

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

PATRÍCIA RODRIGUES DA SILVA

**INFLUÊNCIA DO HERBICIDA QUINCLORAC SOBRE OS NÍVEIS DE
LIPOPEROXIDAÇÃO E DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICAS
NO TECIDO MUSCULAR DE *Lithobates catesbeianus* (ANURA: RANIDAE)**

PORTO ALEGRE

2014

PATRÍCIA RODRIGUES DA SILVA

**INFLUÊNCIA DO HERBICIDA QUINCLORAC SOBRE OS NÍVEIS DE
LIPOPEROXIDAÇÃO E DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICAS
NO TECIDO MUSCULAR DE *Lithobates catesbeianus* (ANURA: RANIDAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado no Instituto de Biociências – UFRGS, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Dr. Márcio Borges-Martins

Co-orientadora: Dra. Guendalina Turcato
Oliveira

Porto Alegre

2014

Rodrigues da Silva, Patrícia
Influência do herbicida Quinclorac sobre os níveis de Lipoperoxidação e das Defesas Antioxidantes Enzimáticas no tecido muscular de *Lithobates catesbeianus* (ANURA: RANIDAE) / Patrícia Rodrigues da Silva. -- 2014.
49 f.

Orientador : Márcio Borges-Martins.
Coorientadora: Guendalina Turcato Oliveira.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Bacharelado em Ciências Biológicas, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Agrotóxicos. 2. Quinclorac. 3. Estresse oxidativo. 4. *Lithobates catesbeianus*. 5. Girinos.
I. Borges-Martins, Márcio, orient. II. Turcato Oliveira, Guendalina, Coorient. III. Título

PATRÍCIA RODRIGUES DA SILVA

**INFLUÊNCIA DO HERBICIDA QUINCLORAC SOBRE OS NÍVEIS DE
LIPOPEROXIDAÇÃO E DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICAS
NO TECIDO MUSCULAR DE *Lithobates catesbeianus* (ANURA: RANIDAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado no
Instituto de Biociências – UFRGS, como
requisito parcial para obtenção do grau de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovado em:

Banca examinadora:

Prof. Dr. Luiz Carlos Rios Kucharski

Ms Valentina Zaffaroni Caorsi

Prof. Dr. Márcio Borges-Martins (orientador)

Porto Alegre

2014

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer imensamente o apoio incondicional dos meus pais, Cláudia e Josué, na realização do meu sonho de me tornar bióloga. Sem o apoio emocional e estrutural de vocês, eu não chegaria até aqui. Vocês são o motivo que me incentivou a seguir em frente e a superar os obstáculos do caminho na busca de meus objetivos. Enfim, muito obrigada por tudo! Amo vocês incondicionalmente.

Grazi, pela compreensão em todos os meus momentos de crise, de luz e computador ligados no quarto até altas horas da madrugada, apoio emocional e psicológico. Tu és a irmã que eu não poderia ter escolhido melhor!

Ao meu namorado, Igor, por muitas coisas. Pelo apoio e incentivo para fazer o extravestibular, pela motivação e compreensão em meus momentos de crise e dúvidas, pela paciência incondicional, por todo o apoio técnico no TCC e em outros trabalhos da faculdade, e, principalmente, pelo amor e carinho a mim sempre dedicados, principalmente em momentos difíceis. Muito obrigada por ser essa pessoa maravilhosa e fazer parte da minha vida! Também agradeço à Vera e ao Alexander, minha segunda família, por também sempre me apoiarem e aplaudirem minhas vitórias.

Aos meus amigos e irmãos, Kamila e Heron, pela amizade de mais de uma década. A amizade de vocês é muito importante na minha vida. Quero ter vocês sempre por perto! Às amigas muito estimadas que a Bio me deu, Jéssica e Lê. A trajetória do curso se tornou muito mais leve e feliz com a amizade e coleguismo e vocês. Amo vocês!

