

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

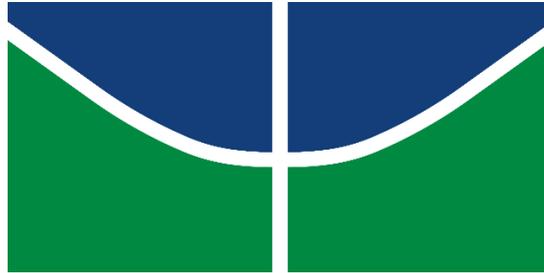
**Efeitos do defensivo agrícola Glifosato no desenvolvimento de lagartos
do gênero Tropicurus (Squamata, Tropicuridae)**

Larissa de Assis Ferreira

Brasília

Agosto de 2021

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

**Efeitos do defensivo agrícola Glifosato no desenvolvimento de lagartos
do gênero *Tropidurus* (Squamata, Tropiduridae)**

Larissa de Assis Ferreira

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zoologia, Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Zoologia.

Orientador(a): Julia Klaczko

Brasília

Agosto de 2021

Epígrafe

“...poderoso para mim não é aquele que descobre ouro.
Para mim poderoso é aquele que descobre as insignificâncias (do mundo e as nossas).
Por essa pequena sentença me elogiaram de imbecil.
Fiquei emocionado”.

Manoel de Barros – Tratado Geral das grandezas do ínfimo

Agradecimentos

Meus incontáveis agradecimentos não envolvem apenas à construção desta dissertação, vai muito além, e é com grande satisfação que carrego os laços familiares que construí durante essa jornada de dois anos. A começar pela grande família, o famoso Anatoteam (LACV), e sua capacidade de acolher todos e todes. Não existem palavras no mundo que transmitam meu agradecimento à “mãe” Julia Klaczko, você é uma orientadora impecável! Obrigada por toda ajuda acadêmica e por ter aturado meus surtos (com lágrimas) todas as vezes que pedras atravessaram meu caminho (falecimento do projeto de pesquisa). Minha filha adotiva, Bela, muito obrigada por toda a dedicação com os animais, por todos os ensinamentos fotográficos, de edição, de tudo, você é incrível e sem defeitos, conte comigo sempre.

Aos irmãos, começando pela Sara, a que chegou junto comigo e estamos até hoje compartilhando das grandes alegrias e dos grandes perrengues que a pós-graduação proporciona. Wellington, que merece o prêmio de maior trabalhador do LACV, me ajudou com exatamente tudo, obrigada pelos auxílios no campo, nas gambiarras, nas fotos e nas outras milhões de coisas. Gabriel e Anderson, vocês foram minhas inspirações acadêmicas para tocar esse trabalho, obrigada por compartilharem as informações, dados, dicas e tudo que pode auxiliar nessa jornada. Juliana, por me ajudar a enfrentar a estatística e pelos cuidados com os lagartos no biotério. Luisa, por ter se juntado a mim e compartilhado das grandes ansiedades finais. A professora Verônica, pela ajuda com as radiografias. E a todos os outros (muitos) irmãos acadêmicos, obrigada por tudo! A vida universitária foi muito mais leve e divertida ao lado de vocês, espero que todos sejam felizes. Saudades de aglomerar com vocês no LACV!

Agora à minha outra família, meus pais, que sempre me apoiaram nas minhas jornadas biológicas, obrigada por me proporcionarem o privilégio da educação, da família e do amor no nosso lar. Meu irmão que compreende o que é ser um estudante e pesquisador brasileiro, obrigada por toda a ajuda na caminhada até hoje.

Por fim, agradeço aos avaliadores, Helga e José, por terem se disponibilizado e aceitado contribuir com este trabalho. Ao apoio financeiro da CAPES, a equipe da secretaria da pós-graduação e a coordenadora da zoologia, prof^a Angele, que nos auxilia e representa com prontidão e apoio.

Sumário

Sumário

Resumo	6
Abstract	7
Introdução	8
Objetivos.....	17
Material e Métodos.....	18
Obtenção e Manutenção das fêmeas	18
Tratamentos dos ovos	18
Embriões e Neonatos.....	20
Identificação e descrição das anomalias	21
Medidas lineares e assimetria flutuante	24
Resultados	26
Mortalidade e viabilidade dos ovos.....	26
Taxas de anomalias	28
Pranchas neonatos	32
Assimetria flutuante	41
Discussão	46
Conclusão.....	50
Referências Bibliográficas.....	51

Resumo

Efeitos do defensivo agrícola Glifosato no desenvolvimento de lagartos do gênero *Tropidurus* (Squamata, Tropiduridae)

Larissa de Assis Ferreira

Orientadora: Julia Klaczko

Resumo da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zoologia, Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Zoologia.

A intensa atividade agrícola vem causando uma mudança significativa no uso do solo e alterando a cobertura terrestre natural. O Brasil possui uma área considerável destinada à agricultura, principalmente para o plantio de grãos, importante fonte exportadora. Com o objetivo de melhorar a produtividade, muitos agricultores utilizam agrotóxicos a fim de evitar pragas indesejadas, e compostos que tem como base o princípio ativo glifosato são os mais vendidos. Apesar de ser aprovado pelas agências sanitárias, o composto pode ser perigoso para os organismos não-alvos, principalmente se usado em excesso e/ou misturado com outros químicos. Sendo assim, nosso objetivo foi investigar como esse composto afeta embriões e filhotes de *Tropidurus torquatus*, uma espécie de lagarto com ampla distribuição no cerrado, bem como um alto grau de sinantropia, que o torna ideal para estudos de desenvolvimento anormal. Para isso, os ovos foram incubados em condições experimentais de contaminação. Posteriormente, analisamos as taxas de mortalidade, anomalias e presença de assimetria flutuante, pois vários estudos sugerem que essa é uma forma de medir o estresse ambiental, sendo um indicador de perturbação. Em comparação aos dados de experimento controle (sem agrotóxico), observamos maior taxa de mortalidade dos ovos submetidos ao contaminante, assim como presença de anomalias, perda de membros e níveis elevados de assimetria flutuante. Nossos achados sugerem que essas mudanças na morfologia podem afetar populações naturais, além disso, lagartos podem ser utilizados como indicadores da qualidade ambiental, estimulando a evolução de mais estudos que envolvam o tema.

Palavras-chave: *Tropidurus*, glifosato, assimetria flutuante, desenvolvimento, estresse ambiental.

Abstract

Efeitos do defensivo agrícola Glifosato no desenvolvimento de lagartos do gênero *Tropidurus* (Squamata, Tropiduridae)

Larissa de Assis Ferreira

Orientadora: Julia Klaczko

The intense agricultural activity has been causing a significant land use and land cover change. Brazil has a considerable area destined to agriculture, the most of part is for the planting of grains. To improve productivity, many farmers use pesticides to prevent agricultural pests, solutions with glyphosate are the best sellers. Although glyphosate has been approved by health agencies, the pesticide can be dangerous to non-target organisms, especially if used in excess and/or mixed with other chemicals. Thus, we investigate how glyphosate affects embryos and offsprings of *Tropidurus torquatus*, a species of lizard with wide distribution in the Cerrado, as well as a high degree of synanthropy, which makes it ideal for embryology and abnormal development studies. The eggs were incubate in contaminated substrate containing pesticide. We analyzed mortality rates, anomalies and fluctuating asymmetry, as several studies suggest that this is a make to measure environmental stress, being an indicator of disturbance. We observed a higher mortality rate of eggs placed to the contaminant, as well as the presence of anomalies, loss of limbs and high levels of fluctuating asymmetry. Our findings suggest that these changes in morphology can affect natural populations, in addition, lizards can be used as indicators of environmental quality, promotion more studies involving the subject.

Key-words: *Tropidurus*, glyphosate, fluctuating asymmetry, development, environmental stress.

Introdução

A dinâmica da cobertura terrestre e o seu manejo é diretamente influenciado pelas atividades antrópicas (Deng et al., 2009). Compreender a ocupação do espaço é um apoio fundamental ao gerenciamento de recursos naturais como a avaliação de riscos ambientais, ordenamento territorial, serviços ecossistêmicos, entre outros (Cruz e Seabra, 2013). As alterações que ocorrem nas formas de uso do solo estão relacionadas aos fatores históricos, socioeconômicos e culturais, e geram impactos ambientais diretos ou indiretos, como no clima, nível do mar e perda da biodiversidade (Teixeira 2005). Dados do IBGE (2018) mostram que a expansão de áreas agrícolas tem modificado fortemente as paisagens naturais, com um crescimento de 7,6% só no ano de 2018, totalizando 664.784 km² de áreas destinadas a agricultura (Figura 1).

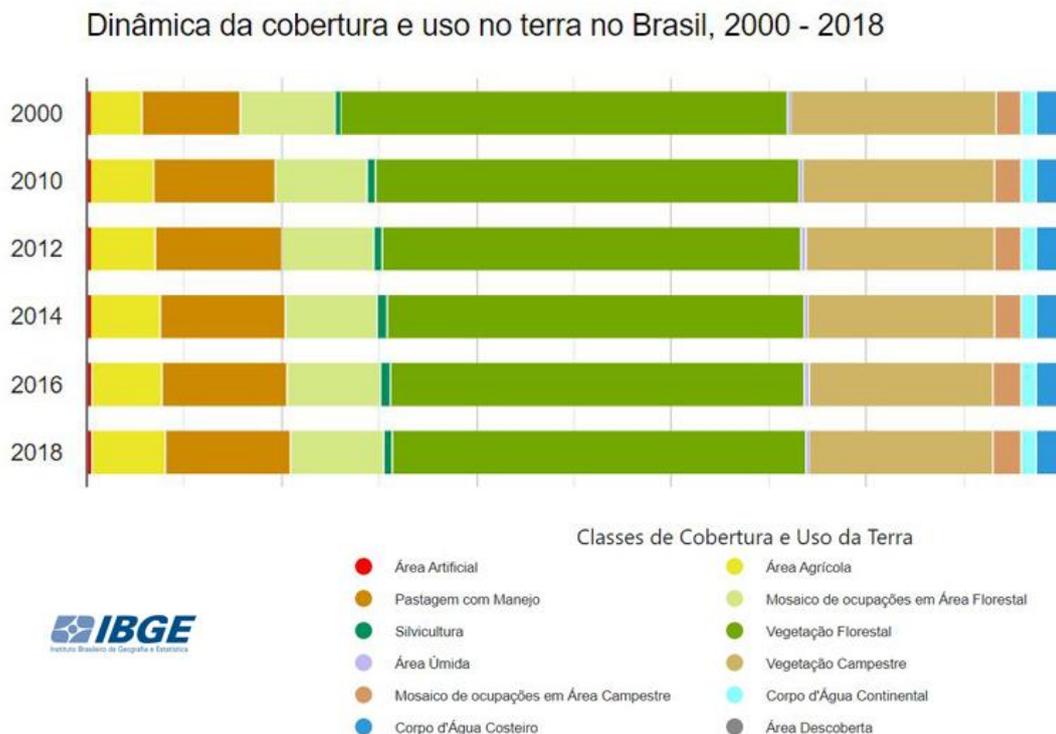


Figura 1. Dinâmica de cobertura e uso da terra no Brasil entre os anos de 2000 a 2018. Extraído e adaptado de “Monitoramento da Cobertura e Uso da Terra no Brasil” Folder, 2020, Mapa completo disponível em:

<https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv101703_folder.pdf>.

Com a expansão de áreas cultivadas no território nacional, a utilização de substâncias químicas sintéticas com propriedades pesticidas tem se intensificado nos últimos anos, assim como a crescente produção e exportação de insumos agrícolas que abrangem principalmente grãos e cereais (Pignati et al., 2017). O termo pesticida é definido como toda substância ou mistura capazes de destruir, repelir ou mitigar alguma praga, estas que são organismos que causam prejuízos às lavouras (Mahmood et al., 2016). No Brasil, utiliza-se termos como pesticidas, defensivos agrícolas, praguicidas, entre outros, para designar os agentes químicos destinados aos setores de produção agrícola (Lucchese, 2005). Entretanto, de acordo com a lei 7.802/89 que os apresenta como “os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos.” (Brasil, 1989. Art. 2; § 1, item A).

Atualmente o herbicida glifosato é o agrotóxico mais vendido no mundo (Figura 2), representando 60% do mercado mundial de herbicidas não-seletivos (Amarante Junior et al., 2002). Apesar de não ser a responsável pela sintetização do glifosato, a multinacional Monsanto foi a primeira a comercializar o Roundup, um herbicida à base de glifosato (Clapp 2021). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) o glifosato é o pesticida mais utilizado no Brasil, somente em 2019 foram vendidas mais de 200 mil toneladas do produto (Figura 2). O composto tem como principal função eliminar ervas daninhas, que nascem espontaneamente nas lavouras e competem com a colheita de interesse (Yamada & Castro, 2007).

O glifosato é considerado um herbicida sistêmico, ou seja, ele se movimenta pelo floema e pelo xilema, suprimindo o crescimento das raízes e partes aéreas da planta através da inibição da enzima enol-piruvil-shiquimato-fosfato-sintase (EPSPs). A EPSP está envolvida na síntese de aminoácidos aromáticos (tirosina, triptofano e fenilalanina). Esses aminoácidos são precursores de compostos que têm inúmeras funções essenciais nas plantas (Thompson et al., 2006). Os herbicidas inibidores da enzima EPSPs são prontamente absorvidos pela folhagem das plantas e translocados no floema para os drenos metabólitos (órgãos de armazenamento, gemas) (Gruys & Sikorski, 1999). O

bloqueio da síntese de EPSP, nessa via, resulta no acúmulo de shikimato na planta e em uma perda de aminoácidos aromáticos necessários para produção de proteínas essenciais para o crescimento de plantas. Essas proteínas formam outros compostos essenciais, tais como hormônios e flavonóides (Ross; Childs, 1996).

Em geral, o glifosato é vendido em concentrações de 48% (m/v) e as doses recomendadas pela Monsanto variam de 1,5 L/ha a 4,5 L/ha (Bromcomp, 2011). As formulações encontradas no mercado contêm surfactantes, cuja finalidade é impedir a formação de gotículas sob as folhas, auxiliando na eficiência de absorção pelas plantas que são pulverizadas (Amarante Junior et al., 2002). Os compostos surfactantes mais utilizados são as etilaminas, que por terem sua toxicidade comprovada, está sendo substituído nos últimos anos por outras formulações de menor risco (Martins et al., 2009).

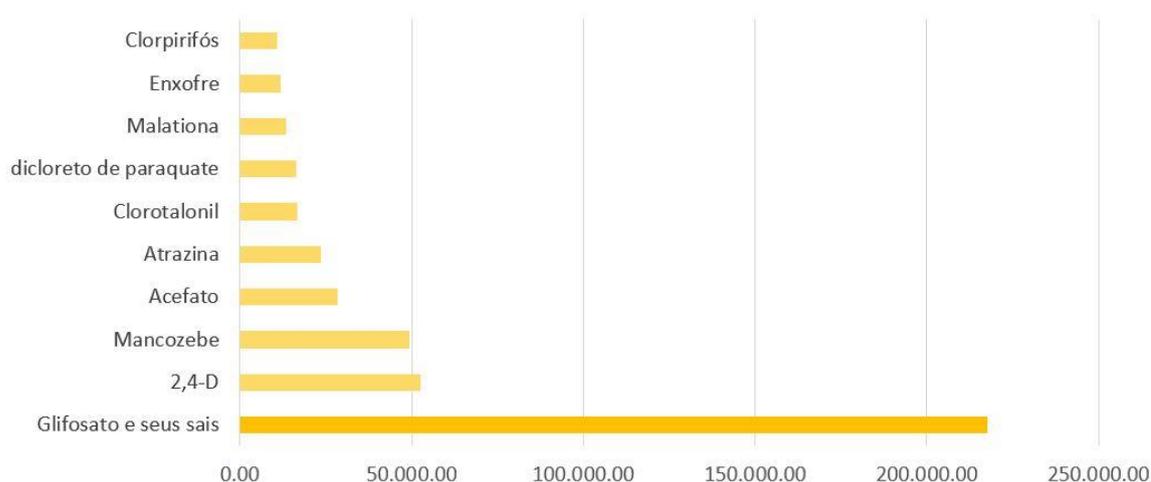


Figura 2. Os dez ingredientes ativos mais vendidos utilizados na agricultura, observa-se a discrepância no número de venda para o glifosato e seus sais, com cerca de 217 mil toneladas vendidas no ano de 2019, segundo dados do IBAMA atualizados em agosto de 2020. Fonte: autor, com base em dados disponíveis em <<http://www.ibama.gov.br/dados-abertos>>.

Quando o agrotóxico é aplicado nas lavouras, a parte que não é absorvida pelas plantas, fica depositada no solo, a partir daí vem o processo de como o composto se comporta no ambiente (Andrea et al., 2004). Segundo Locke et al. (2008) a permanência do glifosato no solo é muito variável, podendo sofrer os processos de degradação e adsorção, no caso desta, a substância permanece retida no solo, sem ser incorporado ao meio. Após o processo de adsorção, os resíduos de glifosato permanecem no ambiente por dias ou meses, dependendo das condições do solo, como Ph, conteúdo de carbono orgânico e etc (Locke et al., 2008). A atividade microbiana utiliza os resíduos do

composto como fonte de energia, portanto, os microrganismos são os principais responsáveis pela degradação do glifosato no solo (Mattos et al., 2002).

Desde que foi introduzido no mercado, o uso do glifosato se tornou prática frequente, uma vez que sua utilização nas culturas se tem mostrado vantajosa em relação a outros métodos de controle de plantas daninhas (Rodrigues & Almeida, 2005). Além disso, com o advento das culturas resistentes ao glifosato, muitos fazendeiros estão aumentando o uso do herbicida, sem seguir rigorosamente os períodos de pausas e quantidades corretas (Locke et al., 2008). Apesar de não apresentar bioacumulação, esse uso indiscriminado do composto, ligado às interações com outros herbicidas e seus surfactantes geram impactos negativos em organismos não alvos presentes na biota do solo (Braibante, 2012; Battaglin et al., 2002).

Existem algumas evidências que confirmam a capacidade tóxica do glifosato em organismos não alvos, por exemplo, gerando distúrbios no comportamento de abelhas (Balbuena, 2015; Herbert et al. 2014); afetando a reprodução e desenvolvimento de anelídeos (Gaupp-Berghausen et al., 2015), crustáceos (Hartman & Martin 1984; Cuhra et al. 2013; Dutra et al. 2011) e gastrópodes (Tate et al. 1997). Em alguns experimentos realizados com peixes, o glifosato foi capaz de alterar vias de sinalização ligadas ao estresse celular, alterações enzimáticas e hepáticas (Webster & Santos, 2015; Murussi et al., 2016; Menéndez-Helman et al., 2012; Salbego et al., 2010). Em anfíbios, o composto já apresentou genotoxicidade, anormalidades na cavidade oral, esquelética e atrasos no desenvolvimento (Soloneski et al. 2016; Bach et al., 2016; Pérez-Iglesias et al. 2016; Howe et al., 2004). O risco causado pelo glifosato também foi registrado em alguns répteis, causando estresse fisiológico em *Oligosoma polychroma* (Carpenter et al. 2016), e alterações embrionárias em *Podocnemis unifilis* (Hirano et al., 2019). Nos ambientes próximos a grandes lavouras que utilizam o glifosato, algumas espécies de aves apresentaram alterações hormonais que afetaram a morfologia de órgãos reprodutores, ligados a ecologia do processo de coorte e reprodução (Linz et al., 1996; Santillo et al., 1989; Oliveira et al., 2007). Em mamíferos esses distúrbios ligados a aspectos reprodutivos também foram examinados por Romano et al. (2010) utilizando camundongos como modelo; além disso, foram encontradas alterações nas células

hepáticas, renais e no pâncreas de animais que foram submetidos a experimentos com concentrações elevadas de glifosato (Oliveira et al., 2007).

