**
nativas brasileiras

Rhinella marina

Rhinella arenarum

Rana aurora

Physalaemus cuvieri

Physalaemus albonotatus

Physalaemus centralis

Physalaemus nattereri

Physalaemus gracilis

Elachistocleis bicolor

Leptodactylus latrans

Leptodactylus fuscus

Boana pardalis

Scinax nasicus



Avaliação de toxicidade crônica para anfíbios:

NOEC, EC10 e LC10

Espécies nativas

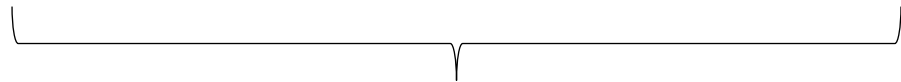
- **4 inseticidas** (abamectina, cipermetrina, clorpirifós, e malationa),
 - **5 fungicidas** (diclorana, mancozebe, tebuconazol, fludioxonil e trifloxystrobina)
 - **9 herbicidas** (acetocloro, atrazina, diurom, glifosato, glifosato-sal de isopropilamina, hexazinona, metribuzim, triclopir-butotílico e 2,4-D)
-
- **Espécies modelo:**
 - **16 inseticidas** (acetamiprid, beta-ciflutrina, beta-cyfluthrin, carbaril, clothianidin, diclorana, fosmete, cipermetrina, clorpirifós, esfenvalerate, fipronil, imidacloprid, lambda-cialotrina, lambda-cyhalothrin, malationa, permetrina),
 - **6 fungicidas** (folpete, tiabendazol, clorotalonil, miclobutanil, pyraclostrobin e trifloxystrobina)
 - **9 herbicidas** (ametrina, atrazina, alacloro, glifosato, glifosato-sal de isopropilamina, hexazinona, tiobencarbe, triclopir-butotílico e 2,4D)



Efeitos Subletais prevalentes em anfíbios:

Planilha com 311 linhas categorizando os **efeitos subletais**

- Alterações no comportamento
- Alterações no crescimento
- Desenvolvimento
- Alterações enzimáticas
- Alterações morfológicas
- Genotoxicidade
- Alterações imunológicas
- Outras (níveis biológicos mais específicos)



Alguns ingredientes ativos com + de 1 via de ação





II. Toxicidade aguda para os peixes

II. Toxicidade para os peixes

- Espécies-modelo:
- *Danio rerio* (Khan & Alhewairini, 2019)
- *Pimephales promelas* (Saari et al., 2017)
- *Oryzias latipes* (Saraf et al., 2018)
- *Gasterosteus aculeatus* (Williams et al., 2009)
- *Oncorhynchus mykiss* (Daam et al., 2019).

**Valores tabelados para realização das SSDs



Meta 4.4.2. Curvas de distribuição de sensibilidade de espécies (SSDs)

- **Anfíbios nativos** (fase aquática) x **Peixes** (espécies padrão de peixes utilizados em testes de laboratório)
- Os dados de CL50 foram combinados para a construção das SSDs

Condições para plotagem das SSDs:

- Existência de ao menos 4 espécies distintas (anfíbios + peixes) contendo dados de CL50 para um mesmo produto agrotóxico
- Período de exposição agudo (de 1 a 4 dias).