A toda a equipe do Laboratório de Fisiologia da Conservação, da PUCRS, minha “casa científica” durante 3 anos. A todos que, de alguma forma, contribuíram na realização deste trabalho e na minha formação, ou pelas risadas: Artur, Betânia, Camila, Fabiano, Fernando, Ludimila, Luiza, Maiara e Mariana. À Tanilene, por ter me orientado na minha iniciação científica. Obrigada por todos os ensinamentos, os puxões de orelha, o incentivo e a paciência. Agradeço imensamente a minha orientadora, Guendalina, por ter aberto as portas do Laboratório para mim e, principalmente, por sempre acreditar no meu potencial e nunca desistir de mim. Obrigada por todo o ensinamento, paciência, compreensão e orientação científica durante esses anos e, quem sabe, nos próximos!

Ao prof. Márcio, por ter acreditado na minha ideia e pela orientação e compreensão.

Finalmente, agradeço a PUCRS e a UFRGS pela minha formação e por terem possibilitado a realização do meu sonho de me tornar bióloga e, possivelmente, fazer a diferença na sociedade ou mudar o mundo! ☺

RESUMO

O incremento da produção agrícola levou a uma crescente utilização de agrotóxicos, que vem ocasionando a degradação e poluição de diferentes ecossistemas associados às lavouras, sobretudo ecossistemas aquáticos. Além disso, o uso indiscriminado destas substâncias pode resultar em alterações fisiológicas, como o aumento de agentes oxidantes no organismo, inclusive em espécies não-alvo. O impacto antrópico decorrente do uso de agrotóxicos, provavelmente, é um dos fatores responsáveis pelos declínios observados em populações de anfíbios ao redor do mundo, visto que constituem um grupo de animais bastante sensíveis a diversos fatores ambientais. Com isso, o presente estudo buscou avaliar os efeitos fisiológicos decorrentes da exposição a diferentes concentrações do herbicida Quinclorac, amplamente utilizado nas lavouras de arroz do Rio Grande do Sul, sobre a atividade das enzimas antioxidantes Glutathione S-Transferase (GST), Superóxido Dismutase (SOD) e Catalase (CAT), além dos níveis de lipoperoxidação (LPO), no tecido muscular de girinos de *Lithobates catesbeianus*. Os animais foram adquiridos em um ranário e aclimatados no Laboratório de Fisiologia da Conservação, PUCRS, onde também foram realizados os procedimentos experimentais. Após o período de aclimação, os girinos foram expostos a quatro diferentes concentrações (0,05, 0,10, 0,20 e 0,40 µg/L) do herbicida durante sete dias; findo este período, os animais foram sacrificados e o tecido muscular foi retirado para a realização das dosagens bioquímicas em espectrofotômetro. Os resultados obtidos revelaram um decréscimo na atividade das enzimas GST, SOD e CAT nos grupos expostos ao herbicida, em comparação aos controles, sugerindo a inibição do sistema antioxidante enzimático. Além disso, não se observou dano oxidativo no tecido muscular dos girinos, resposta evidenciada pela redução dos níveis de LPO nos grupos expostos ao herbicida. Tais resultados permitem sugerir a ativação do sistema antioxidante não-enzimático, evitando ou contendo danos teciduais no tecido muscular, bem como uma readaptação fisiológica dos animais, provavelmente facilitada pela alta plasticidade adaptativa de *L. catesbeianus*. Contudo, outros estudos seriam necessários a fim de elucidar como esta espécie reagiria frente a maiores concentrações deste herbicida, bem como a resposta de outras espécies, sobretudo espécies nativas, normalmente mais suscetíveis à ação de xenobióticos.

Palavras-chave: Agrotóxicos; Quinclorac; estresse oxidativo; *Lithobates catesbeianus*.