O Brasil é um dos países que abriga o maior número de espécies de répteis do mundo, dentro deste grupo, os lagartos se destacam pela sua extrema diversidade, com mais de 5000 espécies já registradas (Uetz, 2019). Apenas no cerrado, savana com maior biodiversidade do mundo, já foram listadas mais de 150 espécies (Azevedo et al., 2016). Os lagartos apresentam uma ampla variedade morfológica e comportamental, ocorrendo em diversos tipos de ambientes e explorando estilos de vida terrestres fossoriais, arborícolas, sob rochas e próximos a corpos d'água (Carvalho, 2013). Podendo ser presas ou predadores, os lagartos ocupam posições-chave dentro da dinâmica ecológica dos sistemas naturais (Huey et al., 2009).

Por serem animais ectotérmicos, os lagartos dependem da variação da temperatura ambiental para desempenhar seu metabolismo e desenvolver atividades fisiológicas estáveis (Huey et al., 1982). Por exemplo, a modificação do habitat causada pelo homem pode afetar negativamente estes animais, que estão submetidos a novas condições tendo que se aclimatar (Hall & Warner, 2018). Esses habitats influenciam nas taxas de mortalidade, alteram densidades populacionais e padrões no comportamento (Koenig et al., 2002; Marzluff, 2001; Lowry et al., 2013). Nas últimas décadas, estudos que englobam os efeitos da temperatura ambiental sob os lagartos vêm sendo alvo de investigações. Já foi registrado que o aquecimento influencia no forrageamento e reprodução (Huey et al., 2010); aumenta a taxa de mortalidade dos ovos e gera malformações no desenvolvimento (Hall & Warner, 2018; Oliveira, 2019). Entretanto, é recente a abordagem que analisa a susceptibilidade destes organismos a outros tipos de alterações no habitat, como por exemplo, a expansão de áreas agrícolas e consequentemente o uso de compostos químicos em lavouras (Verderame & Scudiero, 2019).

Os répteis geralmente são negligenciados nos relatórios de avaliações de riscos ambientais, sob o ponto de vista que aves e mamíferos já representam bem essas estimativas (Weir et al., 2010). Apesar disso, as características fisiológicas únicas dos répteis pressupõem que alguns pesticidas podem ser mais tóxicos para os répteis do que

outros grupos de animais (Campbell & Campbell, 2002). Dentro deste grupo, os lagartos se destacam, pois, compreendem uma grande parte da diversidade de répteis, além de estar presente em diversos ecossistemas, terrestre e aquático (Brandt & Navas, 2011). Estes animais são expostos aos pesticidas de várias maneiras, como pela inalação, exposição cutânea, ingestão direta e transferência do meio externo para o ovo em caso de ambientes de incubação contaminados (Carpenter et al., 2016).

Em uma revisão recente que aborda a toxicidade de pesticidas em lagartos (Freitas et al., 2020), os autores realizaram um levantamento das publicações nesta temática, de 2015 a 2020, onde apenas 3 trabalhos (18,75%) exploraram os efeitos de herbicidas em lagartos. Formulações de glifosato foram testadas em *Oligosoma polychroma*, um lagarto comum na Nova Zelândia. Simulando uma cobertura vegetal contaminada, os lagartos poderiam escolher temperaturas mais quentes ou mais frias dentro do terrário, após algumas semanas, os resultados mostraram que os espécimes selecionaram temperaturas significativamente mais altas, indicando um estresse fisiológico (Carpenter et al., 2016). Outro lagarto que apresentou toxicidade diante do composto contendo glifosato foi *Salvator merianae*, desta vez os testes foram realizados durante o desenvolvimento embrionários, os neonatos não demonstraram deficiências na morfologia, entretanto, alguns testes apontaram danos iniciais ao DNA, porém o sistema de reparo foi capaz de reverter esses danos após um tempo (Schaumburg et al., 2016). Já em *Eremias argus* o dano causado foi neurotóxico, onde os animais que estavam em um solo contaminado apresentaram anormalidades nas enzimas que controlam atividades antioxidantes indicando neurotoxicidade (Zhang et al., 2016).

Na região centro-oeste do Brasil, o cultivo de soja geralmente acontece entre setembro e dezembro (Figura 3), e as colheitas são feitas a partir de janeiro do ano seguinte (Conab, 2019). Durante o período de cultivo, os agricultores aplicam inseticidas, fungicidas e herbicidas, principalmente os que tem como ingrediente ativo o glifosato (Moraes, 2019). Esse evento coincide com a estação reprodutiva de lagartos do gênero *Tropidurus torquatus* (Wied, 1820), que se estende de agosto a fevereiro, onde as fêmeas de geralmente realizam uma desova de aproximadamente 5 ovos, podendo chegar até 10 (Wiederhecker et al., 2002). Os ovos são comumente encontrados em cavidades rochosas e fendas cobertas com terra, bem como no próprio solo (Vitt & Goldberg, 1983).

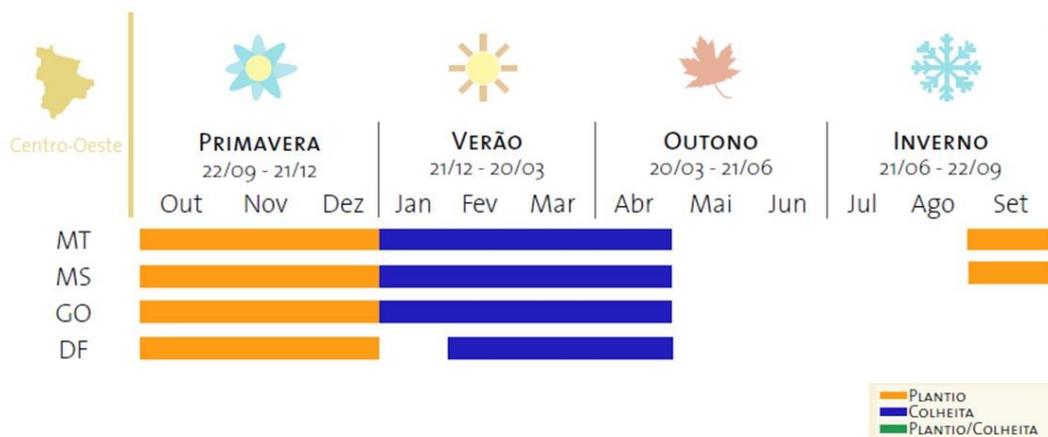


Figura 3. Calendário de plantio de soja na região centro-oeste do Brasil. Extraído e modificado do Calendário de Plantio e colheita de grãos no Brasil 2019, fornecido pela Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>

A partir do momento em que os ovos são depositados no ambiente, os embriões estão susceptíveis as condições externas visto que *Tropidurus torquatus* produzem ovos com a membrana da casca flexível, o que permite a absorção de água do substrato para que o embrião possa completar seu ciclo embrionário com sucesso (Kiefer et al., 2008). Durante esse processo, contaminantes presentes no solo podem ser transferidos do ambiente externo para o ambiente interno do ovo, esse evento pode gerar efeitos negativos, afetando o desenvolvimento saudável do embrião (Schaumburg et al., 2016).

Esta é uma espécie que vêm sendo amplamente estudada nas últimas décadas, principalmente os aspectos como morfologia e evolução (Brandt et al. 2011; De-Lima et al., 2019), reprodução (Teixeira et al., 1999; Wiederhecker et al., 2002), fisiologia (Bergallo & Duarte Rocha, 1993; Ribeiro et al., 2008) e outros. Popularmente conhecido como calango, os indivíduos dessa espécie ocupam diversos tipos de ambientes, dentre florestas e áreas abertas como o cerrado brasileiro (Rodrigues, 1987). Além disso, nos últimos anos, a vulnerabilidade destes organismos a mudanças ambientais vem sendo foco de alguns estudos (Piantoni et al., 2019; Oliveira, 2019).

Apenas um estudo com *Tropidurus torquatus* em áreas contaminadas com agrotóxicos foi realizado até o momento. Almeida et al. (2021) observou que machos da espécie apresentaram um menor volume dos testículos, se comparados com indivíduos

que não vivem em ambientes contaminados, sugerindo que os compostos podem afetar na eficiência reprodutiva da espécie.

Quando fases críticas do desenvolvimento dos animais são afetadas pelo estresse, o organismo pode apresentar fenótipos anormais, além disso, uma grande parte da população pode ser afetada quando o estresse é muito severo, afetando a estabilidade do desenvolvimento dos indivíduos (Parsons, 1992). Essa estabilidade é a capacidade que o organismo tem de lidar com as perturbações que afetam seu fenótipo, que é geneticamente pré-determinado, permitindo a manutenção dos traços mesmo em condições adversas, assim, o organismo desenvolve a habilidade de produzir uma forma “ideal” (Markow, 1995; Palmer, 1994). *A priori*, a morfologia ideal de um organismo não pode ser definida, entretanto, observar a simetria de um organismo pode auxiliar no entendimento desta busca por um modelo ideal de caracteres dos indivíduos (Palmer, 1994).

Desta forma é possível relacionar as perturbações ambientais nas espécies e seus efeitos na estabilidade do desenvolvimento através da simetria corporal dos organismos. A simetria é uma configuração básica da forma corporal, que se refere a um arranjo regular das estruturas diante de um eixo corporal (Brusca & Brusca, 2007). Portanto as características morfológicas de ambos os lados de um animal bilateralmente simétrico deveriam se desenvolver de forma idêntica, já que são expressões de um mesmo genoma (Clarke, 1998). Caso isso não ocorra, pode haver um indicativo de que algum fator genético está afetando a estabilidade desse organismo, e esse fator pode estar relacionado com a qualidade ambiental (Leary & Allendorf, 1989). Em animais bilaterais podemos indicar três tipos de assimetria: a flutuante (AF); direcional (AD) e a antissimetria (AT) (Van Valen, 1962) (Figura 4).

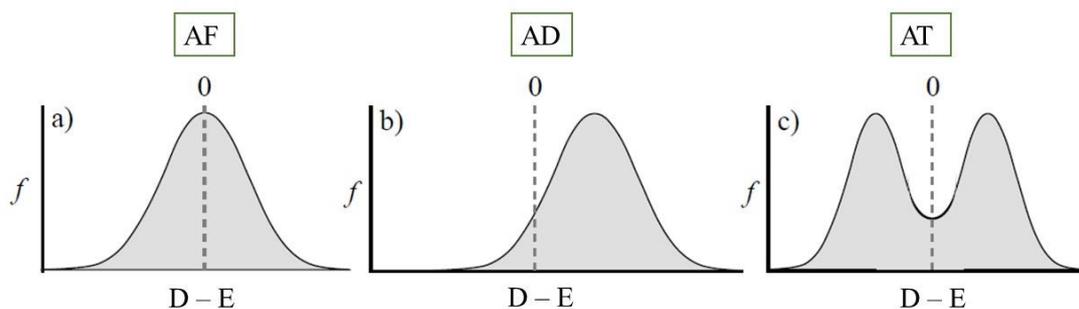


Figura 4. Distribuições mais comuns da diferença entre os lados direito e esquerdo em organismos bilaterais: a) assimetria flutuante, b) assimetria direcional, c) antissimetria. Onde $D - E$, é a diferença entre os lados direito (D) e esquerdo (E). Extraído e adaptado de Palmer (1994).

A assimetria direcional acontece quando o desvio de uma característica bilateral é sempre maior em um lado do que em outro, onde o lado maior geralmente é o mesmo em toda a população, por exemplo, o coração de mamíferos (Van Valen, 1962). Esse tipo de assimetria ilustra uma distribuição normal da frequência de medidas direitas e esquerdas ($D - E$), essa diferença entre os lados pode ser pequena, mas é sempre diferente de zero (Palmer & Strobeck, 1986).

A antissimetria é uma situação menos comum, ocorre quando a assimetria é presente, mas aleatória, assim o lado que se desenvolve mais é variável, como por exemplo os organismos destros e canhotos de uma população (Van Valen, 1962). Neste caso, a distribuição da frequência ($D - E$) segue o padrão bimodal, com média igual a zero.

A assimetria flutuante é a mais utilizada para medir a instabilidade do desenvolvimento, dado que ela resulta na inabilidade de um organismo de se desenvolver em um caminho precisamente determinado, isso pode refletir um estresse genético ou ambiental como condições extremas de temperatura, poluição, endogamia, entre outros (Palmer, 1994, 1996; Parsons, 1962; Anciães & Marini, 2000). Como os possíveis distúrbios responsáveis pelos erros na simetria são aleatórios, a assimetria flutuante de uma população exibe uma distribuição normal da diferença ($D-E$) e uma média igual a zero (Palmer, 1994). Essa condição pode afetar o *fitness* dos indivíduos de uma população, pois indivíduos simétricos indicam maior estabilidade e posteriormente maior capacidade de lidar com condições adversas durante o seu desenvolvimento (López *et al.*, 2002). Em lagartos, já foi registrado que fêmeas de *Lacerta monticola* têm preferência por machos com menores taxas de assimetria flutuante, influenciando assim no sucesso reprodutivo destes indivíduos (López *et al.*, 2002). Outra evidência da relação entre o *fitness* e a assimetria flutuante é no caso de *L. monticola*, onde os machos que possuem fêmures assimétricos alcançaram uma menor velocidade de fuga do que lagartos mais simétricos (Martín & López, 2001).

Por se tratar de um indicador de estresse para os organismos em perturbação, a assimetria flutuante pode ser um bom indicativo de bio-monitoramento e qualidade ambiental, permitindo a visualização de mudanças ambientais severas, que podem vir a afetar populações de forma irreversível (Silva *et al.*, 2007; Schmeller *et al.*, 2011).

Tendo em vista todas estas informações e fatores citados acima, acreditamos que os efeitos do glifosato, quando presente e acumulado no solo podem gerar sequelas aos embriões e neonatos de *Tropidurus torquatus*. Portanto, em nossos testes experimentais, esperamos: (1) uma diminuição da taxa de natalidade dos ovos submetidos aos tratamentos com o composto; (2) um aumento da taxa de assimetria flutuante nos neonatos que nasceram sob estresse; (3) aumento na taxa de anomalias dos indivíduos; (4) resposta dose-dependente ao estresse induzido pelo glifosato, ou seja, dosagens maiores são mais nocivas aos indivíduos.

Objetivos

Tendo em vista a condição de estresse ambiental que os indivíduos de *Tropidurus torquatus* podem sofrer com o uso dos agroquímicos, nosso objetivo geral neste estudo é: avaliar possíveis alterações morfológicas e sequelas que o agrotóxico glifosato pode causar nos embriões e neonatos, a partir do momento em que os ovos são colocados no ambiente contaminado.

Sendo assim, nossos objetivos específicos são:

- Avaliar a taxa de viabilidade e mortalidade dos ovos que foram incubados no solo contaminado com glifosato, e comparar com ovos incubados em condições controladas e sem estresse;
- Observar e descrever as anomalias nos neonatos que nasceram sob estas condições; os efeitos da exposição dos embriões ao glifosato
- Avaliar as taxas de assimetria flutuante como medida de estresse, analisando em caracteres morfológicos.

Material e Métodos

Obtenção e Manutenção das fêmeas

Foram obtidas 22 fêmeas de *Tropidurus torquatus*, a coleta foi feita entre os meses de outubro a dezembro de 2019, visto que esse período é registrado como a estação reprodutiva da espécie (Wiederhecker et al., 2002.) A captura foi realizada nas áreas do campus Darcy Ribeiro da Universidade de Brasília, Distrito Federal, Brasil, por meio de busca ativa e captura manual com auxílio de vara de pesca adaptada com laço. Uma vez capturadas, as fêmeas foram levadas ao biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

No biotério, as fêmeas foram colocadas em terrários de dimensão de 70x30x50 cm, até três indivíduos em cada. Os terrários foram forrados com areia lavada e vermiculita, e umidificados diariamente. Alimentação era fornecida uma vez ao dia, composta de baratas núbias e tenébrios molitores junto de suplementação de cálcio e vitaminas específicas para répteis e água a vontade. Além disso, foram dispostas placas de aquecimento nos terrários e lâmpadas que ficavam ligadas por um período de 10h/dia. Os terrários foram checados diariamente durante todo o período de permanência das fêmeas, até o momento da desova. Após a desova, os ovos foram retirados do terrário, limpos e individualizados, e as fêmeas foram soltas no campus onde foram coletadas.

O procedimento de coleta foi realizado sob licença SISBIO/IBAMA (63226-2) e a manutenção dos lagartos, assim como o tratamento dos embriões foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal da UnB (CEUA 116/2017).

Tratamentos dos ovos

Os ovos foram aleatoriamente dispostos em um tratamento contendo diferentes diluições de Glifosato *Roundup original*®: 1mg/L; 2,5mg/L e 5 mg/L. Obtidos a partir da solução concentrada do composto e água destilada. Essas diluições foram baseadas em estudos de exposição e efeitos à diferentes ativos agrícolas em vertebrados (Mendonça et al., 2016; Paganelli et al., 2010).

Para minimizar o efeito genético da linhagem, os ovos foram aleatoriamente alocados em um dos três tratamentos descritos acima. Cada ovo foi colocado em um recipiente plástico e identificado com o dia, mês e ano da desova, além de conter as iniciais da espécie e um número ordinal com relação aos demais. Cada recipiente foi preenchido com vermiculita e umidificada com 50ml de solução de Glifosato *Roundup original*® e tampado. Por fim, os recipientes foram colocados na incubadora da marca Premium Ecológica® (Figura 5) que permaneceu a uma temperatura constante de 30°C preenchida com água para garantir a umidade constante e variações mínimas de temperatura no interior do equipamento. Os ovos foram checados diariamente a fim de registrar os nascimentos (Figura 6).

Alguns dados não publicados dos colaboradores Oliveira (2019) cedidos para fins de comparação e análises neste estudo. Experimentalmente, o autor utilizou o aumento da temperatura como fator estressante para os ovos, que foram incubados em simulando projeções de aquecimento global. Dentre os resultados, foram encontradas anomalias no desenvolvimento causados pelo estresse do aumento da temperatura de incubação em *Tropidurus torquatus*. Os dados dos ovos submetidos ao tratamento controle foram utilizados nas análises deste presente estudo. Nesta situação os ovos foram incubados em uma temperatura constante de 30°, uma vez que o estudo de ontogenia realizado para a espécie (Rapp Py-Daniel et al., 2017) foi feito com essa temperatura.