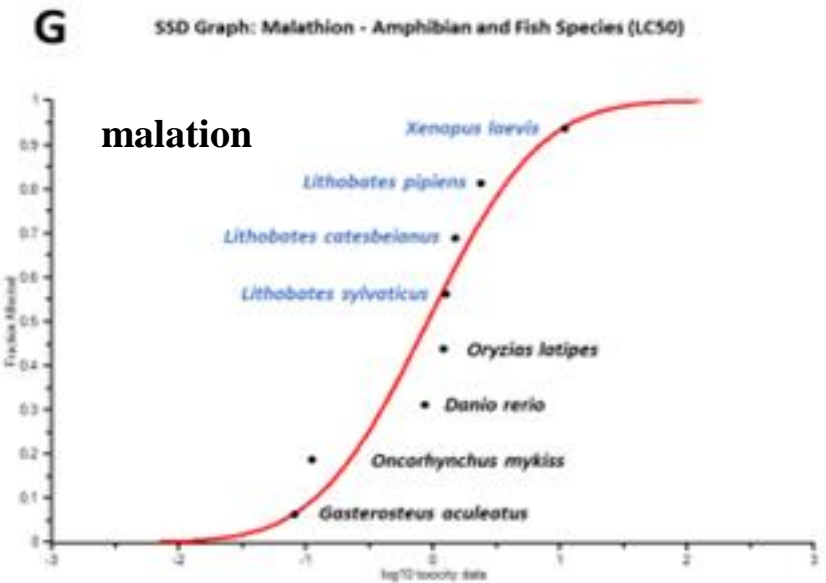
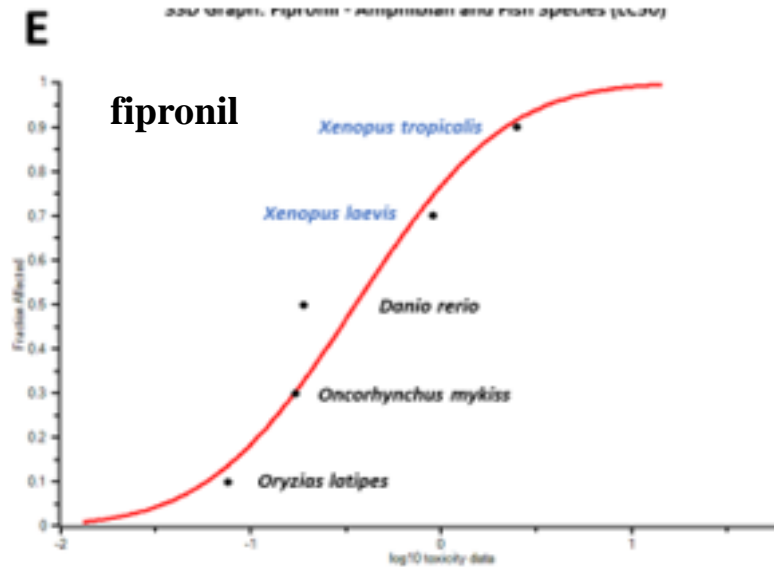
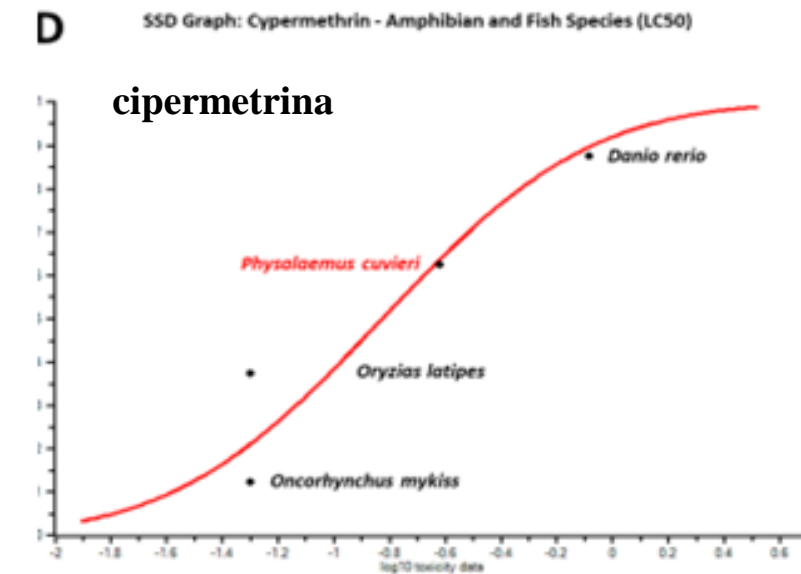
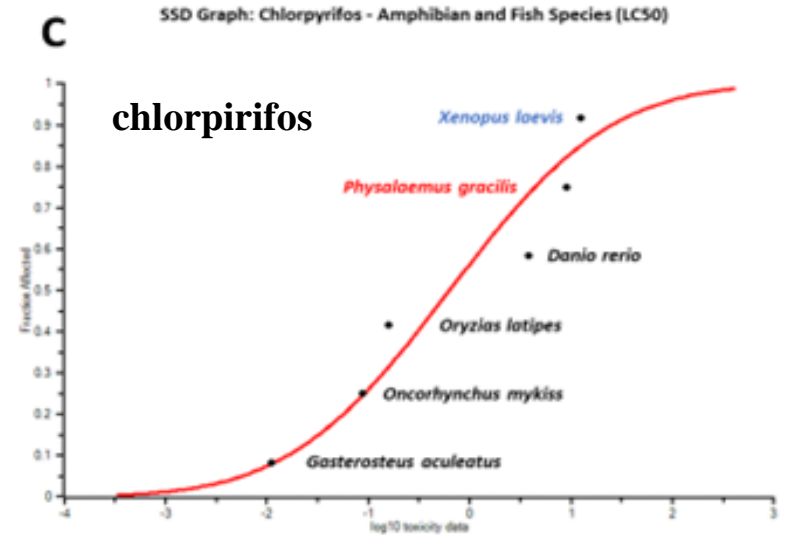
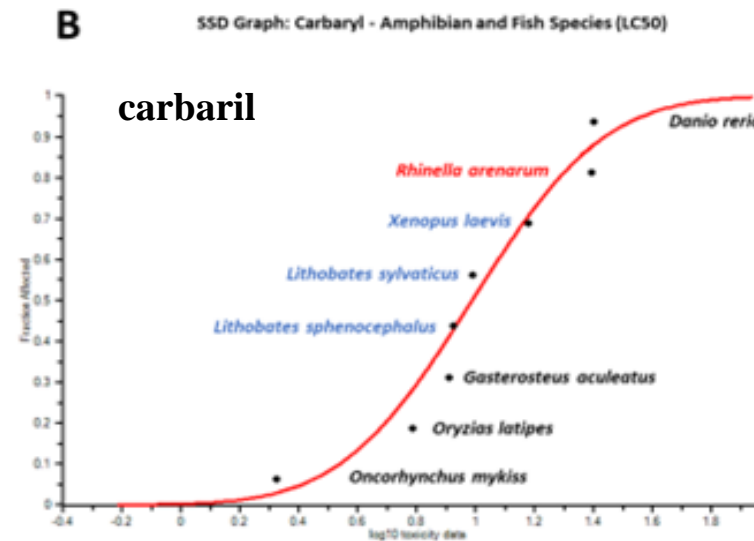
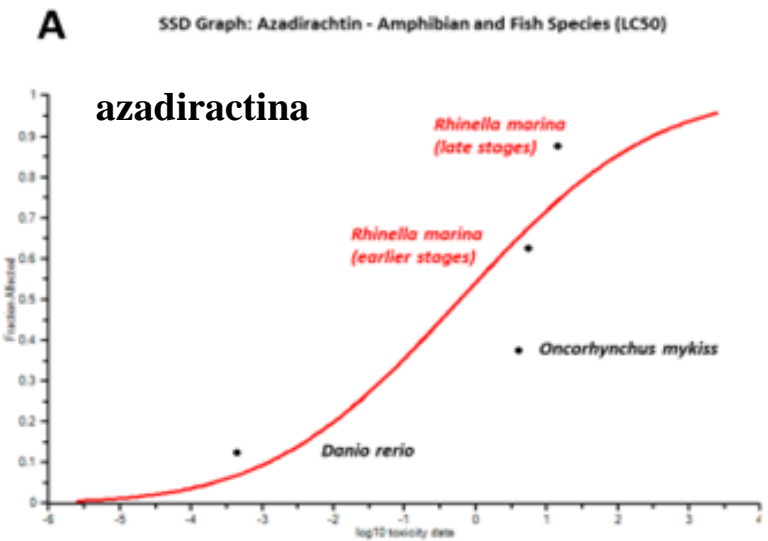
Comparação da sensibilidade relativa:

- **7 inseticidas** (azadiractina, carbaril, cipermetrina, clorpirifós, fipronil, fosmet e malation)
- **3 fungicidas** (chlorothalonil, mancozebe e trifloxistrobina)
- **9 herbicidas** (acetocloro, ametrina, atrazina, diurom, glifosato, glifosato-sal-de-isopropilamina, picloram, simazina, e 2,4D).



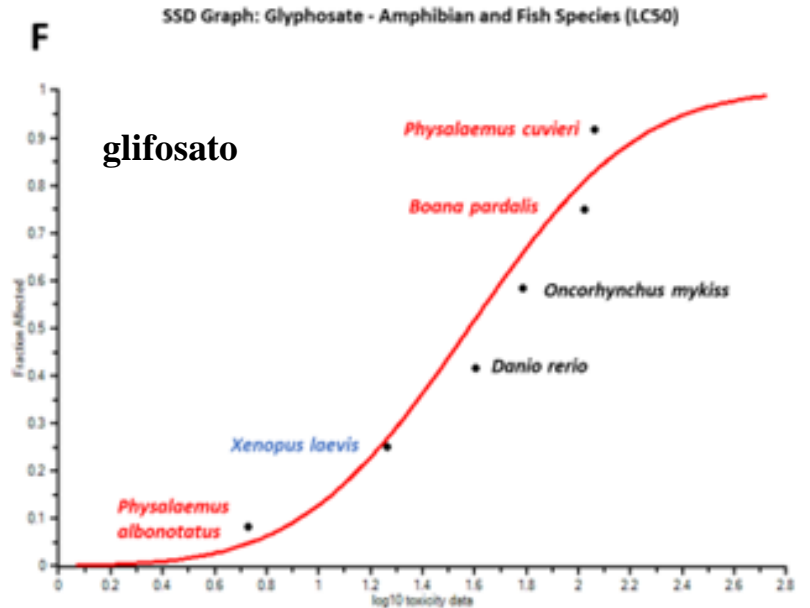
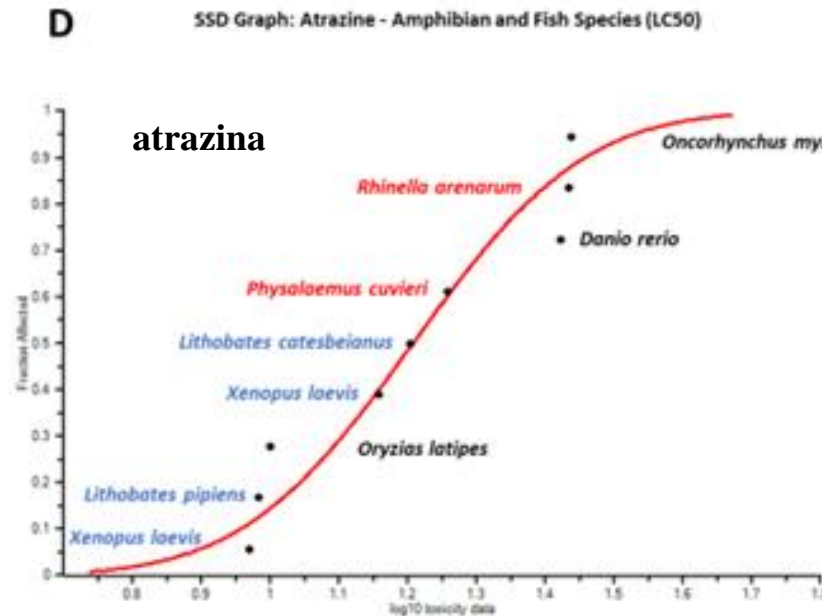
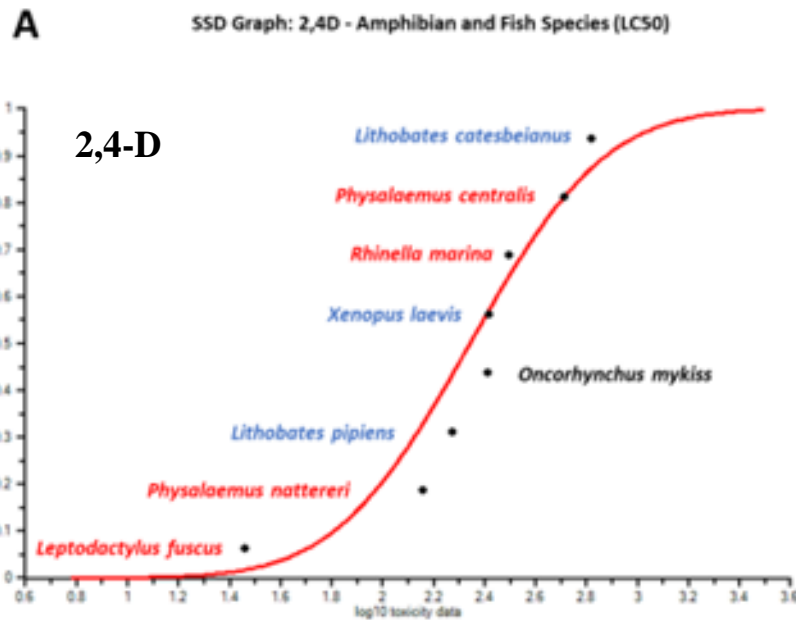
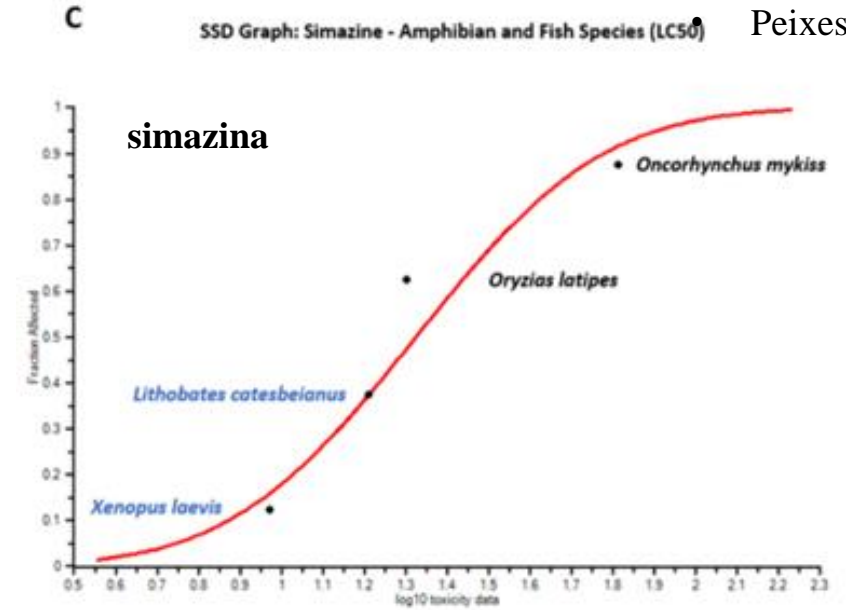
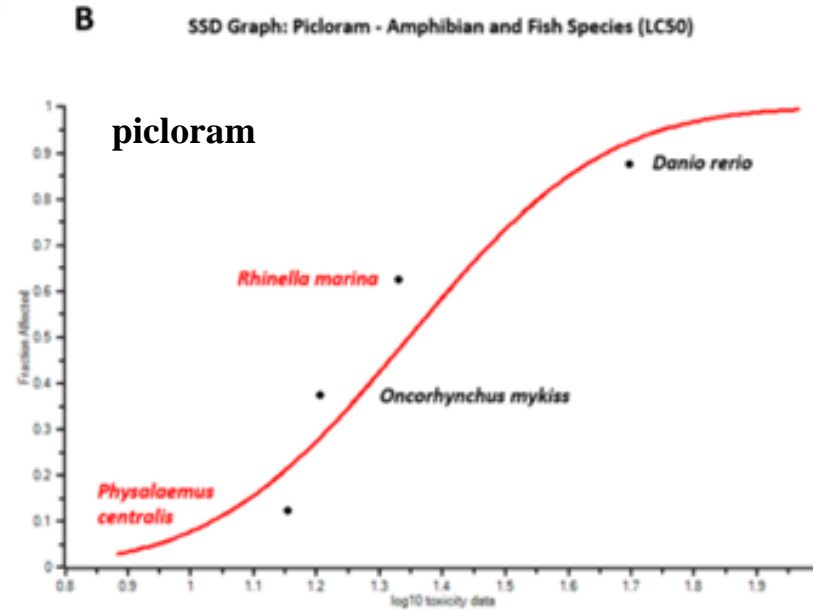
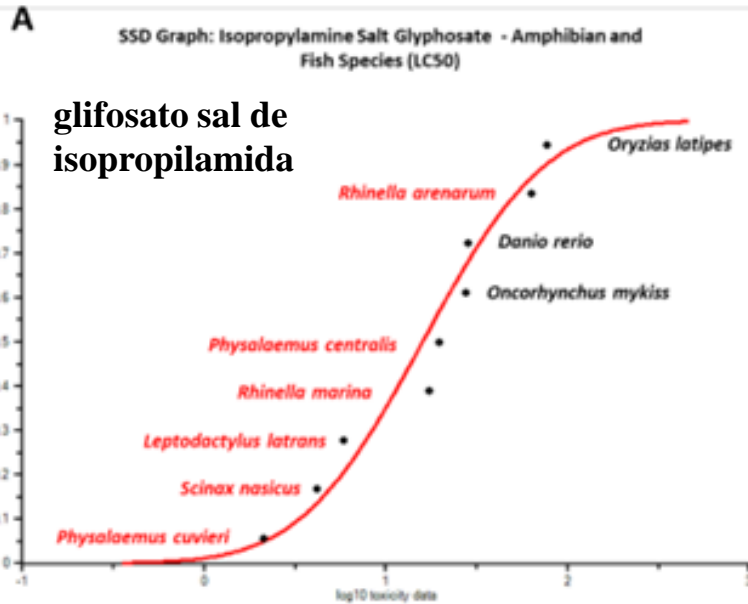
Inseticidas: Peixes x girinos