ABSTRACT

Higher agricultural production has led to increased use of pesticides, which is causing the degradation and pollution of different ecosystems associated with crops, especially aquatic ecosystems. Furthermore, the indiscriminate use of these substances can result in physiological alterations, such as the increase of oxidative agents in the organism, including in non-target species. The anthropic impact of the use of pesticides is probably one of the main factors causing the declines observed in amphibian populations around the world, which are a group of animals very susceptible to various environmental factors. Thus, this study aimed to evaluate the physiological effects resulting from exposure to different concentrations of Quinclorac, a widely used herbicide in the rice fields in Rio Grande do Sul, on the activity of antioxidant enzymes glutathione S-transferase (GST), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), and the levels of lipid peroxidation (LPO) in muscle tissue of *Lithobates catesbeianus* tadpoles. The animals were acquired in a frog farm and acclimated in the Conservation Physiology Laboratory, PUCRS, where the experimental procedures were placed. After the acclimation period, the tadpoles were exposed to four different concentrations (0,05, 0,10, 0,20 and 0,40 $\mu\text{g/L}$) of the herbicide for seven days; after this period, the animals were sacrificed and muscle tissue was removed for biochemical measurements in a spectrophotometer. The results showed a decrease in the activity of the enzymes GST, SOD and CAT in the groups exposed to the herbicide, compared to controls, suggesting inhibition of the enzymatic antioxidant system. Furthermore, there was not oxidative damage in the muscle tissue of the tadpoles, because the LPO levels were reduced in the groups exposed to the herbicide. Such results allow to suggest that the nonenzymatic antioxidant system was activated, avoiding or containing muscle tissue damage, and a physiologic readaptation of the animals, probably facilitated by the high adaptative plasticity of *L. catesbeianus*. However, other studies are needed to elucidate how this species would react faced higher concentrations of this herbicide, as well as the response of other species, especially native species, usually more susceptible to xenobiotic action.

Keywords: Agrochemicals; Quinclorac; oxidative stress; *Lithobates catesbeianus*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** **A.** Indivíduo adulto e **B.** Fase larval (girino) de *Lithobates catesbeianus* (rã-touro).....21
- Figura 2.** Níveis totais de atividade da enzima Glutathione S-Transferase (GST) no tecido muscular de girinos de *Lithobates catesbeianus* submetidos às diferentes concentrações de Quinclorac (Facet[®]).....30
- Figura 3.** Níveis totais de atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD) no tecido muscular de girinos de *Lithobates catesbeianus* submetidos às diferentes concentrações de Quinclorac (Facet[®]).....31
- Figura 4.** Níveis totais de atividade da enzima Catalase (CAT) no tecido muscular de girinos de *Lithobates catesbeianus* submetidos às diferentes concentrações de Quinclorac (Facet[®]).....32
- Figura 5.** Níveis totais de lipoperoxidação no tecido muscular de girinos de *Lithobates catesbeianus* submetidos às diferentes concentrações de Quinclorac (Facet[®]).....33

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Concentrações utilizadas para os procedimentos experimentais com *L. catesbeianus*.....25
- Tabela 2.** Organização do número de animais nos aquários, tempo de experimento por procedimento experimental e concentração de herbicida utilizada em cada grupo.....26

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	INFLUÊNCIAS ANTRÓPICAS SOBRE OS ECOSISTEMAS: IMPACTOS AMBIENTAIS DECORRENTES DO USO INDISCRIMINADO DE AGROTÓXICOS	10
1.2	A PRODUÇÃO DE ARROZ NO RIO GRANDE DO SUL E O HERBICIDA QUINCLORAC.....	11
1.3	A ECOTOXICOLOGIA E A AVALIAÇÃO DOS EFEITOS FISIOLÓGICOS DECORRENTES DA EXPOSIÇÃO A AGROTÓXICOS.....	13
1.3.1	ECOTOXICOLOGIA	13
1.3.2	ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS DECORRENTES DA EXPOSIÇÃO A AGROTÓXICOS	14
1.4	ANFÍBIOS	17
1.4.1	PROCESSO DE METAMORFOSE E O PAPEL DO TECIDO MUSCULAR .	19
1.4.2	FAMÍLIA RANIDAE	20
2	JUSTIFICATIVA	22
3	OBJETIVOS	23
3.1	OBJETIVO GERAL	23
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
4	MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1	OBTENÇÃO DOS ESPÉCIMES DE <i>Lithobates catesbeianus</i>	24
4.2	ACLIMATAÇÃO E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	24
4.3	ANÁLISES BIOQUÍMICAS	26
4.3.1	PREPARAÇÃO DO HOMOGENEIZADO	26
4.3.2	DOSAGENS BIOQUÍMICAS	27
4.4	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	29
5	RESULTADOS	30
5.1	ENZIMAS ANTIOXIDANTES.....	30
5.1.1	GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST)	30
5.1.2	SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)	31
5.1.3	CATALASE (CAT)	31
5.2	LIPOPEROXIDAÇÃO (TBARS).....	32
6	DISCUSSÃO	34
7	CONCLUSÃO	38
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

1 INTRODUÇÃO

1.1 INFLUÊNCIAS ANTRÓPICAS SOBRE OS ECOSISTEMAS: IMPACTOS AMBIENTAIS DECORRENTES DO USO INDISCRIMINADO DE AGROTÓXICOS

Atualmente, as atividades humanas decorrentes do crescente processo de desenvolvimento industrial, urbano e agrícola vêm causando impactos e alterações em diferentes ecossistemas, promovendo modificações, muitas vezes irreversíveis, nestes ambientes (Bohrer, 1995).