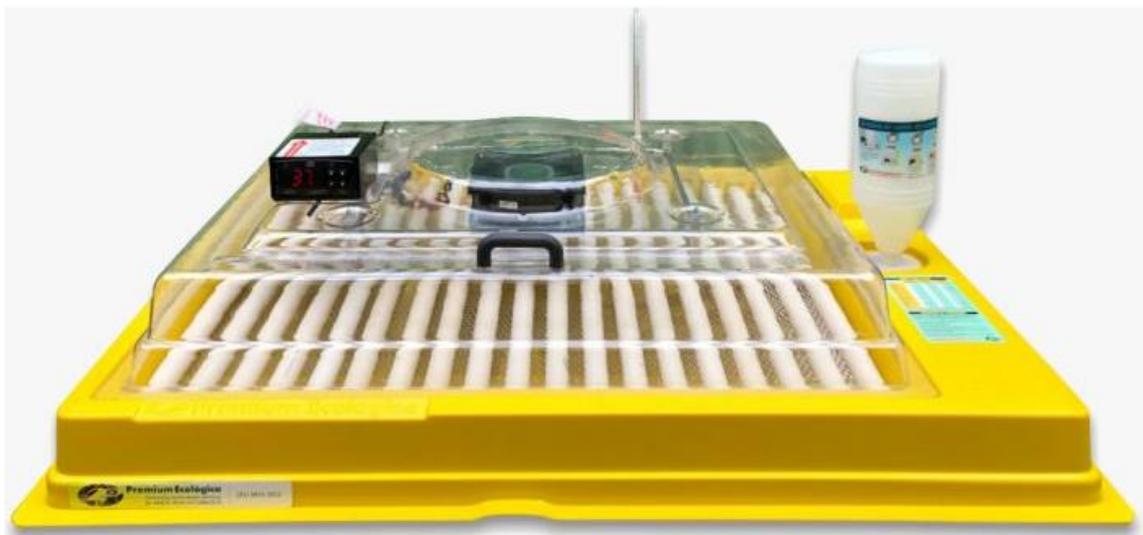


Figura 5. Chocadeira Premium Ecológica, mesmo modelo utilizada para incubação dos ovos a 30°.



Figura 6. Potes plásticos com a identificação do indivíduo, data da oviposição e a concentração de glifosato utilizada na solução que foi aplicada no substrato (vermiculita).

Embriões e Neonatos

Assim que o nascimento foi observado, o recipiente com o neonato foi retirado da incubadora e transferido para um novo recipiente plástico e levado ao Laboratório de Anatomia Comparada de Vertebrados (IB/UnB). No mesmo dia do nascimento, os animais foram eutanasiados utilizando solução de Tiopental 100mg/ml e posteriormente fixados em solução de Formol 10%.

Foi estabelecido um prazo de 75 dias para o nascimento dos lagartos, tempo médio de incubação registrado em estudos prévios (Rapp Py-Daniel et al., 2017). Os ovos que não eclodiam dentro deste prazo, assim como aqueles que evidenciavam a morte do embrião pelo aspecto do ovo (casca seca ou escura), foram retirados da incubadora. Com auxílio de uma lupa Nikon®, esses ovos foram cuidadosamente abertos para verificar a presença ou não de embrião. Em caso positivo, o embrião foi retirado, fixado em solução de Formol 10% por 24 horas e depois transferidos para um tubo Falcon® preenchidos com álcool etílico 70% e identificados. No caso dos embriões que não completaram seu desenvolvimento, determinamos seu estágio ontogenético de acordo com a tabela de estagiamento descrita para a espécie (Py-Daniel et al., 2017). Sendo assim, em nosso

experimento com o glifosato, foram submetidos, aleatoriamente, 47 ovos aos tratamentos com as três concentrações de glifosato, 16 ovos na concentração de 1 mg/L; 15 ovos na concentração de 2,5 mg/L e 16 ovos na concentração de 5mg/L. A partir desse total de ovos (Tabela 1; Figura 9).

Todos os neonatos obtidos foram fotografados com o uso da câmera Canon® Eos 40D DS126171. As fotos foram editadas com o uso do Photoshop Adobe®. Os neonatos foram radiografados com o uso de uma máquina de raio-x (Faxitron DX). Além de manter a integridade do indivíduo, a obtenção das radiografias foi de suma importância para que pudéssemos realizar as medidas lineares das estruturas ósseas por meio de software específico.

Identificação e descrição das anomalias

Para descrever as anomalias encontradas, as radiografias de cada indivíduo foram cuidadosamente analisadas e comparadas com o indivíduo saudável (Figura 7; Figura 8). E os neonatos que apresentaram anomalias, estas foram nomeadas e descritas em uma tabela. Utilizamos como referência e comparação, os dados não publicados de colaboradores (Oliveira, 2019) e o estudo de Bell (2006) que classificou as anomalias em:

Leves: quando geram pouco ou nenhum comprometimento funcional da estrutura do indivíduo.

Moderadas: quando as estruturas estão comprometidas a ponto de gerar desvantagens competitivas.

Severas: quando a anomalia torna o embrião inviável e não há o nascimento do mesmo.

Para fins de comparação, utilizamos como exemplo um neonato sem anomalias, representado pela prancha na Figura 7 e Figura 8.

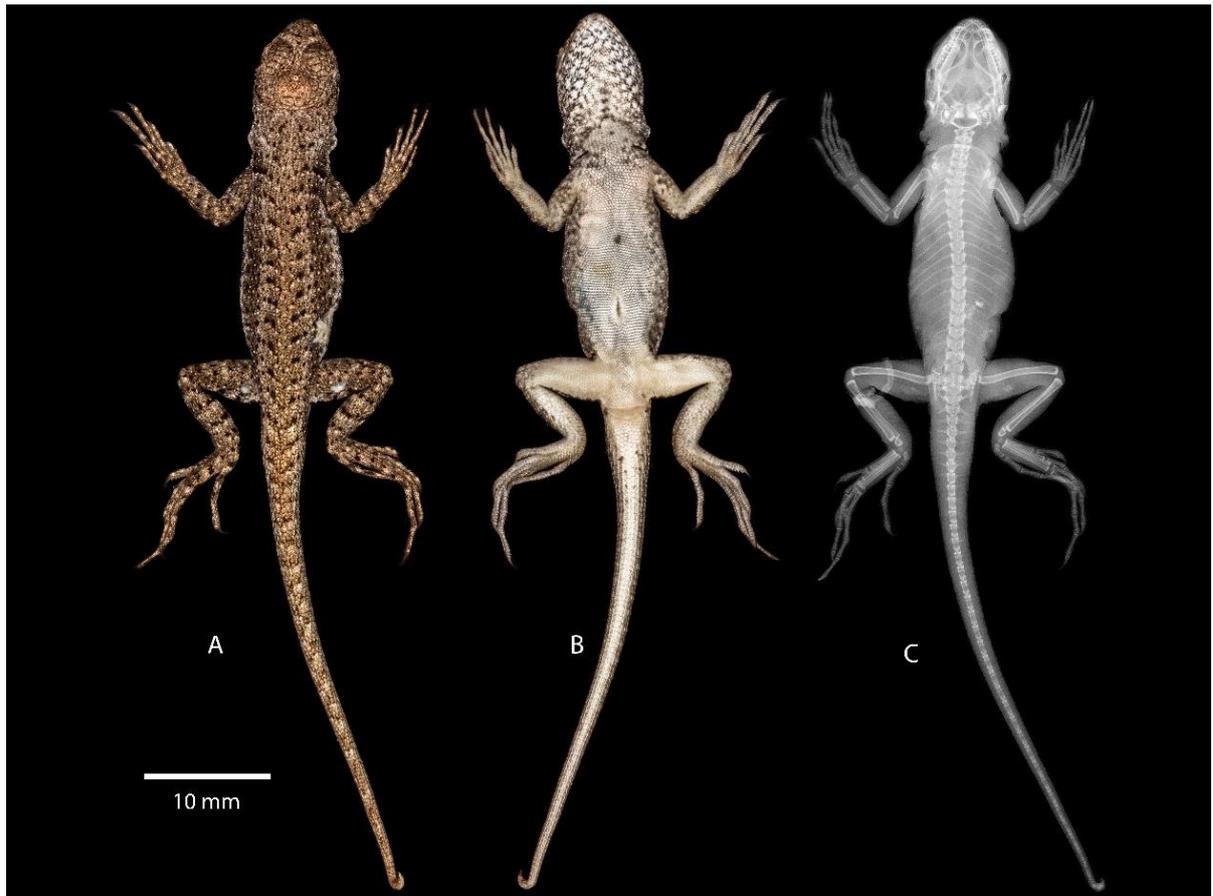


Figura 7. Vista dorsal (A), ventral (B) e radiografia do indivíduo 0032. Onde não foi observada nenhuma anomalia.

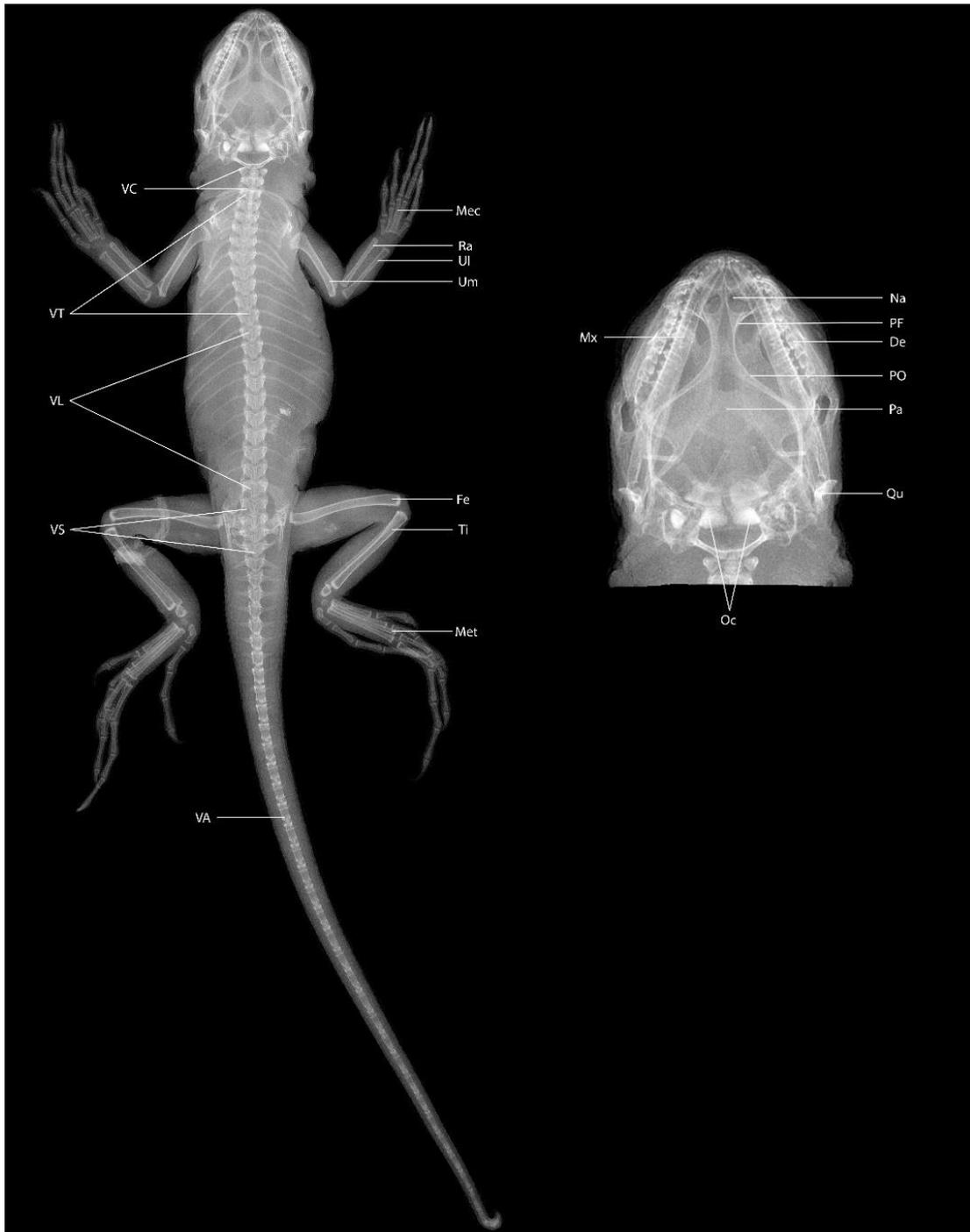


Figura 8. Ossos visualizados nas radiografias de *Tropidurus torquatus*, descritos com base em Klaczko et al, 2019. VC: Vértebras cervicais; VT: Vértebras torácicas; VL: Vértebras lombares; VS: Vértebras sacrais; VA: Vértebras caudais; Mec: Metacarpo; Ra: Rádio; Ul: Ulna; Um: Úmero; Fe: Fêmur; Ti: Tíbia; Met: Metatarso; Mx: Maxilar; Na: Nasal; PF: Pré-frontal; De: Dentário; PO: Pós-orbital; Pa: Parietal; Qu: Quadrado; Oc: Occipital. Radiografia do indivíduo 0032, onde não foi observada nenhuma anomalia.

Medidas lineares e assimetria flutuante

Para avaliar a ocorrência da assimetria flutuante, foram obtidas medidas de ambos lados dos neonatos dos seguintes traços: fêmur, tíbia, terceiro metatarso, úmero, rádio, ulna, terceiro metacarpo (Figura 3). Esses caracteres foram escolhidos por demonstrarem baixa plasticidade fenotípica, segundo Palmer e Strobeck (2013), ou seja, dificilmente algum lado será mais utilizado do que o outro, ou irá sofrer uma condição micro ambiental diferente. Além disso, são caracteres fáceis de serem medidos, minimizando erros e permitindo alta repetitividade. Os traços dos indivíduos que apresentaram malformações aparentes não foram medidos. Também foram tomadas as medidas de comprimento rostro-cloacal, comprimento da cauda e largura da cabeça.

Todas as medições foram realizadas no software ImageJ (Schneider et al., 2012), a partir das imagens de raios-x dos indivíduos fixados. O programa permite o usuário realizar as medições com a devida calibração em escala, transformando os pixels das imagens em escala métrica (mm). Uma única pessoa registou todas as medidas, que foram repetidas para cada traço mencionado acima, alternando entre lados direito e esquerdo. Houve alguns dias de pausa entre a primeira e segunda contagem e a ordem dos espécimes foram randomizadas, a fim de garantir a independência das contagens. Essa padronização visa diminuir possíveis erros de medição.

Foi calculado, para todos os caracteres, o índice de assimetria (IA), para isso, obtivemos o valor do lado direito do traço, menos o valor do lado esquerdo ($IA = D - E$, onde D se refere ao lado direito e E ao lado esquerdo). Os valores de IA foram utilizados para avaliar a distribuição dos dados, a partir do teste de normalidade Shapiro-Wilk. A dependência do tamanho do traço foi examinada por regressão linear dos valores do índice de assimetria (IA) no CRC, para testar a dependência do tamanho total do corpo, e em $(D + E) / 2$, para testar a dependência do tamanho do traço.

Para testar a presença de assimetria direcional ou flutuante, foi realizada uma análise de variância – *two-way* ANOVA, utilizando os valores das medidas transformadas em log, para cada um dos sete traços. Foi definido o lado (esquerdo/direito) como fator fixo, indivíduo como fator aleatório e a interação entre os dois como um termo adicional. Neste contexto, um efeito significativo do “lado” sozinho indica a presença de assimetria direcional (DA). E a interação significativa entre lado e indivíduo, indica a existência de

assimetria flutuante (FA). Como nossos resultados indicaram a existência de assimetria flutuante (FA) em alguns traços, nós calculamos um índice de assimetria individual para cada característica como a diferença absoluta $D - E$ entre a média transformada logarítmica dos valores dos caracteres de cada indivíduo, assim ($|\log(\text{lado direito}) - \log(\text{lado esquerdo})|$).

A ANOVA de dois fatores foi realizada no software GraphPad Prism. E todas as demais análises estatísticas foram realizadas no *software* R Studio.

Resultados

Mortalidade e viabilidade dos ovos

Na análise do grupo de ~~comparação~~ CONTROLE foram incubados 34 ovos à temperatura constante, dos quais 20,6% foram considerados inviáveis, ou seja, não foi encontrado embrião dentro do ovo que apresentou sinais de decomposição (casca escurecida e fungo) (Figura 9). Dos 27 ovos considerados viáveis, apenas 2 foram abertos antes do nascimento, pois o ovo apresentou sinais de morte do embrião. Todos os demais 25 ovos (73,53% - em relação ao total de ovos incubados) tiveram o desenvolvimento completo.

Neste experimento com glifosato, dos 47 ovos analisados 51% foram considerados inviáveis, sendo estes os que apresentaram aspecto de casca escurecida e/ou presença de fungo. Neste caso, os ovos foram descartados, pois não foi possível encontrar e/ou observar algum aspecto da anatomia do embrião. Isso pode ter ocorrido por ações do composto químico no substrato, que será discutido posteriormente.

Dos ovos tratados com glifosato 49% foram considerados viáveis, uma vez que eclodiram ou encontramos a presença do embrião mesmo em um estágio de desenvolvimento muito inicial, neste último caso, o ovo apresentou as características de casca escura e/ou presença de fungos. Dentre os ovos considerados viáveis, 13 deles concluíram todos os estágios de desenvolvimento, gerando os neonatos (27,66% - em relação ao total de ovos incubados). A partir destes indivíduos foram obtidas as medidas lineares para a análise de assimetria flutuante e posteriormente descrição das anomalias.

Tabela 1. Número de ovos viáveis e inviáveis e a quantidade de embriões e neonatos em cada tratamento (controle – 30°C; glifosato concentração 1 mg/L; glifosato concentração)2,5 mg/L; glifosato concentração 5 mg/L).

GRUPO	OVOS VIÁVEIS	INVIÁVEIS	EMBRIÕES	NEONATOS
CONTROLE	34	27	7	25
GLIFOSATO 1 mg/L	16	6	10	2
GLIFOSATO 2,5 mg/L	15	6	9	3
GLIFOSATO 5 mg/L	16	11	5	6

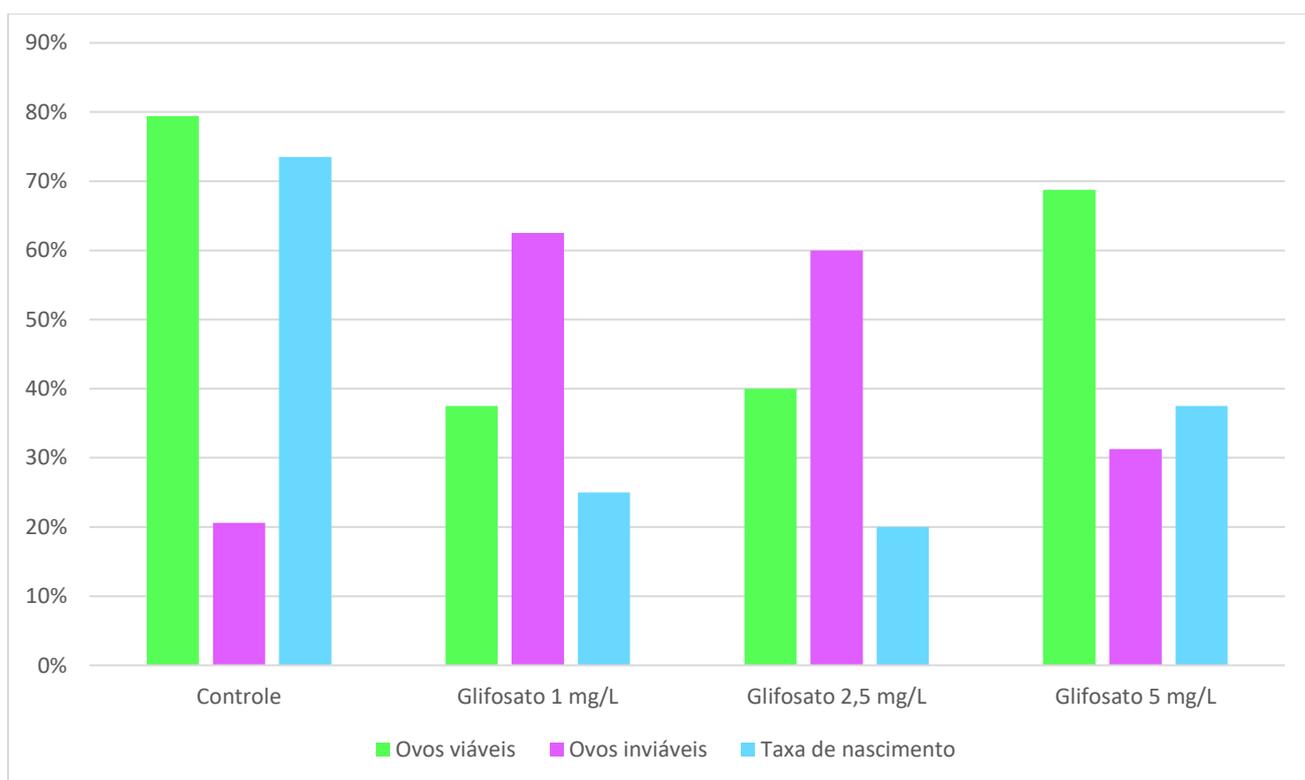


Figura 9. Porcentagens de ovos viáveis, inviáveis, taxa de nascimentos em cada tratamento (controle – 30°C; glifosato concentração 1 mg/L; glifosato concentração)2,5 mg/L; glifosato concentração 5 mg/L).