- Anfíbios modelo
- Anfíbios nativos
- Peixes



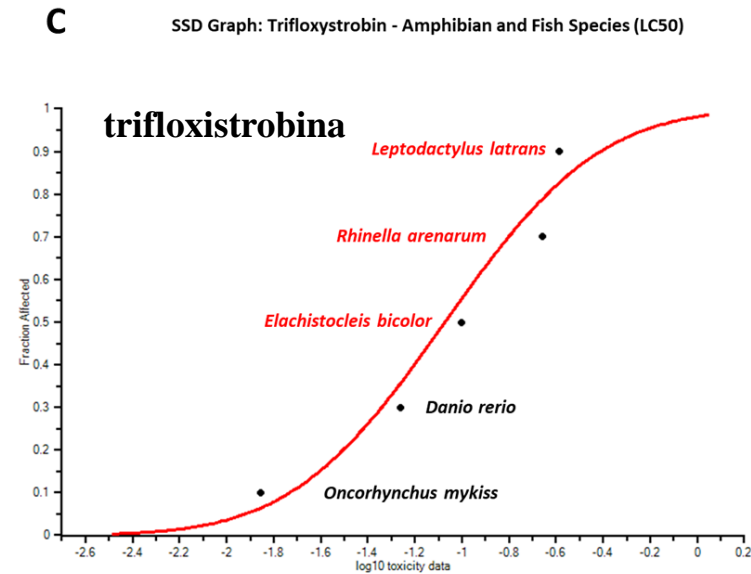
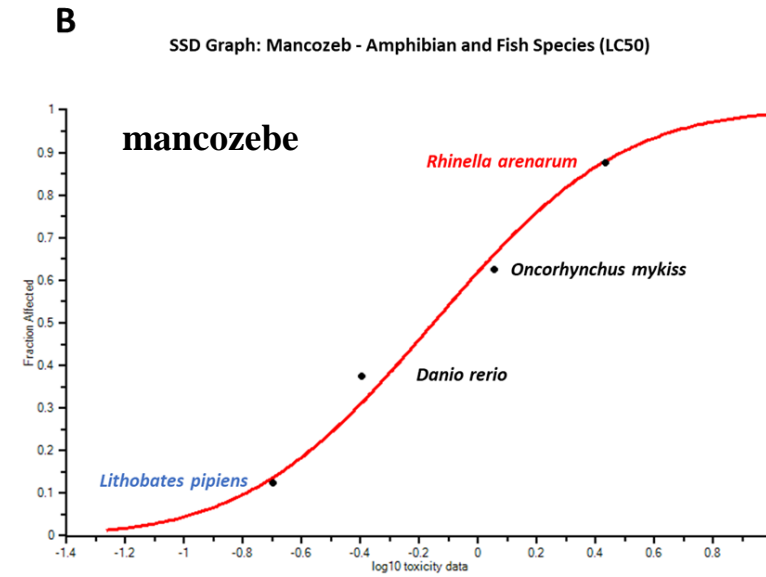
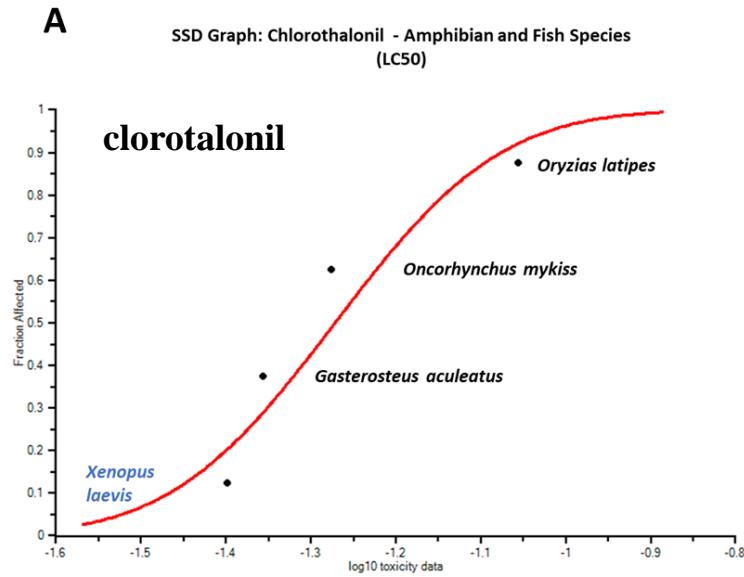
Herbicidas: Peixes x girinos