A agricultura, inicialmente, era uma atividade de subsistência, porém, o aumento da população mundial levou a uma maior demanda por alimentos e, conseqüentemente, à necessidade de incremento da produção agrícola, principalmente para fins comerciais. Com isso, ocorreu uma crescente utilização de substâncias conhecidas como agrotóxicos, e o subsequente aumento de despejos realizados pela atividade agrícola, que afetam de forma negativa diferentes ecossistemas, sendo a poluição aquática uma das maiores preocupações devido a perspectivas de escassez futura (Costa, 2004).

Agrotóxicos, defensivos agrícolas, pesticidas, praguicidas, remédios de planta ou veneno são denominações relacionadas a um grupo de substâncias químicas utilizadas no controle de organismos considerados pragas e doenças de plantas (Peres e Moreira, 2003), sendo que agrotóxico ou pesticida são os termos mais comumente utilizados para se referir a tais substâncias.

De acordo com o artigo 1º, inciso IV, do Decreto nº 4.074 de 04 de janeiro de 2002, que regulamenta a Lei Federal nº 7.082, de 11 de julho de 1989, agrotóxicos:

“São definidos como produtos e 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 plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou de fauna, a fim de preservá-las de ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento.” (BRASIL, 2002, p.1).

O termo agrotóxico inclui inseticidas (usados no controle de insetos), fungicidas (controlam fungos patógenos), herbicidas (combate às plantas invasoras), fumigantes

(combate às bactérias do solo), algicida (combate a algas), avicidas (combate a aves), nematicidas (controlam nematoides), moluscidas (combate moluscos), acaricidas (usados no controle de ácaros), além de reguladores de crescimento, desfolhantes (combate a folhas indesejadas) e dessecantes (Baird, 2006; Silva & Fay, 2004).

Os agrotóxicos estão distribuídos nas classes I, II, III ou IV, de acordo com o nível de toxicidade, correspondendo a extremamente tóxicos, altamente tóxicos, medianamente tóxicos e pouco tóxicos, respectivamente (Braibante & Zappe, 2012); contaminam o ar, solo, águas superficiais e subterrâneas, e podem se acumular em organismos da cadeia biológica, causando danos em animais silvestres e até em humanos (Meirelles *et al.*, 1991).

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, as vendas de pesticidas entre 1999 e 2004 aumentaram cerca de 190% (MAPA, 2004), com destaque para os herbicidas e inseticidas. Nesse contexto, o Brasil é um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo e o principal da América Latina, sendo considerado, em 2008, como o maior consumidor mundial (SINDAG, 2009) e, desde então, ocupando o primeiro lugar no *ranking* dos países consumidores de agrotóxicos (Carneiro *et al.*, 2012). Essa prática tem contribuído para a degradação e fragmentação de diferentes ecossistemas, sobretudo ecossistemas aquáticos, além de ocasionar declínios populacionais de várias espécies, inclusive espécies não-alvo.

1.2 A PRODUÇÃO DE ARROZ NO RIO GRANDE DO SUL E O HERBICIDA QUINCLORAC

O arroz (*Oryza sativa*) é um dos alimentos mais importantes para a nutrição humana, sendo a base alimentar de mais de três bilhões de pessoas. É o segundo cereal mais cultivado no mundo, sendo que a dimensão total de áreas que possuem cultura de arroz é de, aproximadamente, 158 milhões de hectares (SOSBAI, 2010).

O Brasil está entre os dez maiores produtores mundiais de arroz (USDA, 2014), sendo a Região Sul a maior produtora nacional, e o Rio Grande do Sul responsável por cerca de 68,1% da produção total brasileira (cerca de oito milhões de toneladas) (IBGE, 2014). Em torno de 133 municípios do Estado produzem arroz (IRGA, 2014), sendo que a rizicultura se caracteriza como uma cultura agrícola com forte impacto na economia rio-grandense, apresentando um valor bruto de produção de cinco bilhões de reais, o que representaria mais do que 3% de ICMS e 2,74% do PIB (SOSBAI, 2010).