Taxas de anomalias

Considerando todos os neonatos nascidos neste estudo, nós obtivemos 77% deles com anomalias GENÉRICO variando entre leve e grave (Figura 10 e 11). No grupo controle, dos 25 neonatos, 10 indivíduos (40%) apresentaram anomalias, sendo que 9 foram consideradas anomalias leves e apenas 1 anomalia moderada. No tratamento de menor concentração de glifosato (1 mg/L), foi observado que dos 4 neonatos, um não teve anomalia, um apresentou apenas anomalias leves e outros dois indivíduos apresentaram anomalias moderadas. No segundo tratamento, com 2,5 mg/L de composto, todos os 3 neonatos apresentaram anomalias, 2 delas sendo moderadas, e outra grave. No tratamento de maior concentração de glifosato (5 mg/L), dos 6 neonatos, nós observamos 2 indivíduos sem anomalias; um com anomalia leve e outros 2 com anomalias moderadas. O tipo e a descrição das anomalias encontradas nos indivíduos submetidos ao tratamento contendo concentrações de glifosato foram sumarizados na Tabela 2. As anomalias também podem ser observadas através das pranchas com as fotos da vista dorsal, ventral e radiografias (Figura 12 a Figura 24).

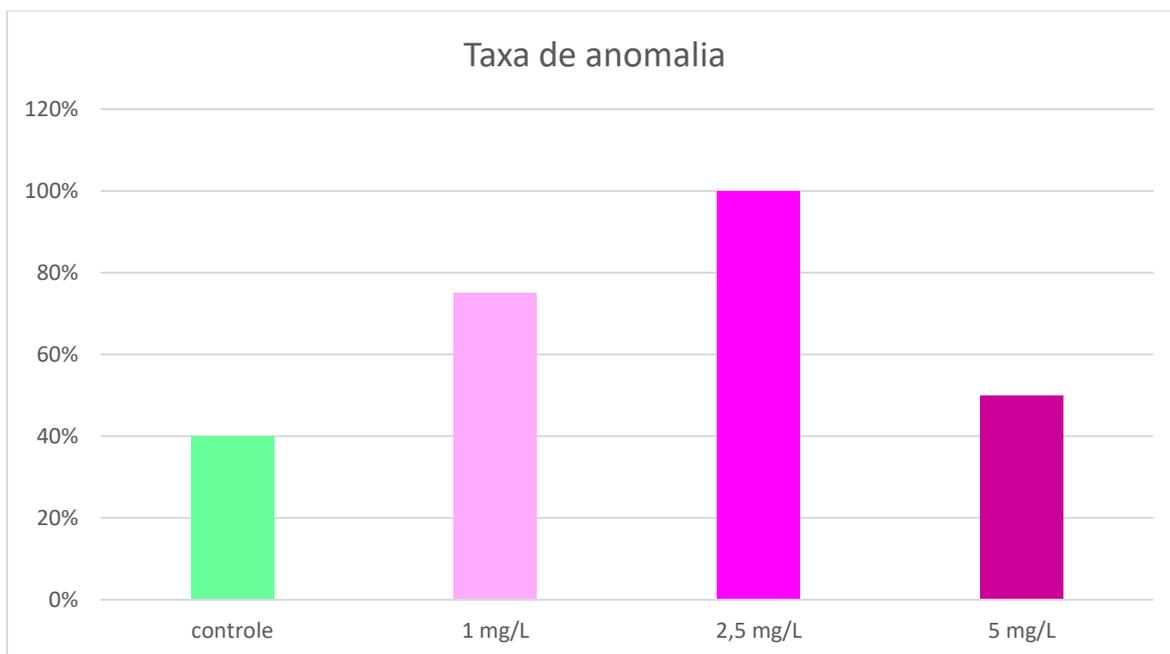


Figura 10. Taxa de anomalias encontradas nos neonatos em todos os tratamentos: controle; glifosato 1mg/L; glifosato 2,5mg/L; glifosato 5mg/L.

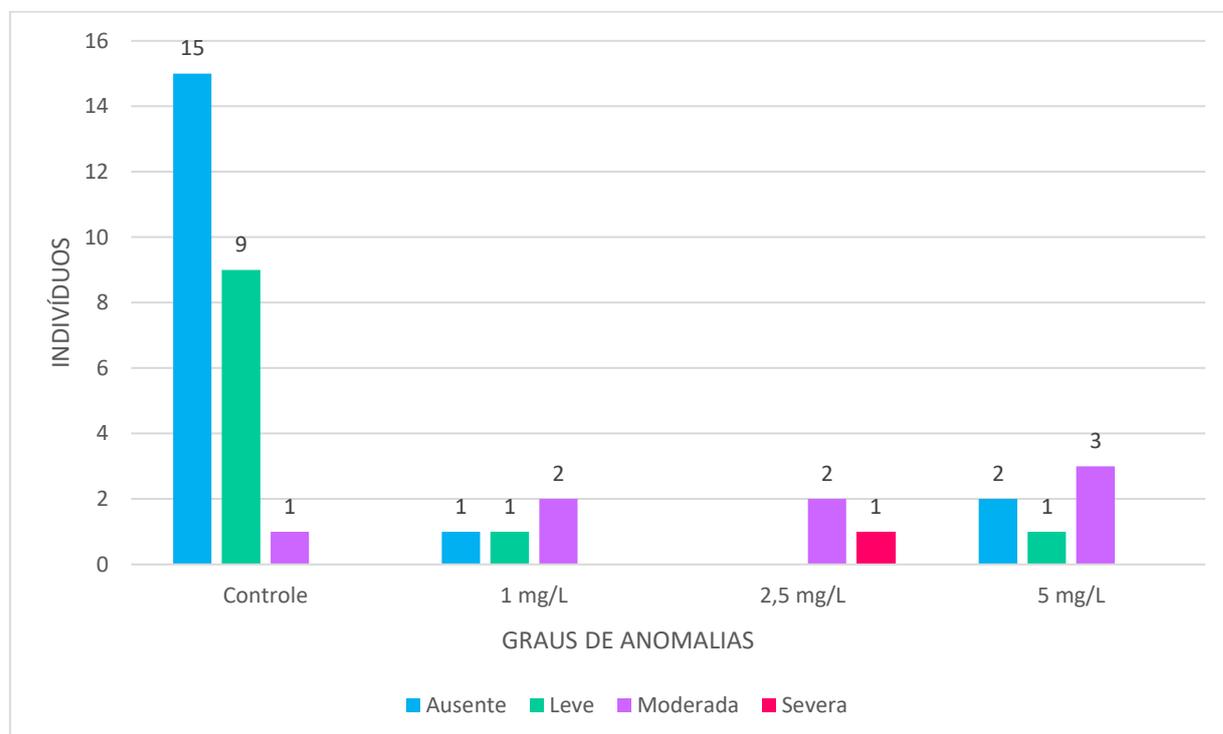


Figura 11. Número total de indivíduos sem anomalias, com anomalias leves, moderadas e graves em casa um dos tratamentos: (Controle: 30 °C constantes; Glifosato: concentrações de 1 mg/L, 2.5 mg/L e 5 mg/L).

No experimento com a concentração mais baixa de glifosato (1 mg/L) a taxa de inviabilidade dos ovos e dos embriões, utilizando dados de mortalidade e anomalias, foi maior do que comparado as demais concentrações estudadas (Figura 1). Além disso, ao contrário do que se imaginava, os neonatos submetidos ao tratamento com maior concentração de glifosato (5 mg/L) foram os que apresentaram a menor taxa de anomalia (Figura 2). Uma única anomalia grave também não foi associada à maior concentração de composto usada, sendo observada na concentração média de glifosato (Figura 3). Nossos experimentos sugerem que o efeito do glifosato no sucesso de nascimento e nas taxas de anomalias é independente da dose aplicada, e com isso, em nossas análises de medidas e assimetria flutuante, nós excluimos o fator dosagem e consideramos apenas um grupo tratamento: glifosato.

Tabela 2. Neonatos e descrição das anomalias. Analisados a partir das fotografias de raio-x.

<i>IDENTIFICAÇÃO</i>	<i>ANOMALIAS</i>
<i>TT007</i> <i>2,5 mg/L</i>	Ausência da ulna esquerda. Ausência de 4 dos 5 metacarpos e falanges do lado esquerdo. (Figura 12)
<i>TT008</i> <i>1 mg/L</i>	Occipital irregular, ossificação incompleta do crânio. (Figura 13)
<i>TT009</i> <i>5 mg/L</i>	Ausência da ulna esquerda e direita. Ausência de 4 dos 5 metacarpos e falanges de ambos os lados. Cauda deformada, apresentando algumas vértebras fusionadas. (Figura 14)
<i>TT011</i> <i>2,5 mg/L</i>	Ausência da ulna direita e todos os ossos metacarpos e falanges direitos. Cauda deformada, apresentando algumas vértebras fusionadas. Nasal e parietal irregular (deslocados para a

<i>TT018</i> <i>5 mg/L</i>	<p>esquerda). Ossos do quadrado malformados. Ílio direito deslocado. (Figura 15)</p>
<i>TT025</i> <i>5 mg/L</i>	<p>Torção no primeiro metacarpo esquerdo, causando deformação nos demais e nas falanges. Occipitais reduzidos. Cauda deformada, apresentando algumas vértebras fusionadas e crescimento alterado pela ossificação irregular. (Figura 16)</p> <p>Vértebras da cauda irregulares, apresentando algumas vértebras fusionadas, calcificação irregular e diferentes em tamanho. Vértebras da coluna deslocadas para o lado direito. Torção lateral de todos os ossos do crânio (Parietal, nasal, maxilar, pré-frontal, quadrados, esquamosal, pós-orbital, occipital). Ílio direito deslocado. Escápulas e costelas malformadas. (Figura 17)</p>
<i>TT031</i> <i>2,5 mg/L</i>	<p>Redução dos ossos rádio e ulna direitos. Cauda deformada. Torção lateral dos ossos do crânio (Parietal, nasal, maxilar). Todos as vértebras com o processo espinhoso apresentam seu eixo rotacionado para o lado direito. Malformação da cintura pélvica. Ílio malformado. Escápulas e costelas malformadas. (Figura 19)</p>
<i>TT0036</i> <i>5 mg/L</i>	<p>Occipital ausente (Figura 21)</p>

TT037
1 mg/L

Ossificação incompleta do crânio, de forma que occipital e parietal não são visíveis. Redução do úmero direito. Ausência do rádio, ulna e todos os metacarpos e falanges do lado direito.

Escápula direita malformada.

(Figura 22)

TT039
1 mg/L

Ossificação incompleta do crânio, de forma que occipital e parietal não são visíveis. Irregularidades nos ossos nasal, pré-frontal, pós-orbital, esquamosal e maxilar. Ausência da ulna direita e redução dos metacarpos e falanges direitos. Escápula

direita malformada.

(Figura 23)

Pranchas neonatos

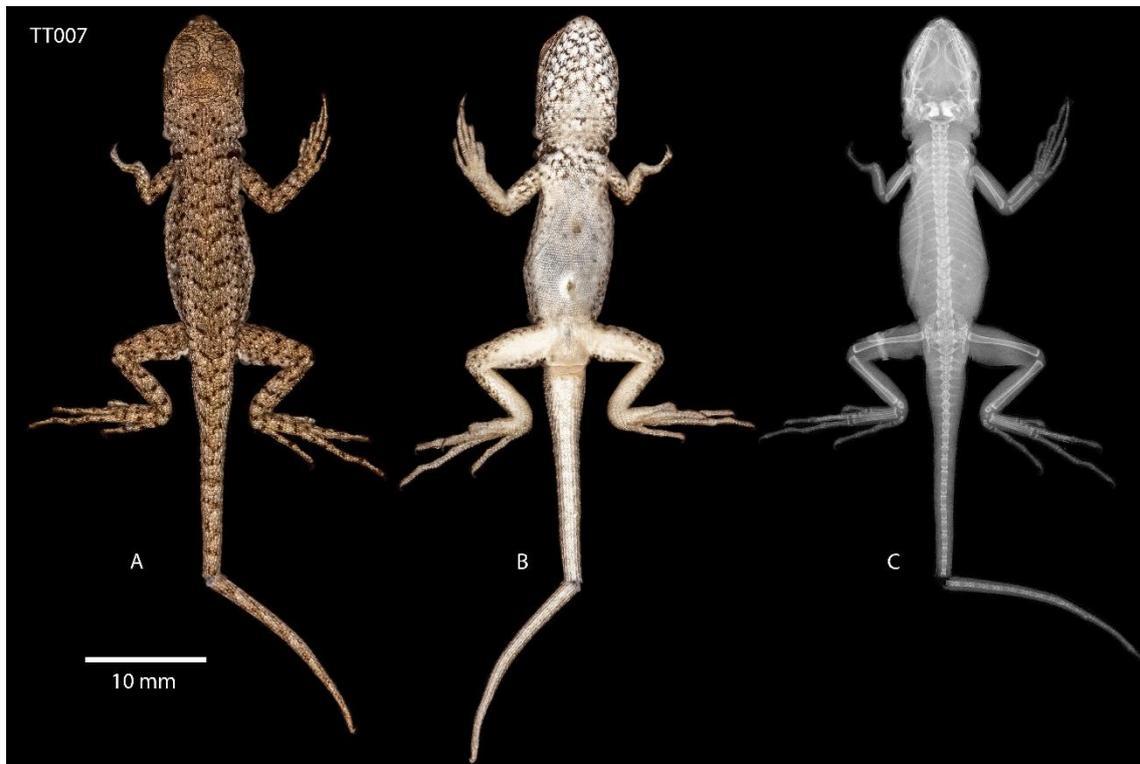


Figura 12. Neonato de *Tropidurus torquatus*. TT007 (tratamento glifosato 2,5 mg/L). Vista dorsal (A); ventral (B) e raio-x (C). Fonte: autor.

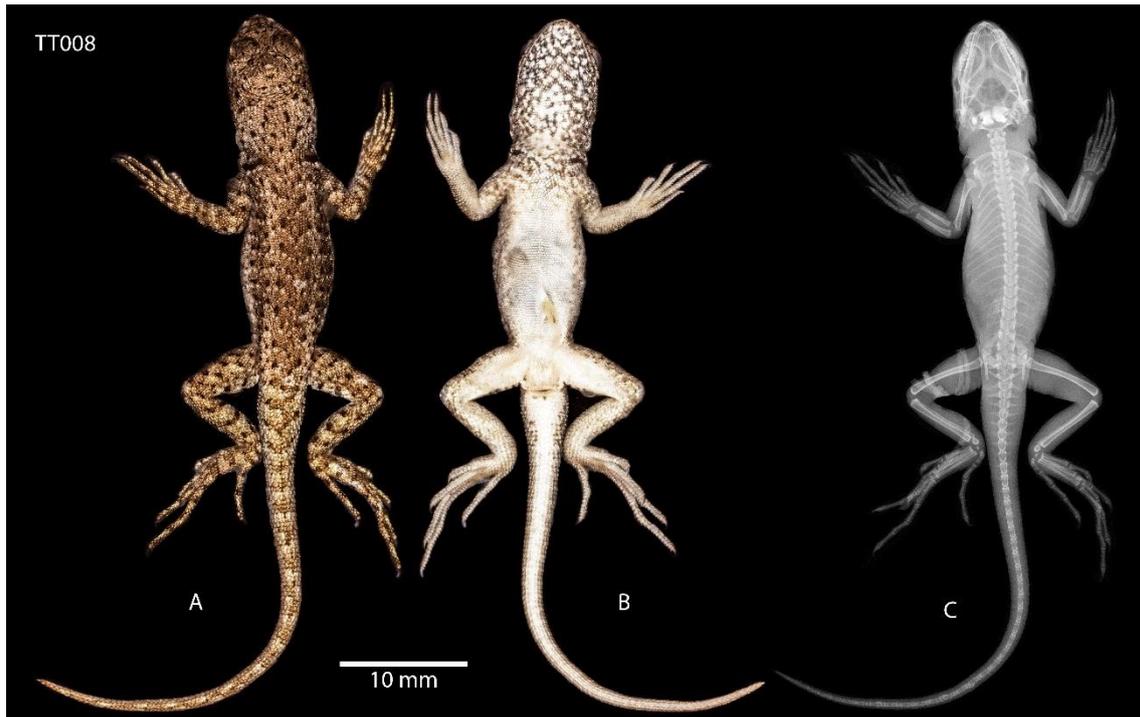


Figura 13. Neonato de *Tropidurus torquatus*. TT008 (tratamento glifosato 2,5 mg/L). Vista dorsal (A); ventral (B) e raio-x (C). Fonte: autor.

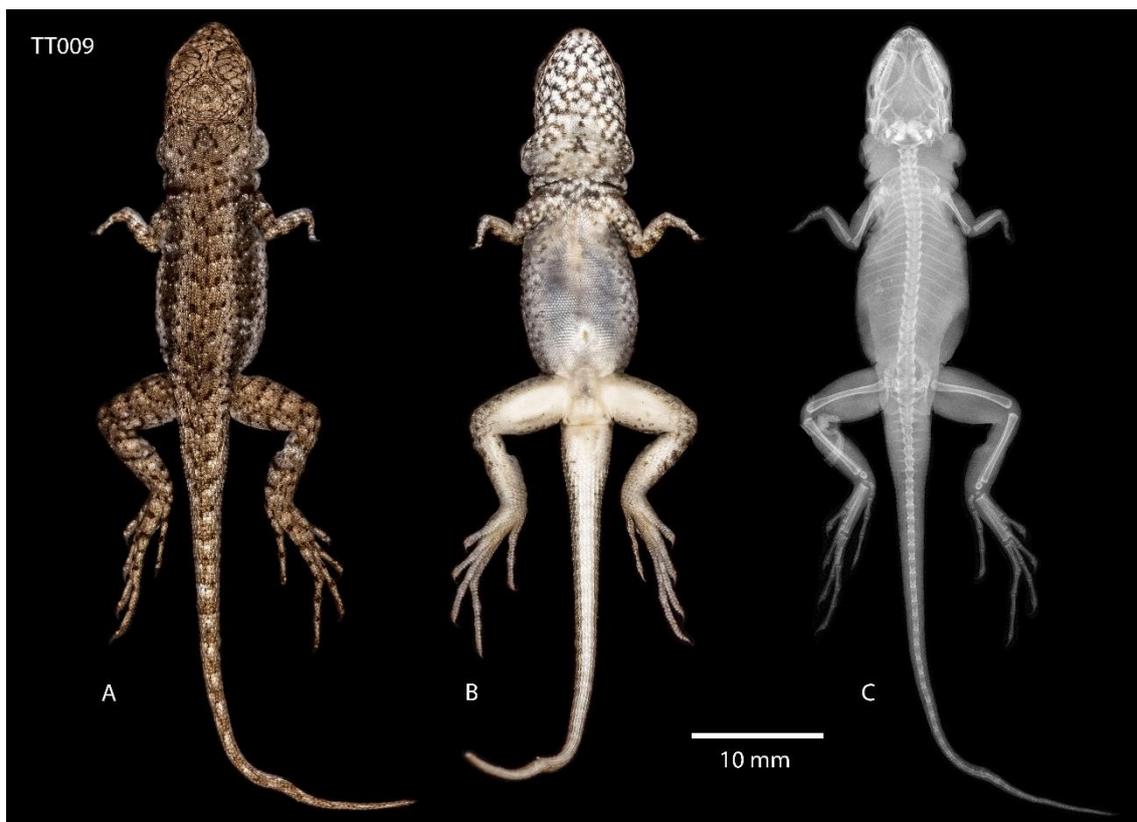


Figura 14. Neonato de *Tropidurus torquatus*. TT009 (tratamento glifosato 5 mg/L). Vista dorsal (A); ventral (B) e raio-x (C). Fonte: autor.