- Anfíbios modelo
- Anfíbios nativos
- Peixes



Fungicidas: Peixes x girinos

- Anfíbios modelo
- Anfíbios nativos
- Peixes



HC₅ (*Hazard Concentration* - mg/L)
encontrados para as SSDs

Inseticidas - HC₅ (Hazard Concentration - mg/l) 96h

SSD – CL50			
Agrotóxico	HC ₅ (mg/l)	LL HC5	UL HC5
Azadiractina	0.00008	8.68E-12	0.016542753
Carbaril	2.41972	0.737804781	4.476623942
Clorpirifós	0.00415	1.50E-05	0.051406668
Cipermetrina	0.012451	0.000138894	0.054337988
Fipronil	0.028868	0.000943043	0.112191461

Fungicidas - HC₅ (Hazard Concentration - mg/l) 96h

SSD – CL50			
Agrotóxico	HC ₅ (mg/l)	LL HC5	UL HC5
Clorotalonil	0.02814	0.008779411	0.04122098
Mancozebe	0.086346	0.001925649	0.300289185
Trifloxistrobina	0.010293	0.000581703	0.032187005

Herbicidas - HC₅ (Hazard Concentration - mg/l) 96h

SSD – CL50			
Agrotóxico	HC ₅ (mg/l)	LL HC5	UL HC5
2,4D	42.35462	10.346750 22	87.89278597
Acetocloro	0.321497	0.0090099 27	1.037435333
Ametrina	3.047274	0.5938853 64	5.207955698
Atrazina	7.472607	4.1217618 42	10.32810125
Diurom	2.554933	0.1694883 34	6.216161493
Glifosato	4.874665	0.4920081 78	13.60059218
Glifosato sal de isopropilamina	1.986129	0.3963033 97	4.772596376
Picloram	7.918748	1.2219895 14	14.60956598

Meta 4.4.2. Cálculo de fatores de extrapolação (fatores de segurança) de toxicidade entre as espécies:

- Cálculos para “tolerância relativa”
- Toxicidade para o anfíbio (aquático) / Toxicidade para uma espécie modelo

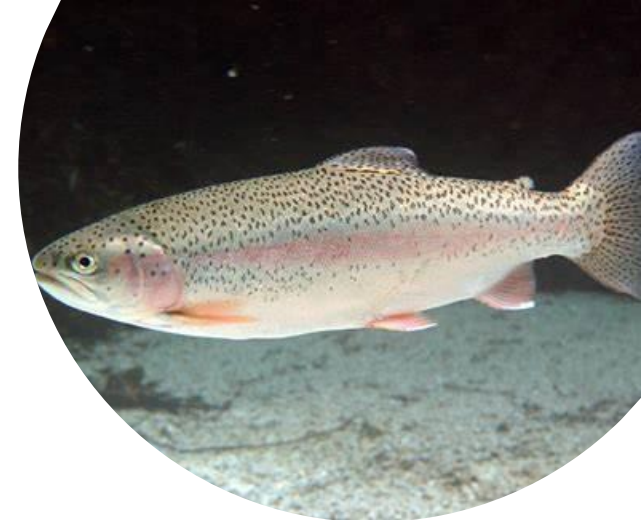
T. Rel. < 1 = maior sensibilidade do anfíbios

*T. Rel. > 1 = maior sensibilidade de *O. mykiss**

- Espécie-modelo eleita: *Oncorhynchus mykiss* (Birge et al. 2000; Ortiz-Santaliestra, 2018; Daam et al., 2019)

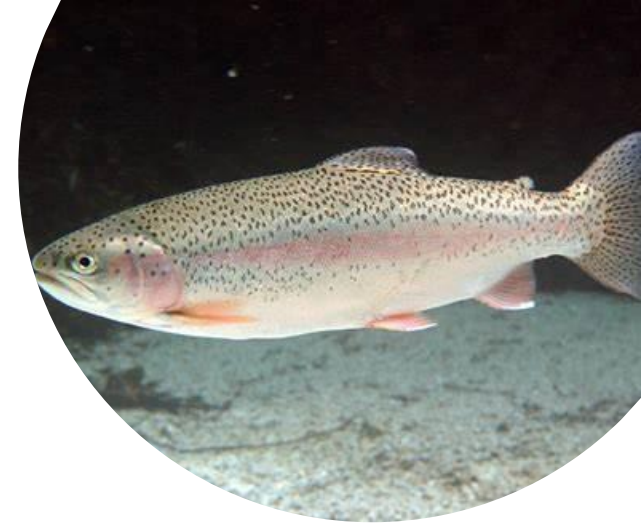
Para os cálculos de tolerância relativa:

- **Toxicidade aguda:** valores de CL50 para 1-4 dias
- **Toxicidade crônica:** NOEC/EC10/LC10 (considerando efeitos sobre a mortalidade, comportamento, morfologia, crescimento e desenvolvimento).



Cálculo de fatores de extrapolação (fatores de segurança) de toxicidade entre as espécies:

- Resultados variados, para ensaios agudos e crônicos
- Para muitos agrotóxicos, *O. mykiss* foi mais sensível
- Para outros, os anfíbios foram mais sensíveis



Para as **13 espécies nativas brasileiras (1.12% das espécies brasileiras)** e **4 espécies modelos:**

Fator de segurança de “100”, que é normalmente aplicado aos valores agudos de CL50 de *O. mykiss* (EFSA, 2013; Daam et al., 2019), pode ser considerado protetivo para os anfíbios (fase aquática) para a maioria dos agroquímicos estudados neste projeto.

Anfíbios já mostraram sensibilidade >100x para algumas subst. (ex. desreguladores da tireoide) (Weltje et al., 2013)

Relevante considerar a **ausência de dados toxicológicos** para **98.89%** das espécies de anfíbios, cujos fatores de segurança podem não ser preventivos.