Com a redução das áreas disponíveis para produção, torna-se indispensável à busca de novas alternativas que conciliem cultivos intensivos com elevadas produtividades (Embrapa, 2004). Com isso, foram desenvolvidos três tipos principais de ecossistemas de arroz: os de terras altas, os de várzeas úmidas e os irrigados por inundação. Neste último, as aplicações de agrotóxicos são seguidas pela inundação das lavouras (Resgalla *et al.*, 2002), deixando os organismos aquáticos e semi-aquáticos diretamente expostos à ação direta destes poluentes.

Dentre estes, o sistema de produção de arroz irrigado por inundação é o mais expressivo, representando 80% do arroz produzido no mundo, e sendo responsável por aproximadamente 93% do total da produção brasileira (Embrapa, 2004). Na Região Sul, a orizicultura irrigada é responsável por 70% da produção nacional. Aproximadamente 65% da produção de arroz irrigado do Brasil ocorrem nas chamadas várzeas ou terras baixas, principalmente em Santa Catarina e no Rio grande do Sul, que é o Estado que mais produz utilizando o sistema de cultivo irrigado com lâmina contínua, elevando o índice de uso de água na agricultura (Gomes *et al.*, 2004).

Dentro desse contexto, o herbicida Quinclorac (3,7-dicloro-8-quinolino carboxílico), vendido sob o nome comercial Facet[®], é um agente amplamente utilizado nas lavouras de arroz, pois é de fácil aplicação e apresenta um controle eficaz de ervas daninhas pré e pós-emergentes, como *Echinochloa* sp., *Digitaria* sp., e *Setaria* sp. (Martinez *et al.*, 1998; Schmidt *et al.*, 1998). No Brasil, é aplicado nas culturas de arroz na forma de *spray* (pulverização) (Rodrigues & Almeida, 1998).

É um herbicida sistêmico, que é rapidamente absorvido por sementes em germinação, raízes e folhas, e é translocado na planta tanto da base para o ápice quanto o contrário (Berghaus & Wuerzer, 1989; Grossmann, 1998; Lamoureux & Rusness, 1995). Por ser um herbicida mimetizador de auxinas, o Quinclorac atua de forma bastante semelhante às auxinas naturais presentes nos vegetais. Pode ocasionar alterações no metabolismo de ácidos nucléicos e em aspectos metabólicos da parede celular, causando a epinastia em folhas e raízes, além de interrupção do floema, levando à morte da planta em um período de 3 a 5 dias ou em poucas semanas (Ferreira *et al.*, 2005; Hess & Weller, 2000).

Possui uma meia-vida que pode variar entre 18, 36, 44, 50 ou 166 dias (McElroy & Breeden, 2006) e, segundo Grossmann & Kwiatkowski (2000), é um herbicida seletivo pertencente à Classe III, ou seja, de baixa toxicidade ao homem e aos animais; porém, na bula, o fabricante afirma que este produto pode causar danos em ambientes

aquáticos, em longo prazo. Por ser altamente solúvel em água e relativamente móvel (Zanella *et al.*, 2002), no caso de culturas de arroz irrigado, mesmo em cuidado com áreas vizinhas como recomenda o fabricante, acredita-se que o Quinclorac pode ser encontrado longe do local de aplicação, afetando não apenas as espécies da cultura selecionada.

De acordo com Marchesan *et al.* (2007), as diretrizes para qualidade da água no Brasil, não incluem as concentrações máximas permitidas para o uso deste herbicida na agricultura, representando um potencial risco ambiental.

1.3 A ECOTOXICOLOGIA E A AVALIAÇÃO DOS EFEITOS FISIOLÓGICOS DECORRENTES DA EXPOSIÇÃO A AGROTÓXICOS

1.3.1 ECOTOXICOLOGIA

De acordo com Soares (1990):

“A necessidade em monitorar o espectro dos efeitos de ações antrópicas sobre os diferentes ecossistemas levou à criação da Ecotoxicologia, ciência que estuda os efeitos de agentes químicos tóxicos em nível de indivíduo, e suas consequências na estrutura e funcionamento das populações, comunidades e ecossistemas” (Soares, 1990, p.43-52).