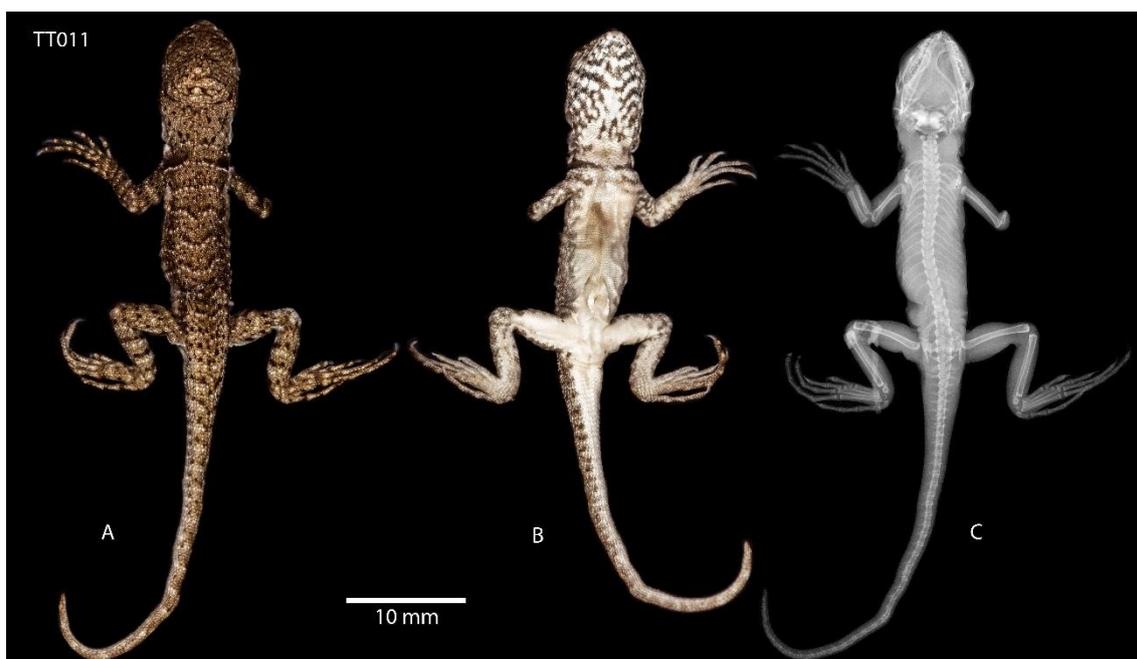


Figura 15. Neonato de *Tropidurus torquatus*. TT011 (tratamento glifosato 2,5 mg/L). Vista dorsal (A); ventral (B) e raio-x (C). Fonte: autor.

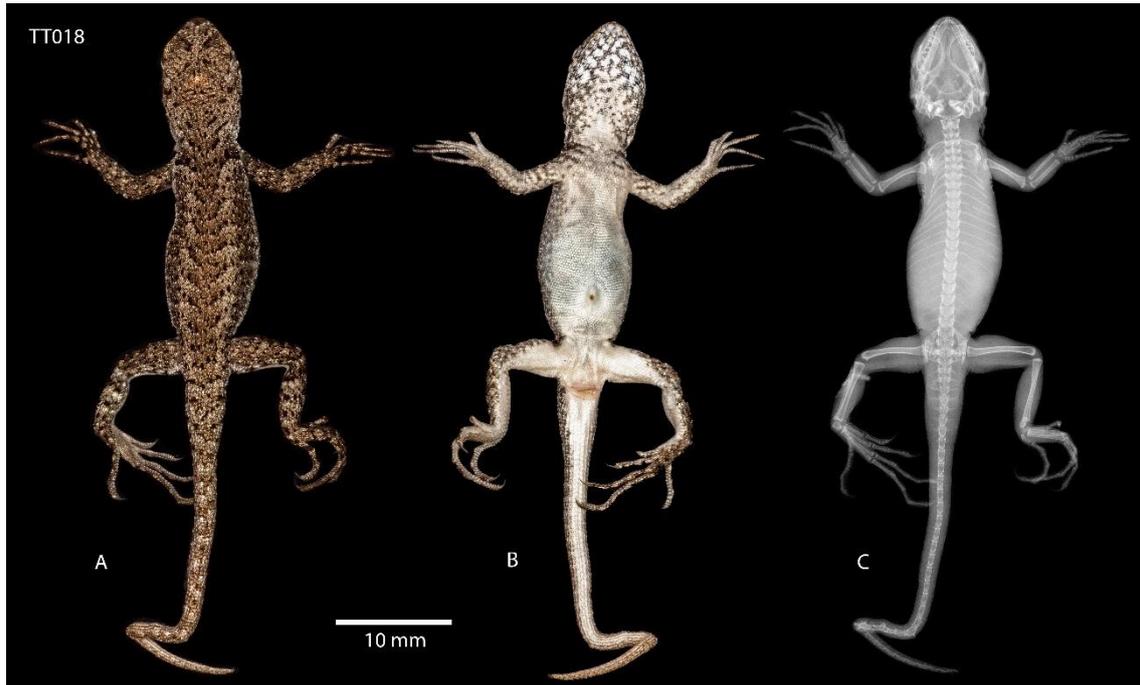


Figura 16. Neonato de *Tropidurus torquatus*. TT018 (tratamento glifosato 5 mg/L). Vista dorsal (A); ventral (B) e raio-x (C). Fonte: autor.



Figura 17. Neonato de *Tropidurus torquatus*. TT025 (tratamento glifosato 5 mg/L). Vista dorsal (A); ventral (B) e raio-x (C). Fonte: autor.

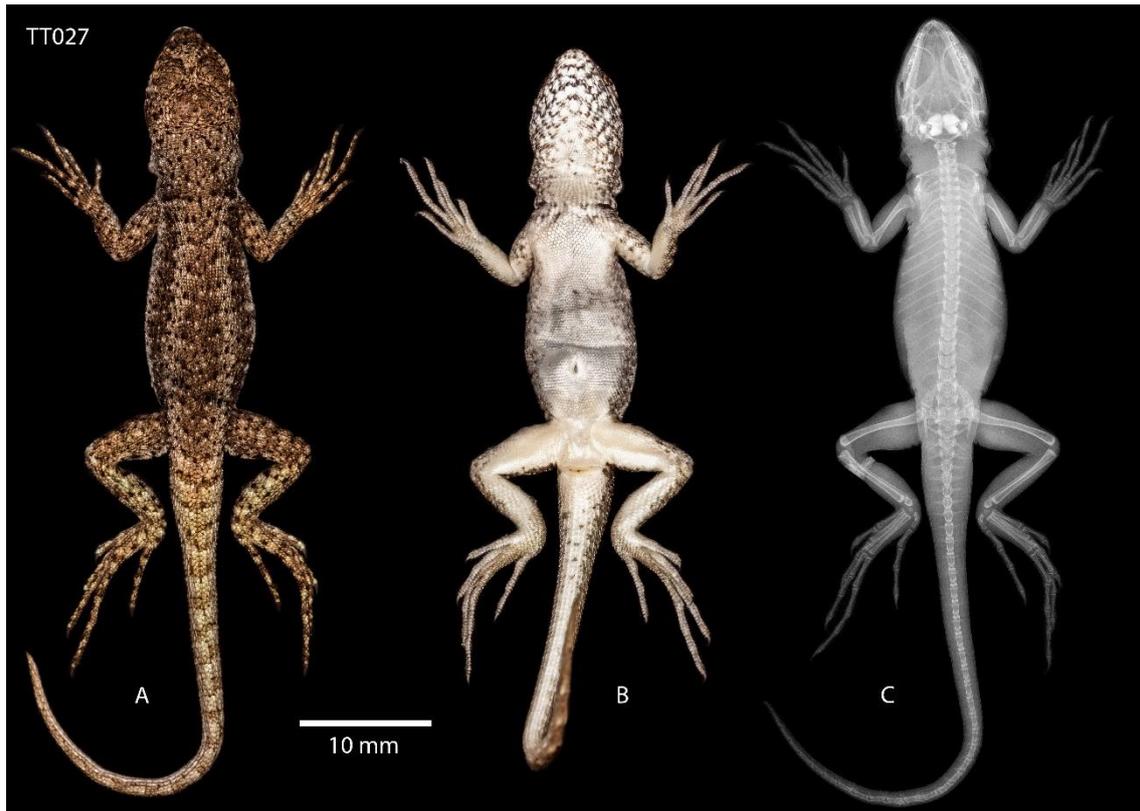


Figura 18. Neonato de *Tropidurus torquatus*. TT027. Não apresentou anomalias visíveis. Vista dorsal (A); ventral (B) e raio-x (C). Fonte: autor.

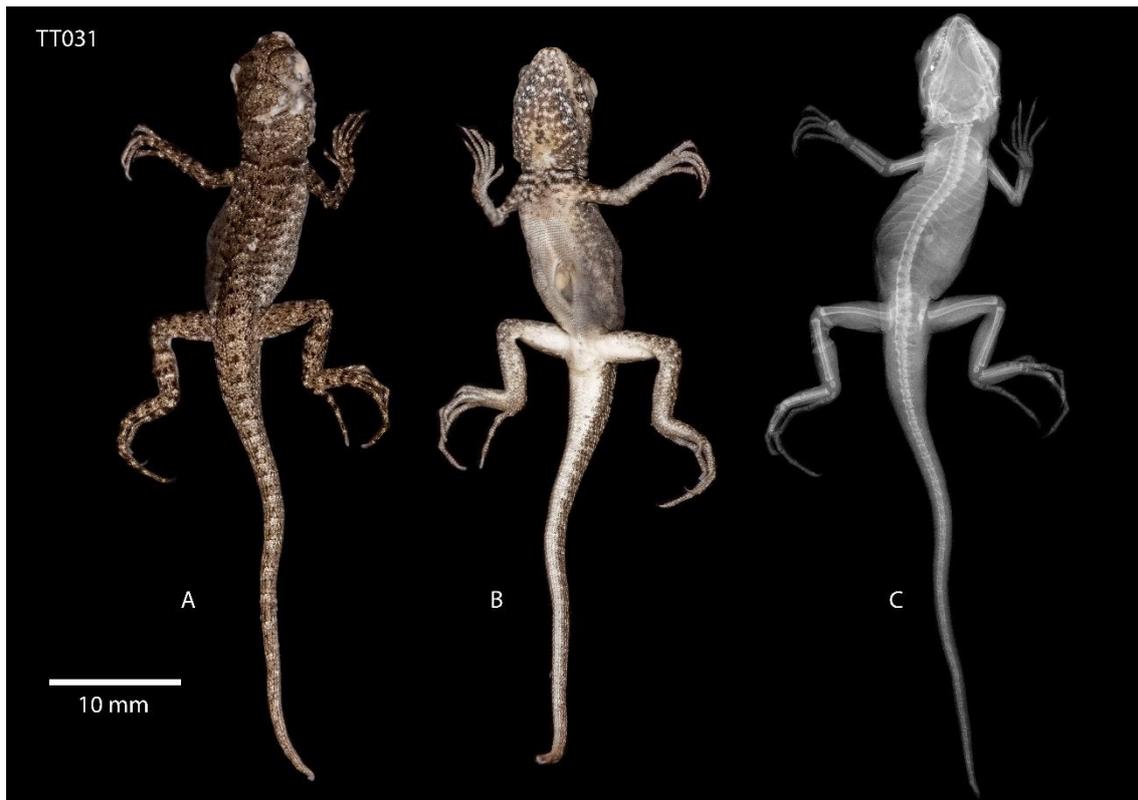


Figura 19. Neonato de *Tropidurus torquatus*. TT031 (tratamento glifosato 2,5 mg/L). Vista dorsal (A); ventral (B) e raio-x (C). Fonte: autor.

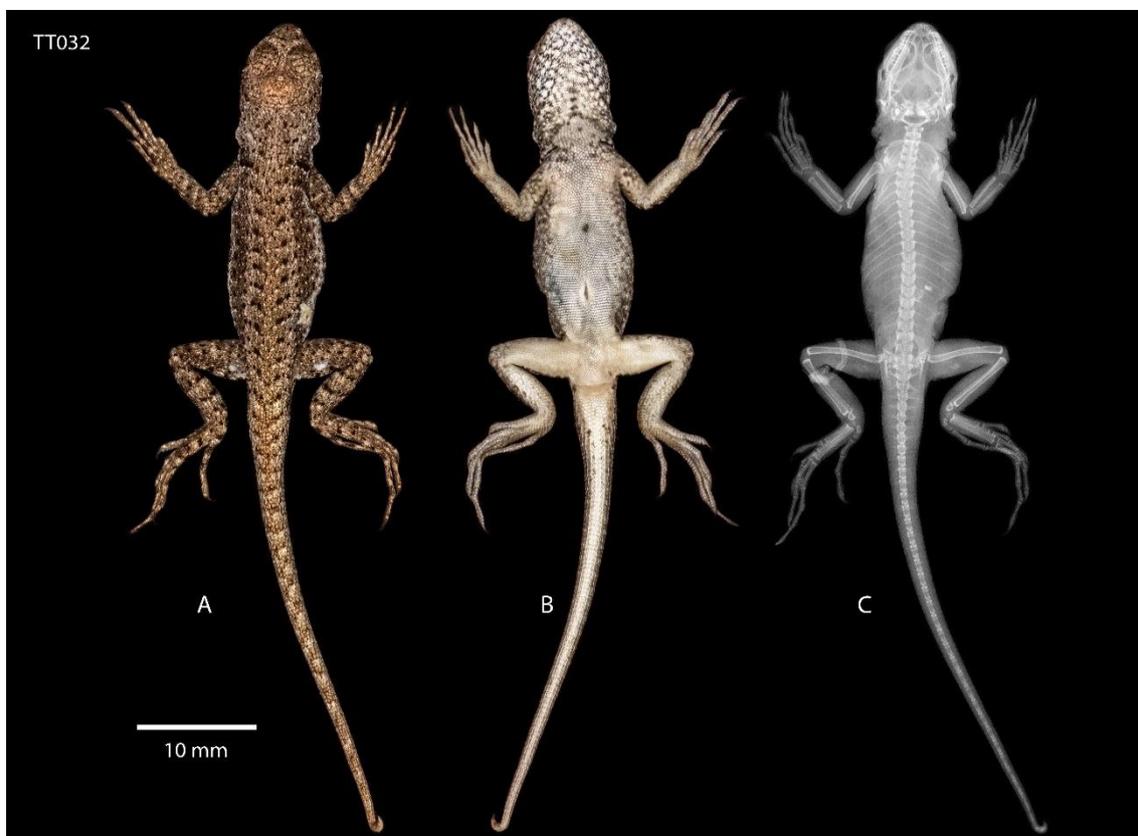


Figura 20. Neonato de *Tropidurus torquatus*. Tt032. Não apresentou anomalias visíveis. Vista dorsal (A); ventral (B) e raio-x (C). Fonte: autor.

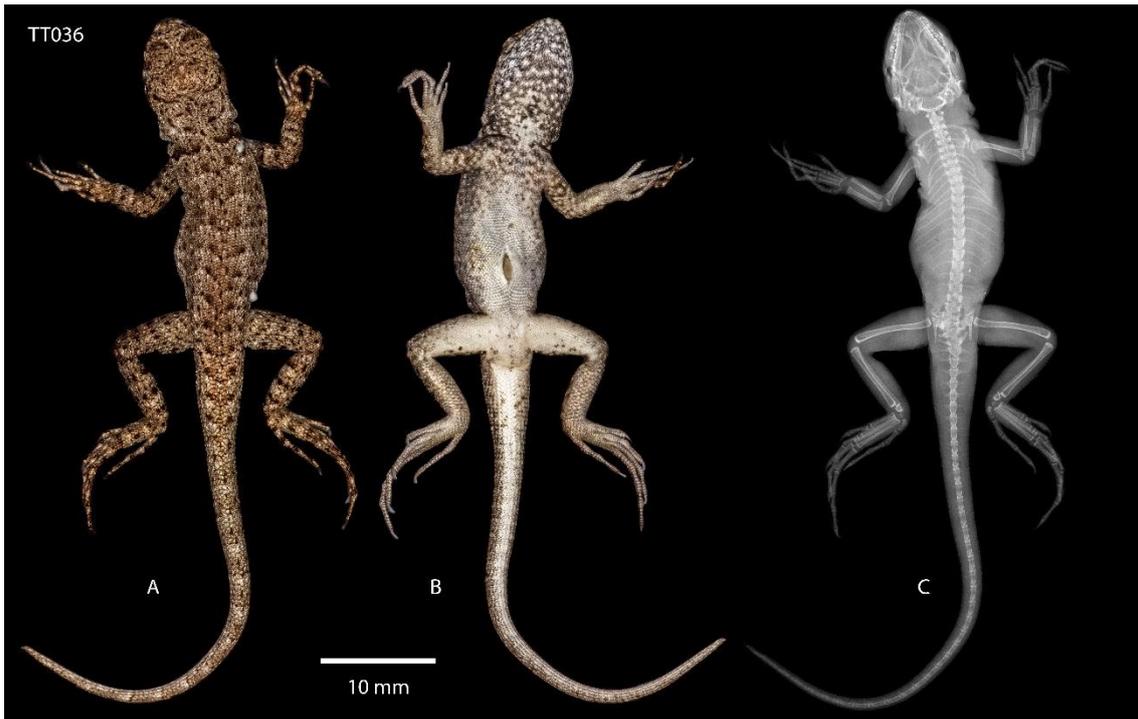


Figura 21. Neonato de *Tropidurus torquatus*. TT036 (tratamento glifosato 5 mg/L). Vista dorsal (A); ventral (B) e raio-x (C). Fonte: autor.