Produtos com maior sensibilidade para os anfíbios em relação à classe de uso

Tabela 4: Classificação dos agrotóxicos quanto ao modo de ação e destaque dos produtos com maior toxicidade para os anfíbios.

Toxicodinâmica dos Agrotóxicos	
Modo de ação	Nome comum dos compostos
Moduladores de canais de sódio (desregulação nervosa)	Cipermetrina
	Lambda-cialotrina
	Esfenvalerato
Atua vias receptores nicotínicos (desregulação nervosa)	Imidacloprido
	Acetamiprid
	Amitraz
	Clothianidin
	Deltametrina

ou funcionamento de enzimas	Glifosato Glifosato-sal de amônio Glifosato-sal de isopropilamina Glifosato sal de potássio Imazetapir Metolaclo Metsulfuron-methyl Nicossulfurom Sulfometurom-metilico Alaclo Carbendazim Pirimetanil Folpete Propiconazole
Interferentes da síntese de lipídios	Tebuconazol Miclobutanil Triadimenol
Inibição da fotossíntese	Ametrina Atrazine Dibrometo de diquate Diurom, hexazinona
Inibição da cadeia transportadora de elétrons	Prometrina Fludioxonil Piraclostrobina



Estudos de toxicidade com répteis

- “Ecotox Knowledgebase” (US - EPA + artigos)
- Apenas 2 estudos registrando LD50 (imidaclopride e metil tiofanato)



Impossibilidade na realização da meta 4.4.2:
Sensibilidade relativa: Répteis (nativos) x aves (exposição oral)

- Localizamos 70 estudos com Ecotoxicologia de Répteis
- 23 espécies foram testadas:

2 espécies de jacarés

4 quelônios

12 espécies de lagartos

5 espécies de serpentes

Espécie	Nome popular	Habitat/ocorrência
<i>Caiman latirostris</i>	Jacaré-de-papo-amarelo	Brasil, Argentina, sudeste da Bolívia e Paraguai, norte e nordeste do Uruguai.
<i>Alligator mississippiensis</i>	Jacaré-norte-americano	Estados Unidos
<i>Podocnemis unifilis</i>	Cágado de carapaça e pele negra ou tracajá	Venezuela, Guianas e toda a Amazônia do Brasil, além de Colômbia, Peru, Equador e Bolívia.
<i>Trachemys scripta</i>	Tartarugas de água doce	Região Norte Americana
<i>Chelydra serpentina</i>	Tartaruga-mordedora	Habita as Américas, desde o Canadá até o Equador
<i>Graptemys ouachitensis</i>	Tartaruga mapa	Endêmica dos Estados Unidos
<i>Meroles suborbitalis</i>	Lagarto de areia manchado	África do Sul, Namíbia e Botsuana
<i>Podarcis bocagei</i>	Lagartixa-de-bocage	Portugal e Espanha.
<i>Pogona vitticeps</i>	Lagarto dragão barbudo	Endêmico da Austrália
<i>Salvator merianae</i>	Teiú-gigante	Habita grande parte do Brasil e norte da Argentina e Uruguai
<i>Eremias argus</i>	Lagarto	Espécie endêmica da Ásia
<i>Sceloporus occidentalis</i>	Lagarto Norte Americano	Arizona, Novo México, Califórnia, Idaho, Nevada, Oregon, Utah, Washington, norte do México e arredores
<i>Oligosoma polychroma</i>	Lagarto skink	Nova Zelândia
<i>Acanthodactylus dumerili</i>	Lagarto de cotovelo	Saara Ocidental e Central
<i>Pedioplanis namaquensis</i>	Lagarto de areia Namaqua	África do Sul
<i>Podarcis sicula</i>	Lagarto de parede italiano	Nativo da Bósnia e Herzegovina, Croácia, França, Itália, Sérvia, Montenegro, Eslovênia e Suíça
<i>Anolis carolinensis</i>	Lagarto verde	Sudeste dos Estados Unidos e em diversas ilhas do Caribe
<i>Ophisops elegans</i>	Lagarto-de-olho-de-cobra	Endêmica na região do Mediterrâneo e na Ásia Central
<i>Boiga irregularis</i>	Cobra-arbórea-marrom	Nativa no leste e norte da Austrália, Papua-Nova Guiné e em grande número de ilhas a noroeste da Melanésia
<i>Thamnophis marcianus ssp. marcianus</i>	Serpente	Não localizado
<i>Nerodia sipedon</i>	Cobra d'água comum	América do Norte
<i>Nerodia rhombifera</i>	Cobra d'água	Endêmica no centro dos Estados Unidos e no norte do México
<i>Seminatrix pygaea</i>	Cobra do pântano preto	Endêmica no sudeste dos Estados Unidos



Estudos de toxicidade com répteis

Dentre os efeitos mais prevalentes:

- Mortalidade
- Efeitos no desenvolvimento
- Malformações em embriões derivados de ovos expostos aos agrotóxicos
- Genotoxicidade
- Alteração em enzimas antioxidantes
- Parâmetros hematológicos
- Alterações endócrinas
- Danos hepáticos
- Parâmetros imunológicos
- Bioacumulação nos tecidos

Agrotóxicos testados:

28 herbicidas

24 inseticidas

8 fungicidas

1 regulador de crescimento (diflubenzuron)



97.2% dos estudos realizados em laboratório

1 estudo de campo



Estudos de toxicidade com répteis

Tipos de exposição:

- Aplicação por gavagem: 32,78% dos estudos
- Aplicação direta na casca dos ovos: 14,75% dos estudos
- Coleta de ovos em local com a presença de agrotóxicos
- Aplicação dérmica
- Aplicação via alimentação
- Pulverização direta sob os organismos.

PONTOS A CONSIDERAR

Praticamente **todos os estudos** relataram efeitos letais ou subletais nos organismos expostos

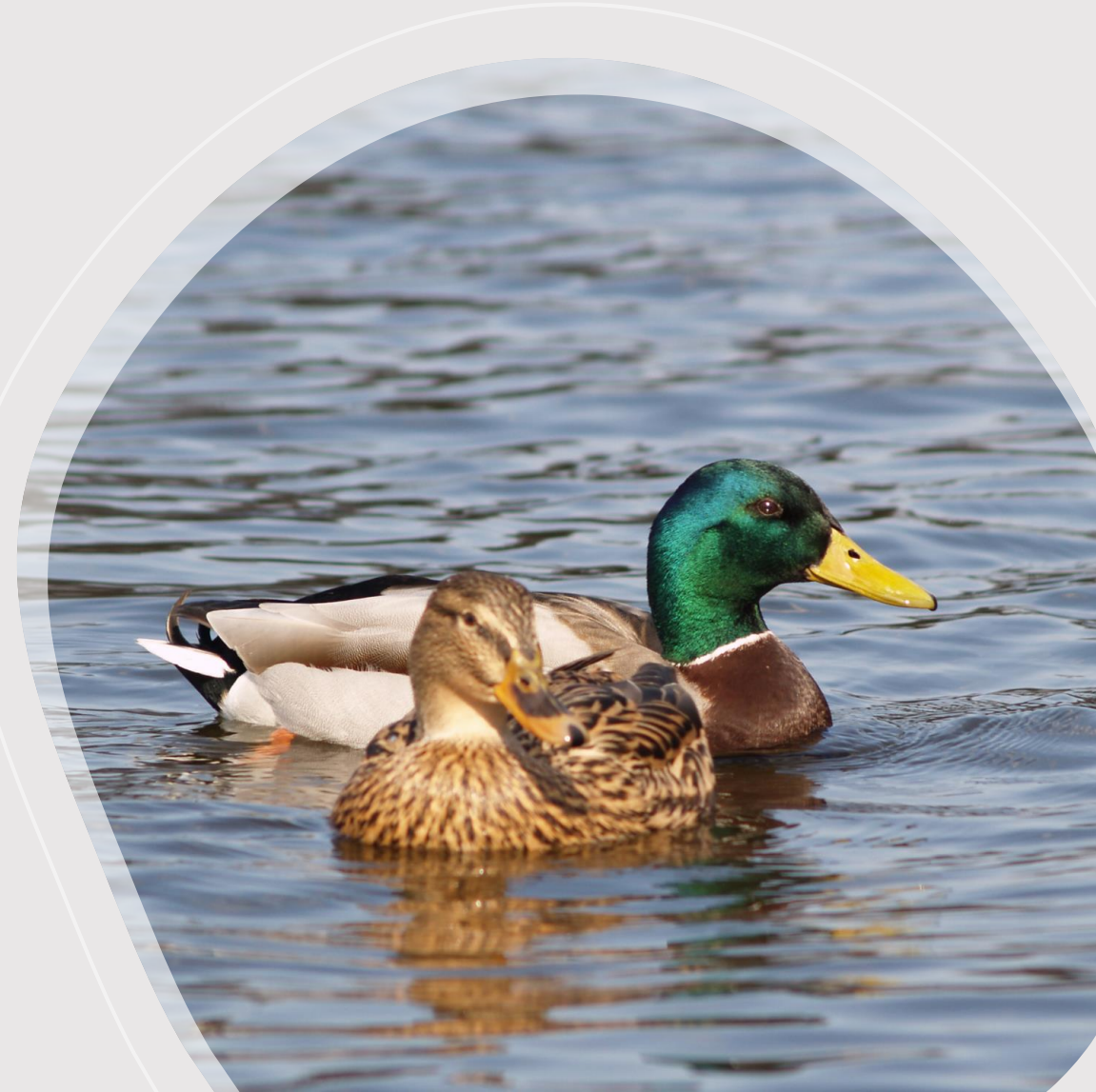
1 estudo: efeito combinado **agrotóxico + temperatura** (Willingham, 2005).

Potencial dos agrotóxicos interferirem em aspectos endócrinos em répteis de clima tropical

Anfíbios nativos (fase terrestre) x aves: exposição via oral



- Estudos majoritariamente baseados em exposição aquática ou semi-aquática
- Raros estudos com exposição via oral em anfíbios nativos



Considerando:

- Os distintos mecanismos toxicodinâmicos dos agrotóxicos
- Vias endócrinas da metamorfose em anfíbios (particularidade dentre os vertebrados)
- Grande limitação de dados toxicológicos para as espécies de anfíbios e répteis nativos

Conclui-se:

- Necessidade de ampliação do conhecimento da toxicidade dos agrotóxicos em anfíbios e répteis (cenário mais realístico)
- Dificuldade em definir fatores de extrapolação seguros para os diferentes agrotóxicos com base nos seus modos de ação e efeitos subletais
- Base de dados muito limitada para assumirmos fatores seguros