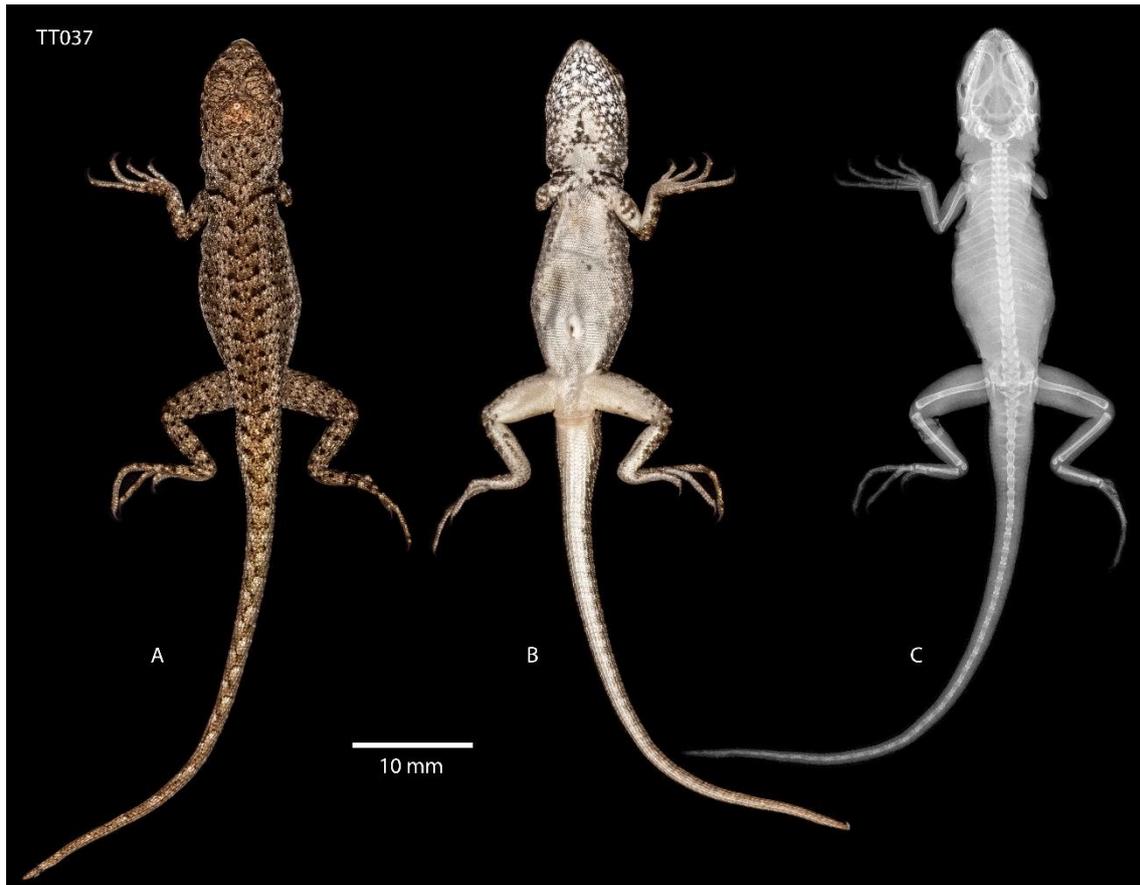


Figura 22. Neonato de *Tropidurus torquatus*. TT037. (tratamento glifosato 1 mg/L). Vista dorsal (A); ventral (B) e raio-x (C). Fonte: autor.

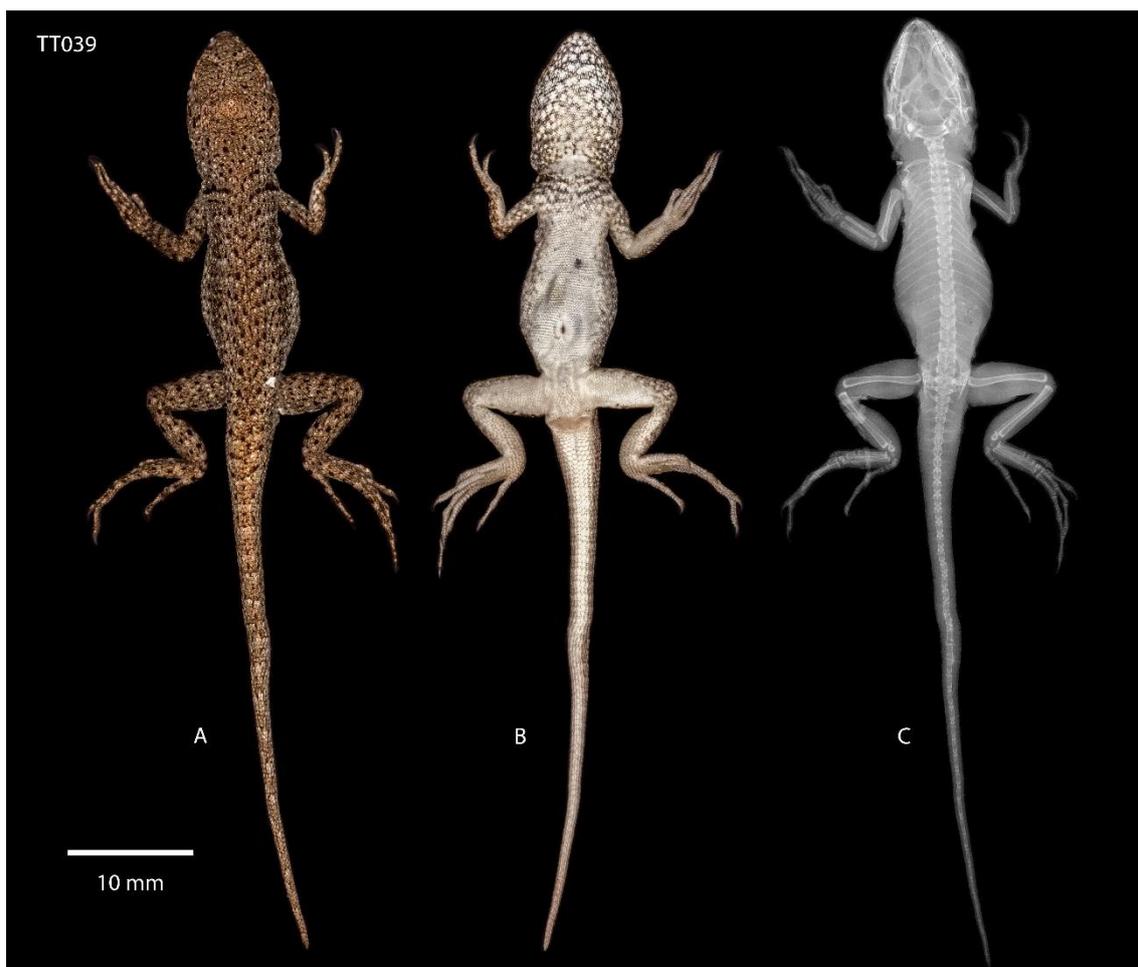


Figura 23. Neonato de *Tropidurus torquatus*. TT039 (tratamento glifosato 1 mg/L) Vista dorsal (A); ventral (B) e raio-x (C). Fonte: autor.

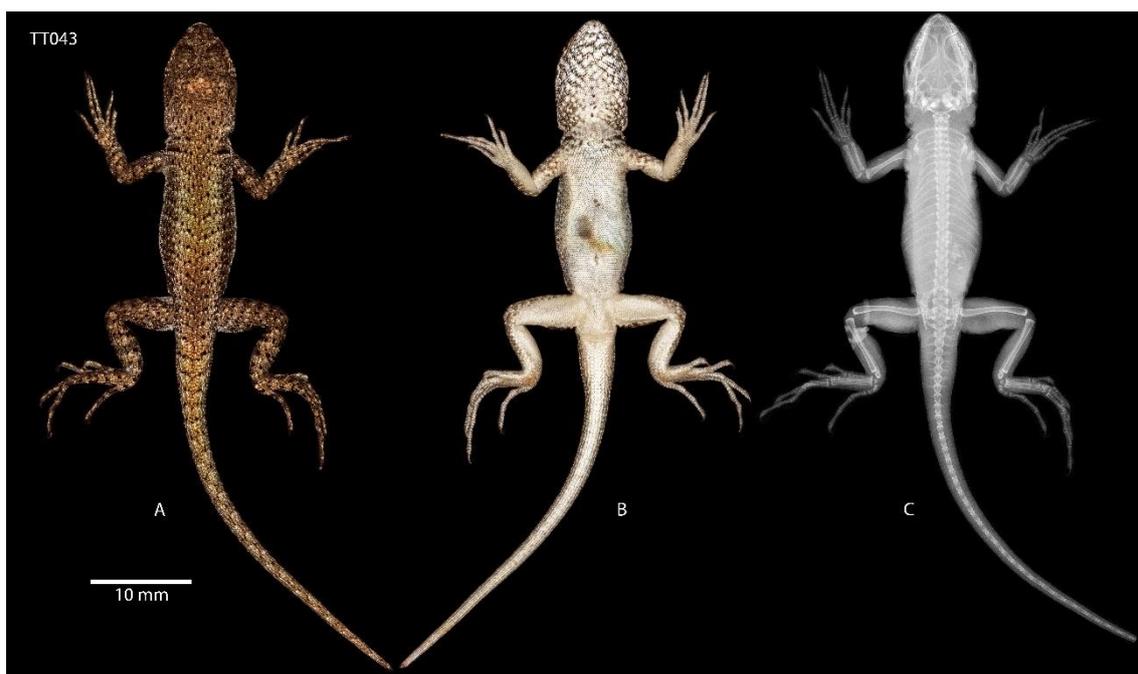


Figura 24. Neonato de *Tropidurus torquatus*. TT043. Não apresentou anomalias visíveis. Vista dorsal (A); ventral (B) e raio-x (C). Fonte: autor.

Assimetria flutuante

Ao avaliar a distribuição dos dados do índice de assimetria (IA) para o grupo glifosato (Figura 25), os traços fêmur (Fig. 25A) e tibia (Fig. 25B), não apresentaram normalidade, nestes casos observa-se o lado esquerdo recorrentemente maior que o lado direito. Já no grupo controle (Figura 26) tibia (Fig 26 B) e úmero (Fig 26 F) também não apresentaram distribuição normal, observando o mesmo padrão do lado esquerdo sendo maior. Os valores de p do teste de normalidade Shapiro-Wilk podem ser visualizados na Tabela 2. A regressão linear (Tabela 3), entre assimetria e o CRC e assimetria e tamanho total do caráter, revelou que os traços metatarso, radio e metacarpo possuem dependência do tamanho.

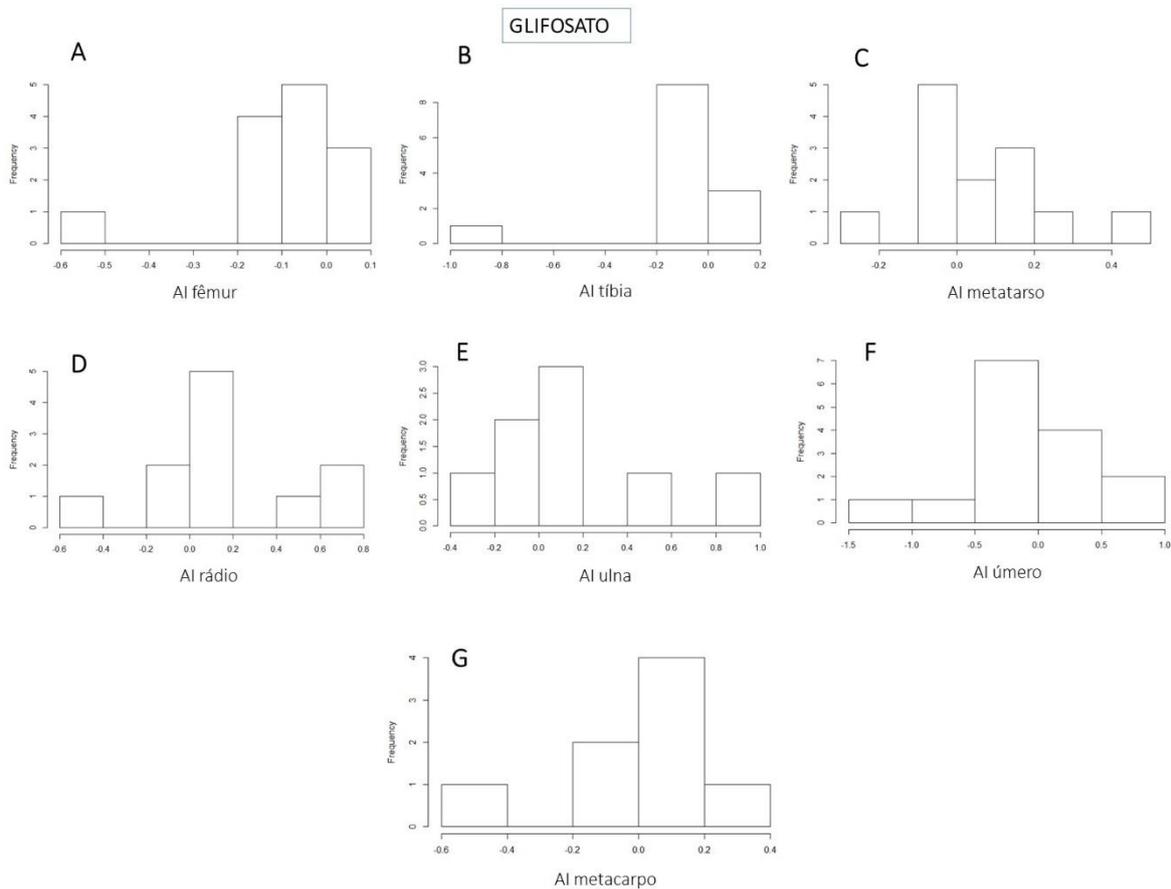


Figura 25. Histogramas de distribuição dos dados de índice de assimetria (IA) para cada traço do grupo glifosato. A: fêmur; B: tibia; C: metatarso; D: rádio; E: ulna; F: úmero; G: metacarpo.

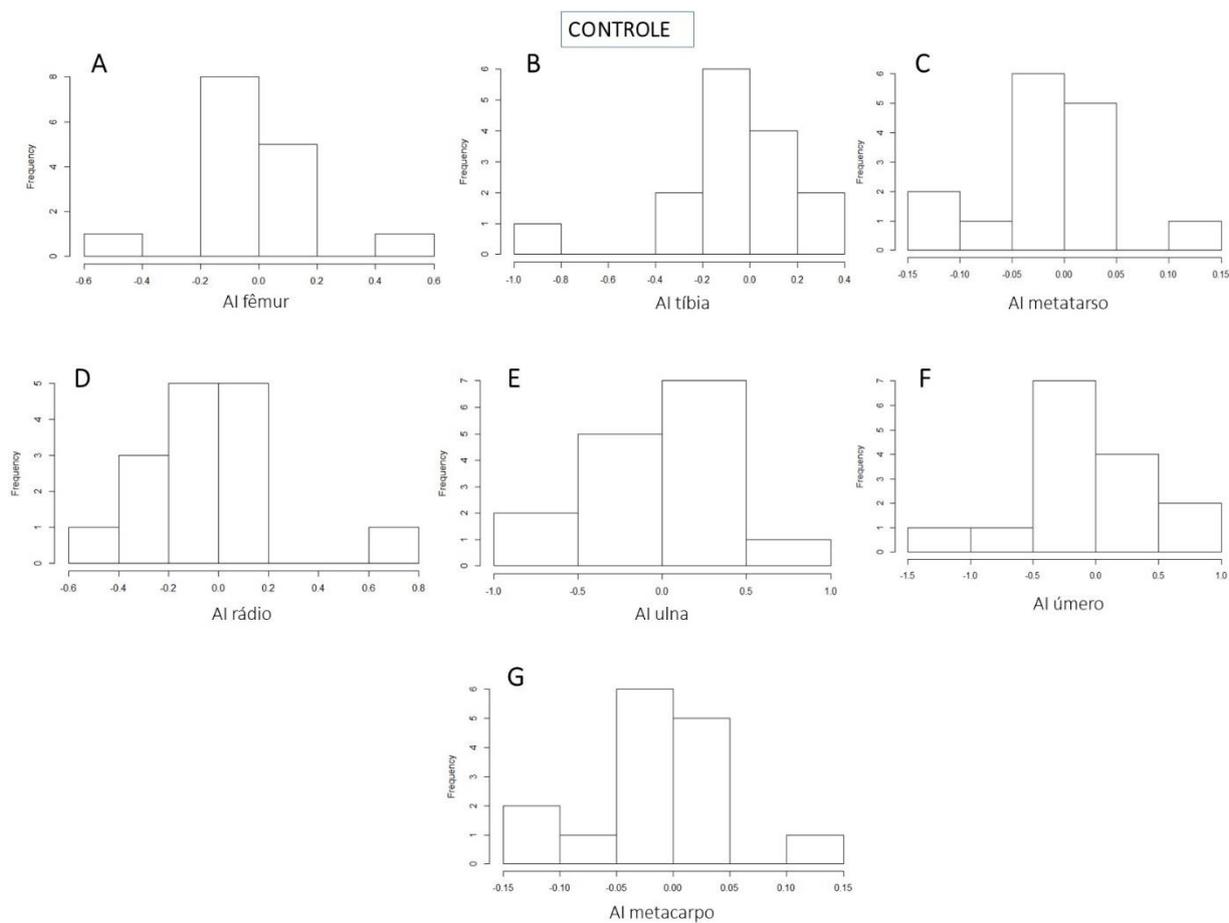


Figura 26. Histogramas de distribuição dos dados de índice de assimetria (IA) para cada traço do grupo controle. A: fêmur; B: tíbia; C: metatarso; D: rádio; E: ulna; F: úmero; G: metacarpo.

Tabela 2. Teste de normalidade Shapiro-Wilk para a diferença entre lado Direito e Esquerdo em todos os traços medidos: fêmur, tíbia, metatarso, úmero, rádio, ulna e metacarpo, em ambos os tratamentos, glifosato e controle. Valores em negrito mostram traços **não** normais.

TRAÇO	<i>p</i> value glifosato	<i>p</i> value controle
<i>Fêmur</i>	<0.001	0.29
<i>Tíbia</i>	< 0.001	0.006
<i>Metatarso</i>	0.67	0.4
<i>Úmero</i>	0.54	0.03
<i>Radio</i>	0.48	0.62
<i>Ulna</i>	0.19	0.49
<i>Metacarpo</i>	0.08	0.51

Tabela 3. Resultados estatísticos obtidos da regressão linear de $|R - L|$ no CRC e em $(R + L) / 2$ para todas as características.

<i>Traço</i>	<i>CRC</i>	<i> E+D /2</i>
<i>Fêmur</i>	0.108	0.6784
<i>Tíbia</i>	0.8427	0.2243
<i>Metatarso</i>	<0.05	<0.05
<i>Umero</i>	0.3428	<0.05
<i>Radio</i>	<0.05	<0.05
<i>Ulna</i>	0.057	<0.05
<i>Metacarpo</i>	<0.05	0.1805

A ANOVA de dois fatores, utilizada para explorar os efeitos do lado e indivíduo, mostraram a presença de assimetria direcional (DA) nos seguintes caracteres medidos do grupo glifosato: fêmur, tíbia, metatarso, rádio e ulna. No grupo controle, não houve nenhum caráter com a presença de DA. (Tabela 3)

A assimetria flutuante (FA) foi detectada nos dois tratamentos, no grupo controle, os caracteres fêmur, tíbia, rádio e ulna apresentaram valores significativos na interação “lado + indivíduo”. Já no grupo glifosato, os valores dessa interação foram significativos para fêmur, úmero, rádio, ulna e metacarpo (Tabela 4).

Tabela 4. Resultados obtidos a partir da análise two-way ANOVAs de modelo misto (lado = fator fixo, individual = fator aleatório) em valores transformados em log, para todas as populações e traços separadamente. Efeito significativo ($P < 0.0001$) de lado indica a presença de assimetria direcional (DA); e uma interação significativa entre lado e indivíduo, aponta a existência de assimetria flutuante (FA).

<i>População</i>	<i>Traço</i>	<i>Efeito individual</i>			<i>Efeito do lado</i>			<i>Interação</i>		
		df	F	P	df	F	P	df	F	P
<i>Controle</i>	Fêmur	14	41.16	<0.0001	1	0.1938	0.6629	14	5.962	<0.0001
	Tíbia	14	41.69	<0.0001	1	6.772	0.0142	14	15.47	<0.0001
	Metatarso	14	11.37	<0.0001	1	7.774	0.0091	14	1.665	0.1180
	Úmero	14	1.916	0.3622	1	0.5238	0.4748	14	1.146	0.3622
	Rádio	14	21.48	<0.0001	1	3.436	0.0737	14	5.212	<0.0001
	Ulna	14	108.1	<0.0001	1	14.15	0.0007	14	35.65	<0.0001
	Metacarpo	14	36.2	<0.0001	1	0.7394	0.3967	14	3.854	0.0009
<i>Glifosato</i>	Fêmur	12	185.1	<0.0001	1	28.73	<0.0001	12	7.956	<0.0001
	Tíbia	12	6.578	<0.0001	1	1.689	<0.0001	12	0.9256	0.5369
	Metatarso	12	44	<0.0001	1	6.254	0,2051	12	3.674	0.0027
	Úmero	12	147	<0.0001	1	5.143	0.0326	11	79.26	<0.0001
	Rádio	10	61.5	<0.0001	1	76.03	<0.0001	10	32.63	<0.0001
	Ulna	7	719.6	<0.0001	1	404.7	<0.0001	7	249	<0.0001
	Metacarpo	7	300.5	<0.0001	1	3.681	<0.0001	7	57.45	<0.0001

Com base no cálculo de assimetria flutuante (FA), obtivemos o gráfico (Figura 27) comparando o grau médio de assimetria flutuante dos tratamentos. Se observados os tratamentos, o grau de assimetria flutuante não varia muito, entretanto a variação de AF dentro de cada traço é grande. Também comparamos a variação do índice de assimetria flutuante (IA) calculado para todos os traços examinados, e observamos uma maior variação no rádio, ulna e úmero (Figura 28).

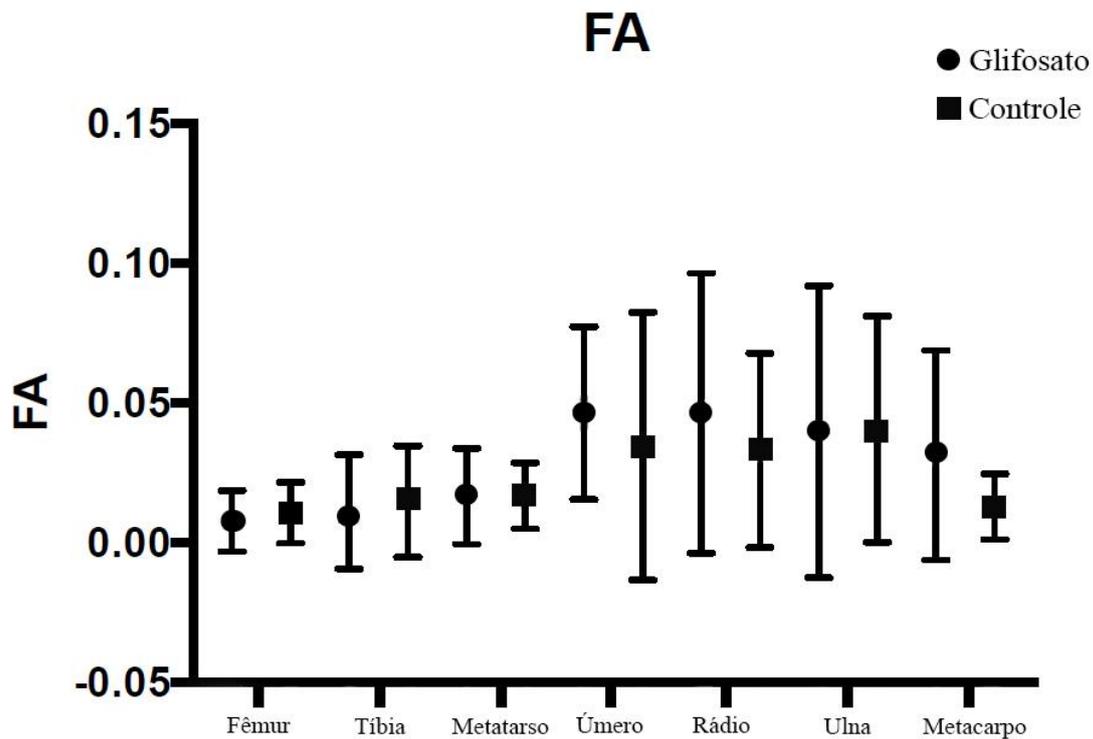


Figura 27. Grau médio de assimetria flutuante dos traços para os grupos glifosato (círculo) e controle (quadrado).

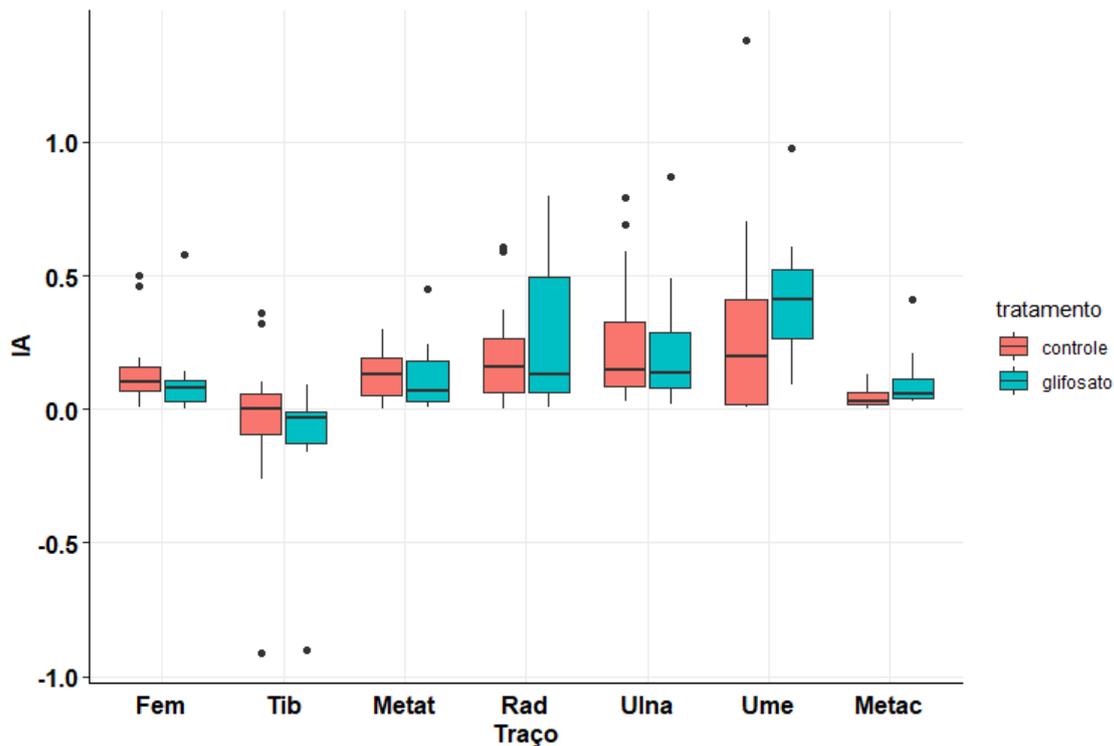


Figura 28. Boxplot de variação do índice de assimetria flutuante (IA) calculado para cada traço, comparando tratamentos controle e glifosato.

Discussão

A expansão das fronteiras agrícolas na região central do Brasil teve como consequência o aumento do desmatamento, responsável pela modificação de paisagens naturais, aliado ao aumento no uso de agroquímicos, principalmente em culturas resistentes aos herbicidas, como no caso da soja, fazendo com que a produção e aplicação do glifosato seja intensa (Silva, 2013 Almeida et al., 2017). Por esse motivo, utilizamos o *Roundup* (herbicida à base de glifosato) em nossos testes, que além de ser o mais comercializado, é um produto de fácil acesso, sendo encontrado em sites de produtos agrícolas e lojas especializadas.

Estudos que avaliam os riscos do uso de contaminantes às populações naturais ainda são incipientes, mas apesar de desafiadores, necessários (Mahmood et al., 2016). Além do que, os esquemas de conservação global representam mamíferos e aves muito melhor do que os répteis (Roll et al., 2017). Por isso, trabalhos como este que avaliam a susceptibilidade de répteis as condições adversas são importantes fontes de material de

apoio, visto que as ascensões deste grupo nas pesquisas de biodiversidade vêm crescendo nos últimos anos.

Sendo assim, investigar a toxicidade causada pelo glifosato em um lagarto típico do cerrado é uma forma de instigar a pesquisa acerca de como os contaminantes químicos agem em populações naturais de vertebrados. Além de ter uma ampla distribuição geográfica, *Tropidurus torquatus* é uma espécie encontrada em habitats naturais e antrópicos, podendo este ser um fator considerável ao se avaliar o contato da espécie com áreas contaminadas com agrotóxicos.

Assim como em diversas espécies de répteis ovíparos, as fêmeas de *Tropidurus torquatus* nidificam seus ovos diretamente no solo (Kiefer et al., 2008), portanto, nesse momento os embriões podem ser expostos ao agroquímico através do solo contaminado. *T. torquatus* possuem ovos com casca flexível e permeável, permitindo a absorção de água pelo ovo para completar o desenvolvimento embrionário (Gomides et al., 2013). Atualmente, a forma como os pesticidas são absorvidos através da casca dos ovos é desconhecida. Todavia, acredita-se que os poros presentes na casca são a “porta-de-entrada”, já que eles permitem a troca de gases e esse contato com o meio externo pode ser explicado pelo fato de que a água entra em forma de vapor (Packard & Seymour, 1997).

Obtivemos uma considerável taxa de mortalidade dos ovos e anomalias nos neonatos mesmo aplicando o glifosato em concentrações bem abaixo do recomendado pela fabricante Monsanto. Somado a isso, os efeitos descritos mostraram-se independentes da concentração do produto, o mesmo foi observado no estudo com o lagarto teiú, onde danos ao DNA foram relatados desde a menor das concentrações testadas (Schaumburg et al., 2016).

Alguns estudos feitos com outras espécies de répteis relataram que os ovos podem absorver compostos químicos contidos no solo, como no caso de tartarugas *Chelydra serpentina* onde seis de dez pesticidas testados foram absorvidos pelas cascas que estavam sob exposição no solo contaminado (Cañas & Anderson, 2002; Marco et al., 2004; Solla & Martin, 2011). A genotoxicidade encontrada em embriões de *Salvator merianae* submetidos a pesticidas exemplifica que a contaminação também pode acontecer através da casca do ovo em lagartos (Schaumburg et al., 2016), isso pode

explicar a as anormalidades induzidas pelo glifosato encontradas em embriões de *T. torquatus* testados neste trabalho.

Em algumas espécies de répteis, como é o caso de *Caiman latirostris* é possível determinar a viabilidade dos ovos através da visualização de uma membrana opaca na casca do ovo (Poletta et al., 2009). Todavia, isso não se aplica a muitos lagartos, inclusive *T. torquatus*. Desse modo, é possível que alguns ovos poderiam ser inviáveis antes mesmo do tratamento com o glifosato. Por outro lado, a quantidade de ovos inviáveis que observamos aqui excedeu os valores considerados normais em outros estudos que envolvem estresse ambiental, como por exemplo a temperatura (Oliveira, 2019). E dos ovos férteis, a porcentagem de neonatos também foi drasticamente reduzida. Infelizmente, não existem muitos estudos que investigam a mortalidade de ovos de lagartos em relação ao estresse agroquímico. Schaumburg et al., (2016) afirmam que mesmo em tratamento com pesticidas, os ovos de *Salvator merianae* apresentam uma taxa de inviabilidade considerada normal para a espécie.

Estudos mostram que em condições experimentais, é possível investigar a toxicidade de organismos que estão em fase de desenvolvimento. Esse processo ontogenético ocorre desde o momento em que o ovócito é fertilizado até onde o organismo atinge sua forma madura, com suas funções estruturais e funcionais desenvolvidas (Oliveira, 2019). O processo ontogenético é controlado por vários fatores, a começar pelas alterações celulares feitas por moléculas específicas que desencadeiam a correta formação dos tecidos e órgãos dos animais (Gilbert & Barresi, 2016).

Já foram relatadas algumas alterações no processo de ossificação nos embriões de *Podocnemis unifilis*, mudanças na forma do esqueleto de *P. expansa* e anomalias nos membros de *Caiman latirostris* (Hirano et al., 2019; Carneiro, 2016; Latorre et al., 2012). Além do que, expandir esse conhecimento ao avaliar outros grupos de organismos se torna essencial para mitigar futuros impactos na biodiversidade.

A assimetria flutuante pode ter um grande potencial na função de indicar o bem-estar dos organismos, porém, é necessária muita cautela para que não ocorram “falsos-positivos” nas análises de AF, para isso, os cuidados nas medições são prioridade (Palmer e Strobeck, 2003). Estudos que buscam aperfeiçoar e padronizar as metodologias são essenciais neste caso.

Um erro de medição possivelmente foi encontrado ao avaliar a regressão linear, pois a assimetria revelou que alguns caracteres dependem do tamanho total do corpo e do traço. Isso sugere que as aplicações de outros índices de assimetria podem corrigir essa dependência, porém para a aplicação desse método é essencial ter número amostral maior (Palmer & Strobeck, 2003). O resultado do teste de normalidade apontou para assimetria direcional nos traços fêmur e tibia do tratamento com glifosato e nos traços tibia e úmero no grupo controle. O histograma mostra um desvio para a esquerda. Esses resultados foram confirmados pela análise de *two-way* anova apenas para a tibia, que apresenta um valor significativo no efeito do lado. Possivelmente isso deve estar relacionado ao baixo N amostral, devido ao grande número de óbitos e altas taxas de anomalia nos membros principalmente os anteriores, como rádio, ulna e metacarpos. São necessários estudos futuros que analisem e procurem entender esse aspecto da lateralidade nos membros como resultado de estresse.

Os membros anteriores foram os que apresentaram maiores flutuações nos valores de AF e IA do traço separadamente. Esse dado condiz com outros estudos que avaliaram a assimetria em membros de lagartos, e suporta a teoria de que membros mais assimétricos geram mais custos para os indivíduos. Por outro lado, em alguns estudos, os membros que apresentaram maiores flutuações nos índices assimétricos foram os membros posteriores. Por exemplo, em lagartos *Iberolacerta monticola*, os machos com fêmures assimétricos não alcançaram velocidade de fuga, afetando assim a locomoção eficiente dos espécimes (Martín & López, 2001). Dessa forma, é possível que os caracteres que envolvam a locomoção sejam de suma importância para a sobrevivência e sucesso reprodutivo de *Tropidurus torquatus*. Nós relatamos diferentes níveis de assimetria de acordo com os diferentes traços testados, isso indica que a assimetria flutuante em um caráter pode refletir sua importância funcional (Evans et al., 1995).

A assimetria flutuante vem sendo explorada para que se obtenha um bom indicador de estresse ambiental em populações de animais. Em lagartos, altos níveis de AF foram associados principalmente a fragmentação de habitat (Soule et al., 1973), populações insulares (Sarre, 1996), temperaturas de incubação elevadas (Quall & Andrews (1999) e poluição (Tull e Brussard, 2007). Entretanto, este é o primeiro trabalho a investigar a associação entre assimetria flutuante em lagartos que vivem em solos contaminados com químicos agrícolas. Sendo assim, este estudo pode se tornar um piloto

para começarmos essa investigação futuramente abordando uma amostra maior, com outras espécies, localidades e compostos diferentes.

Algumas considerações podem explicar a complexidade apresentada pelos nossos resultados de assimetria flutuante. A primeira delas, é a quantidade das medidas e N amostral pequeno, onde as anomalias tiveram um forte efeito, interferindo nas medidas dos traços. Sabe-se que poucos caracteres selecionados e o tamanho pequeno da amostra podem confundir e reduzir as potenciais relações com a assimetria flutuante. Assim, alguns estudos não apoiaram a relação da assimetria flutuante como resultado de condições ambientais, como por exemplo em *Podarcis muralis*, onde não houve variação de assimetria flutuante de características testadas (Crnobrnja-Isailovic et al., 2005). Padrões ontogenéticos diferentes e tempo de desenvolvimento de assimetria também podem interferir nesses resultados (Swaddle, 2003). Alguns ainda argumentam que a FA apresenta um poder limitado para avaliar perturbações ambientais, exigindo outras ferramentas para complementá-la, como estudos da estrutura genética das populações (Leary & Allendorf, 1989).

Conclusão

Em nosso conhecimento este estudo o primeiro estudo que avalia a toxicidade do herbicida glifosato no desenvolvimento de indivíduos dos lagartos de *Tropidurus torquatus*. Concluímos que o composto influencia negativamente, independente da dose, a sobrevivência dos embriões e pode levar a um aumento nas anomalias, como observado nos neonatos radiografados. Apesar de não obtermos resultados conclusivos quanto a assimetria flutuante como um indicativo de estresse, nossos resultados que expõe a taxa de mortalidade e presença de anomalias já são pressupostos iniciais de que o glifosato afeta negativamente os indivíduos. Mais uma vez indicando que é necessário aprofundar estas análises utilizando uma amostra maior, a fim de compreender a assimetria flutuante como um método seguro e definitivo para medir o estresse ambiental. Por fim, detectamos que nossos resultados podem auxiliar na construção de novos estudos que avaliam a perturbação ambiental em populações naturais de lagartos, principalmente porque os estudos que avaliam impactos das atividades antropogênicas em ecossistemas naturais estão em ascensão nos últimos anos.

Referências Bibliográficas

- Almeida FG, Guimarães LSF, Fonseca AO, Oliveira PR, Mendes SS. (2021) Influence of pesticides in reproductive aspects of *Tropidurus torquatus* in Minas Gerais, Brazil. *Environmental Science and Pollution Research*, **28**, 30070-30076.
- Andréa MM, Papini S, Peres TB, Bazarin S, Savoy VLT, Matallo MB. (2004) Glyphosate: influência na biota do solo e ação de minhocas sobre sua dissipação em terra agrícola. *Planta Daninha*, **22(1)**, 95-100.
- Azevedo JAR, Valdujo PH, Nogueira CC. (2016) Biogeography of anurans and squamates in the Cerrado hotspot: coincident endemism patterns in the richest and most impacted savanna on the globe. *Journal of Biogeography*.
- Bach NC, Natale GS, Somoza GM, Ronco AE (2016) Effect on the growth and development and induction of abnormalities by a glyphosate commercial formulation and its active ingredient during two developmental stages of the South-American Creole frog, *Leptodactylus latrans*. *Environ Sci Pollut*, **23(23)**, 23959–23971.
- Balbuena MS. (2015). Effects of sublethal doses of glyphosate on honeybee navigation. *J Exp Biol*, **218**, 2799–2805.
- Battaglin WA, Kolpin DW, Scribner EA, Kuivila KM, Sandstrom MW. (2002) Glyphosate, other herbicides, and transformation products in Midwestern streams. *Journal of the American Water Resources Association*, **41(2)**, 323-332.
- Bell B, Spotila JR, Congdon J. (2006) High incidence of deformity in aquatic turtles in the John Heinz National Wildlife Refuge. *Environmental Pollution*, **142**, 457–465.
- Bergallo HG, Duarte Rocha CF. (1993) Activity patterns and body temperatures of two sympatric lizards (*Tropidurus torquatus* and *Cnemidophorus ocellifer*) with different foraging tactics in southeastern Brazil. *Amphibia-Reptilia*, **14**, 312–315.
- Braibante MEF. (2012) A química dos agrotóxicos. *Química nova*, **34(1)**, 10-15.
- Brandt R, Navas CA. (2011) Life-history evolution on tropidurinae lizards: Influence of lineage, body size and climate. *PLoS ONE*, **6**.

Brasil. Lei nº 7802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/17802.htm

BROMCOMP (2011). Roundup Original Mais. Registrado no ministério da agricultura, pecuária e abastecimento mapa sob nº 01119. Bula original.

Campbell KR, Campbell TS. (2002) A logical starting point for developing priorities for lizard and snake ecotoxicology: a review of available data. *Environ Toxicol Chem*, **21(5)**, 894–898.

Carneiro IV. (2016) Ontogenia e avaliação dos efeitos da atrazina durante o desenvolvimento dos ossículos da esclera em *Podocnemis expansa* (Testudines: Podocnemididae). Monografia - Universidade Federal de Uberlândia.

Carpenter JK, Monks JM, Nelson N (2016) The effect of two glyphosate formulations on a small, diurnal lizard (*Oligosoma polychroma*). *Ecotoxicology*, **25(3)**, 548–554.

Carvalho ALG, Rivas LR, Céspedes R & Rodrigues MT. (2018) A New Collared Lizard (*Tropidurus* : *Tropiduridae*) Endemic to the Western Bolivian Andes and Its Implications for Seasonally Dry Tropical Forests. *American Museum Novitates*, **3896**, 1–56.

Carvalho ALG. (2013) On the distribution and conservation of the South American lizard genus *Tropidurus* Wied-Neuwied, 1825 (Squamata: *Tropiduridae*). *Zootaxa*, **3640**, 42.

Clapp J. (2021) Explaining Growing Glyphosate Use: The Political Economy of Herbicide-Dependent Agriculture. *Global Environmental Change*, **67**.

Clarke GM. (1998) Developmental stability and fitness: the evidence is not quite so clear. *American Naturalist*, **152**, 762-66.

Coutinho CFB, Tanimoto ST, Galli A, Garbenellini GS, Takayama M, Amaral RB, Mazo LH, Avaca LA, Machado SAS. (2005) Pesticidas: Mecanismo De Ação, Degradação E Toxidez. *Pesticidas ecotoxicologia e meio ambiente*, **15**, 65-72.

- Cuhra M, Traavik T, Bohn T (2013) Clone-and age-dependent toxicity of a glyphosate commercial formulation and its active ingredient in *Daphnia magna*. *Ecotoxicology* **22**(2), 251–262.
- Crnobrnja-Isailovic J, Aleksic I, Bejakovic D (2005) Fluctuating asymmetry in *Podarcis muralis* populations from Southern Montenegro: detection of environmental stress in insular populations. *Amphibia-Reptilia*, **26**, 149–158.
- Deeming DC, Ferguson MWK. (1991) *Egg incubation: its effects on embryonic development in birds and reptiles*, 1st Edit. Cambridge University Press, New York.
- De-Lima, AKS, Paschoaletto IP, Pinho LO, Benmamman, P, Klaczko, J. (2019) Are hemipenial traits under sexual selection in *Tropidurus* lizards? Hemipenial development, male and female genital morphology, allometry and coevolution in *Tropidurus torquatus* (Squamata: Tropiduridae). *PLoS One*, **14**, 1–17.
- Deng JS, Wang K, Hong Y, Qi JG. (2009) Spatio-temporal dynamics and evolution of land use change and landscape pattern in response to rapid urbanization. *Landscape and Urban Planning*, **92**, 187-198.
- Dutra BK, Fernandes FA, Failace DM, Oliveira GT (2011) Effect of Roundup (glyphosate formulation) in the energy metabolism and reproductive traits of *Hyalella castroi* (Crustacea, Amphipoda, Dogielinotidae). *Ecotoxicology*, **20**(1), 255–263.
- Evans MR, Martins LFT, Haley MP. (1995) Inter- and intra-sexual patterns of fluctuating asymmetry in the red-billed streamertail: should symmetry always increase with ornament size? *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **37**, 15-23.
- Freitas LM, Paranaíba JFFS, Pérez APS, Machado MRF, Lima FC. (2020) Toxicity of pesticides in lizards. *Human and Experimental Toxicology*, **39**(5), 596-604.
- Gaupp-Berghausen M, Hofer M, Rewald B, Zaller JG (2015) Glyphosate-based herbicides reduce the activity and reproduction of earthworms and lead to increased soil nutrient concentrations. *Sci Rep* 5:12886.
- Gilbert SF, Barresi MJF. (2016) *Developmental Biology*, 11th Edit. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

- Gomides SC, Ribeiro LB, Peters VM, Sousa BM (2013) Feeding and reproduction ecology of the lizard *Tropidurus torquatus* (Squamata: Tropiduridae) in a rock outcrop area in southeastern Brazil. *Rev Chil Hist Nat*, **86**, 137–151
- Gruys KJ, Sikorski JA. (1999) Inhibitors of tryptophan, phenylalanine and tyrosine biosynthesis as herbicides. *Plant amino acids: biochemistry and biotechnology*, 357-384.
- Hall JM, Warner DA. (2018) Thermal spikes from the urban heat island increase mortality and alter physiology of lizard embryos. *Journal of Experimental Biology*, 221.
- Hartman WA, Martin DB (1984) Effect of suspended Bentonite clay on the acute toxicity of glyphosate to *Daphnia pulex* and *Lemna minor*. *Bull Environ Contam Toxicol*, **33(1)**, 355–361.
- Herbert LT, Vázquez DE, Arenas A, Farina WM (2014). Effects of field-realistic doses of glyphosate on honeybee appetitive behaviour. *J Exp Biol*. **217 (19)**, 3457-64.
- Hirano LQL, Silva AL, Menezes-Reis LT, Mendonça JS, Simões K, Santos ALQ, Vieira LG (2019) Effects of egg exposure to atrazine and/or glyphosate on bone development in *Podocnemis unifilis* (Testudines, Podocnemididae). *Ecotoxicol. Environ*, 182.
- Howe CM, Berrill M, Pauli BD, Helbing CC, Werry K, Veldhoen N (2004) Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species. *Environ Toxicol Chem*, **23(8)**, 1928–1938.
- Huey RB, Deutsch CA, Tewksbury JJ, Vitt LJ, Hertz PE et al. (2009) Why tropical forest lizards are vulnerable to climate warming. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **276**, 1939–1948.
- Huey RB. (1982) Temperature, Physiology, and the Ecology of Reptiles. In: *Biology of the Reptilia*, 25–91.
- IBGE (2020) Monitoramento da cobertura e uso da terra do Brasil : 2016 – 2018. Id 101703.
- Junior OPA, Santos TCR. (2002) Glifosato: Propriedades, Toxicidade, Usos E Legislação. *Quim. Nova*, **25**, 589-593.

Kiefer MC, Van Sluys M, Rocha CFD. (2008) Clutch and egg size of the tropical lizard *Tropidurus torquatus* (Tropiduridae) along its geographic range in coastal eastern Brazil. *Canadian Journal of Zoology* **86**, 1376–1388.

Kiefer MC, Van Sluys M, Rocha CFD. 2008. Clutch and egg size of the tropical lizard *Tropidurus torquatus* (Tropiduridae) along its geographic range in coastal eastern Brazil. *Canadian Journal of Zoology*, **86**, 1376–1388.

Klaczko, Julia et al. (2019) Atlas fotográfico de anatomia comparada de vertebrados: sistemas esquelético e muscular. Brasília: Universidade de Brasília. **4**. Disponível em: <http://repositorio.unb.br/handle/10482/35461>.

Leary RF, Allendorf FW. (1989) Fluctuating asymmetry as an indicator of stress: Implications for conservation biology. *Trends Ecol Evol*, **4(7)**.

Lens L, Van Dongen S, Kark S, Matthysen E (2002) Fluctuating asymmetry as an indicator of fitness: can we bridge the gap between studies? *Biol Rev*, **77**, 27–38.

Linz GM, Blixt DC, Bergman DL, Bleier WJ (1996) Responses of redwinged blackbirds, yellow-headed blackbirds and marsh wrens to glyphosate-induced alterations in cattail density. *J Field Ornithol*, 167–176.

Locke MA, Zablotowicz RM, Reddy KN. (2008) Integrating soil conservation practices and glyphosate-resistant crops: impacts on soil. *Pest Management Science*, **64(4)**, 457-469.

López P, Muñoz A, Martín J. (2002) Symmetry, male dominance and female mate preferences in the Iberian rock lizard, *Lacerta monticola*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **52(4)**, 342-347.

López, P, Martín J. (2002) Locomotor capacity and dominance in male lizards *Lacerta monticola*: a trade-off between survival and reproductive success? *Biological Journal of the Linnean Society*, **77(2)**, 201–209.

Lucchese G. (2005) Agrotóxicos – Construção da Legislação. Biblioteca Digital da Câmara dos Deputados.

Mahmood I, Imadi SR, Shazadi K, Gul A, Hakeem KR. (2016) Effects of Pesticides on Environment. *Springer International Publishing Switzerland*, 253-269.

- Markow TA. (1995) Evolutionary ecology and developmental instability. *Annu. Rev. Entomol*, **40**, 105-120.
- Martín, J.; López, P. Hindlimb. (2001) Asymmetry reduces escape performance in the lizard *Psammodromus algirus*. *Physiological and Biochemical Zoology*, **74**, 619–624.
- Martins DI, Carbonari CA, Terra MA, Marchi SR. (2009) Ação de adjuvantes na absorção e translocação de glyphosate em plantas de aguapé (*Eichhornia crassipes*). *Planta Daninha*, **27**, 155-163.
- Mattos MLT, Peralba MCR, Dias SLP, Prata F, Camargo L. (2002) Monitoramento ambiental do glyphosate e do seu metabólito (ácido aminometilfosfônico) na água de lavoura de arroz irrigado. *Pesticidas: Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, **12(1)**, 145-154.
- Menéndez-Helman RJ, Ferreyroa GV, dos Santos Afonso M, Salibián A (2012) Glyphosate as an acetylcholinesterase inhibitor in *Cnesterodon decemmaculatus*. *Bull Environ Contam Toxicol*, **88(1)**, 6–9.
- Moraes RF. (2019) Agrotóxicos no Brasil: padrões de uso, política da regulação e prevenção da captura regulatória, IPEA.
- Murussi CR, Costa MD, Leitemperger JW, Guerra L, Rodrigues CC, Menezes CC, Severo ES, Flores-Lopes F, Salbego J, Loro VL (2016) Exposure to different glyphosate formulations on the oxidative and histological status of *Rhamdia quelen*. *Fish Physiol Biochem* **42(2)**, 445–455.
- Oliveira GD. (2019) Anomalias ósseas em *Tropidurus torquatus* (Wied, 1820) e sua relação com o aumento da temperatura. Dissertação de mestrado, Universidade de Brasília.
- Oliveira RT, Dallegrave E, Mantese FD, Andrade AJ, Dalsenter PR, Langeloh A (2007) Pre-and postnatal toxicity of the comercial glyphosate formulation in Wistar rats. *Arch Toxicol*, **81(9)**, 665–673.
- Packard M, Seymour R. (1997) Amniote Origins Completing the Transition to Land. *Academic Press*, 265 – 290

- Palmer AR, Strobeck C. (2003) Fluctuating Asymmetry Analyses Revisited. *In: POLAK, M. Developmental Instability (DI): Causes and Consequences*. Oxford: Oxford University Press, 279-319.
- Palmer AR. (1994) Fluctuating asymmetry analyses: A primer *Developmental Instability: Its Origins and Evolutionary Implications*, **93**, 335-364.
- Palmer, A.R.; Strobeck, C. (1986) Fluctuating asymmetry: measurement, analysis, patterns. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **17**, 391–421.
- Parsons PA. (1992) Fluctuating asymmetry: a biological monitor of environmental and genomic stress. *Heredity*, **68**, 361-364.
- Pérez-Iglesias JM, Franco-Belussi L, Moreno L, Tripole S, de Oliveira C, Natale GS (2016) Effects of glyphosate on hepatic tissue evaluating melanomacrophages and erythrocytes responses in neotropical anuran *Leptodactylus latinasus*. *Environ Sci Pollut*, **23(10)**, 9852–9861.
- Piantoni C, Navas CA, Ibarguengoytía NR. (2019) A real tale of Godzilla: Impact of climate warming on the growth of a lizard. *Biol. J. Linn. Soc.* **126**, 768–782.
- Pignati WA, Lima FANS, Lara SS, Correa MLM, Barbosa JR, Leão LHC, Pignatti MG. (2017) Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. *Ciência & Saúde Coletiva*, **22(10)**, 3281-3293.
- Pyron RA, Burbink FT. (2013) Early origin of viviparity and multiple reversions to oviparity in squamate reptiles. *Ecology Letters*, **17**, 13–21.
- Qualls CP, Andrews RM. (1999) Cold climates and the evolution of viviparity in reptiles: cold incubation temperatures produce poor-quality offspring in the lizard, *Sceloporus virgatus*. *Biol J Linn Soc*, **67**, 353–376.
- Rapp Py-Daniel tainã, Kennedy Soares De-Lima A, Campos Lima F, Pic-Taylor A, Rodrigues Pires Junior O et al. (2017) A Staging Table of Post-Ovipositional Development for the South American Collared Lizard *Tropidurus torquatus* (Squamata: Tropiduridae). *Anatomical Record*, **300**, 277–290.
- Ribeiro LB, Gomides SC, Santos AO, Sousa BM. (2008) Thermoregulatory behavior of the Saxicoious Lizard, *Tropidurus torquatus* (Squamata, Tropiduridae), in a rocky outcrop in Minas Gerais, Brazil. *Herpetological Conservation and Biology*, **3**, 63–70.

- Rodrigues BN, Almeida FS. (2005) Guia de herbicidas. 5. Ed, 592.
- Rodrigues MT. (1987) Sistemática, ecologia e zoogeografia dos *Tropidurus* do grupo torquatus ao sul do rio Amazonas (Sauria, Iguanide). *Arquivos de Zoologia*, **31**, 105–230.
- Ross MA, Childs, DJ. (1996) Herbicide mode-of-action summary. *Cooperative Extension Service Publication*.
- Salbego J, Pretto A, Gioda CR, de Menezes CC, Lazzari R, Neto JR, Baldisserotto B, Loro VL (2010) Herbicide formulation with glyphosate affects growth, acetylcholinesterase activity, and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Arch Environ Contam Toxicol*, **58(3)**, 740–745.
- Santillo DJ, Brown PW, Leslie Jr DM (1989) Response of songbirds to glyphosate-induced habitat changes on clearcuts. *J Wildl Manag*, 64–71
- Sarre S. (1996) Habitat fragmentation promotes fluctuating asymmetry but not morphological divergence in two geckos. *Res Popul Ecol*, **38**, 57–64.
- Schaumburg LG, Siroski PA, Poletta GL. (2016) Genotoxicity induced by Roundup (glyphosate) in tegu lizard (*Salvator merianae*) embryos. *Pest Biochem Physiol*, **130**, 71–78.
- Schmeller DS, Dolek M, Geyer A, Settele J, Brandl R. (2011) The effect of conservation efforts on morphological asymmetry in a butterfly population. *Journal for Nature Conservation*, **19(3)**, 161-165.
- Seabra VS, Cruz CM. (2013) Mapeamento da Dinâmica da Cobertura e Uso da Terra na Bacia Hidrográfica do Rio São João, RJ. *Soc. & Nat*, **25**, 411-426.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, **9(7)**, 671–675.
- Soloneski S, de Arcaute CR, Larramendy ML (2016) Genotoxic effect of a binary mixture of dicamba-and glyphosate-based comercial herbicide formulations on *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867) (Anura, Bufonidae) late-stage larvae. *Environ Sci Pollut*, **23(17)**, 17811–17821.
- Soule ME, Yang SY. (1973) Genetic variation in side-blotched lizards on islands in the Gulf of California. *Evolution*, **27**, 593–600.

- JP Swaddle (2003) Assimetria flutuante, comportamento animal e evolução. *Adv. Study Behav.*, **32**, 169 – 205.
- Tate TM, Spurlock JO, Christian FA (1997) Effect of glyphosate on the development of *Pseudosuccinea columella* snails. *Arch Environ Contam Toxicol*, **33(3)**, 286–289.
- Teixeira JC. (2005) Modernização Da Agricultura No Brasil: Impactos Econômicos, Sociais E Ambientais. *Revista Eletrônica da Associação dos Geógrafos Brasileiros*, **2**, 21-42.
- Teixeira RD, Vieira GHC, Colli GR, Bão SN. (1999) Ultrastructural study of spermatozoa of the neotropical lizards, *Tropidurus semitaeniatus* and *Tropidurus torquatus* (Squamata, Tropiduridae). *Tissue and Cell*, **31**, 308–317.
- Thompson DG, Solomon KR, Wojtaszek BF, Edington AN, Stephenson GR, Relyea RA. (2006) The Impact of Insecticides and Herbicides on the Biodiversity and Productivity of Aquatic Communities. *Ecological Applications*, **16 (5)**, 2022-2034.
- Tull JC, Brussard PF. (2007) Fluctuating Asymmetry as an Indicator of Environmental Stress from Off-Highway Vehicles. *J Wildl Manag*, **71**, 1944–1948.
- Uetz P, Hosek J. (2019) The reptile database: [http://www. reptiledatabase.org](http://www.reptiledatabase.org).
- Van Valen LA. (1962) Study of fluctuating asymmetry. *Evolution* , **16(2)**, 125-142.
- Verderame M, Scudiero R. (2019) How Glyphosate Impairs Liver Condition in the Field Lizard *Podarcis siculus* (Rafinesque-Schmaltz, 1810): Histological and Molecular Evidence. *BioMed Research International*, **2019**. 13p.
- Vitt LJ, Goldberg SR. (1983) Reproductive Ecology of Two Tropical Iguanid Lizards: *Tropidurus torquatus* and *Platynotus semitaeniatus*. *Copeia*, **1983**, 131.
- Webster TMU, Santos EM (2015) Global transcriptomic profiling demonstrates induction of oxidative stress and of compensatory cellular stress responses in brown trout exposed to glyphosate and Roundup. *BMC Genom*, **16(1)**, 32.
- Weir SM, Suski JG, Salice CJ. (2010) Ecological risk of anthropogenic pollutants to reptiles: evaluating assumptions of sensitivity and exposure. *Environ Pollut*, **158(12)**, 3596–3606.

Wiederhecker HC, Pinto ACS, Colli GR. (2002) Reproductive Ecology of *Tropidurus torquatus* (Squamata: Tropiduridae) in the Highly Seasonal Cerrado Biome of Central Brazil. *Journal of Herpetology*, **36**, 82.

Yamada T, Castro PRC. (2007) Efeitos Do Glifosato Nas Plantas: Implicações Fisiológicas e Agronômicas. *International Plant Nutrition Institute*, **119**.

Zhang L, Chen L, Meng Z. (2016) Bioaccumulation, behavior changes and physiological disruptions with gender-dependent in lizards (*Eremias argus*) after exposure to glufosinate-ammonium and L-glufosinate- ammonium. *Chemosphere*, **226**, 817–824.