Tradicionalmente, análises físicas e químicas são as mais utilizadas na caracterização de resíduos líquidos, porém, por diversas vezes, as contaminações que ocorrem em ambientes aquáticos mostram-se imperceptíveis às análises químicas tradicionais. Com isso, a avaliação dos efeitos causados em organismos aquáticos, a partir da exposição a substâncias potencialmente tóxicas, como mortalidade e alterações comportamentais e fisiológicas, têm sido crescentemente considerada como mais precisa no controle de despejos que podem causar impacto, principalmente ao ambiente aquático (Lebboroni *et al.*, 2006), e podem alertar a respeito da presença de substâncias com alto potencial de devastação ambiental (Vasconcelos, 2014).

Nesse sentido, a ecotoxicologia aquática surgiu com o princípio de explicitar as contaminações ocasionadas ao ambiente aquático, através da realização de testes de toxicidade em espécies com aspectos biológicos e ecológicos bem conhecidos, que sejam sensíveis a perturbações ambientais e representativas na teia trófica, onde

qualquer alteração causada nesses indivíduos poderá desencadear uma série de respostas, capaz de afetar todos os níveis tróficos (Lebbononi *et al.*, 2006). Por meio desses testes são fornecidas informações sobre o perigo potencial dos efeitos de uma substância tóxica aos organismos, que podem incluir tanto a letalidade quanto efeitos subletais, como alterações no desenvolvimento, crescimento, reprodução, mutagênese, teratogênese, carcinogênese e desordens comportamentais (Baudo, 1987).

Os testes de toxicidade consistem, basicamente, na exposição (aguda ou crônica) de organismos a substâncias potencialmente tóxicas, visando à observação e análise das respostas destes organismos à substância testada. Na exposição aguda, os organismos entram em contato com o composto químico por um curto período de tempo, em um evento único (Adams, 1995). Nesse tipo de exposição, os efeitos observados são imediatos (Tomita & Beyruth, 2002), principalmente a letalidade, a partir da qual se determina a CL_{50} , concentração do contaminante que ocasiona a mortalidade de 50% dos organismos expostos em cada tratamento (Rand & Petrocelli, 1995). Na exposição crônica, os organismos geralmente são expostos a uma concentração menor do composto, porém, este é liberado continuamente ou com certa periodicidade, durante um período maior de tempo. Os efeitos causados por esse tipo de exposição podem se demonstrar rapidamente, como em uma exposição aguda, ou ao longo do ciclo de vida, devido à bioacumulação desses compostos (Tomita & Beyruth, 2002). Podem ser observadas alterações no crescimento, na reprodução, parâmetros fisiológicos e histológicos, além de alterações comportamentais (Vasconcelos, 2014).

1.3.2 ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS DECORRENTES DA EXPOSIÇÃO A AGROTÓXICOS

1.3.2.1 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS)

O elemento oxigênio existe na atmosfera na forma diatômica (O_2), e é necessário a organismos aeróbicos para a eficiente produção de energia a partir da cadeia transportadora de elétrons existente nas mitocôndrias de eucariontes (Halliwell & Gutteridge, 1999). Durante o metabolismo celular aeróbico, o O_2 sofre redução tetravalente, resultando na formação de água (H_2O). A enzima catalisadora dessa reação

é a citocromo oxidase. Cerca de 2% a 5% das moléculas do oxigênio metabolizado nas mitocôndrias são desviadas para outra via metabólica, e reduzidas de forma univalente (Ferreira & Matsubara, 1997; Koury & Donangelo, 2003; Schneider & Oliveira, 2004), dando origem a intermediários altamente reativos, tais como o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxila ($\cdot OH$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), os quais são genericamente conhecidos como Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) (Ferreira & Matsubara, 1997; Cuzzocrea *et al.*, 2001).

Apesar de cumprirem funções biológicas importantes, como a geração de ATP (energia), ativação de genes e participação em mecanismos de defesa durante processos de infecção (Barbosa *et al.*, 2010), as EROs possuem grande poder oxidativo, com potencial para reagir com macromoléculas biológicas. Sendo assim, um excesso de EROs potencialmente leva à inativação enzimática, peroxidação lipídica, danos no DNA e até morte celular (Winston, 1991; Peña-Llopis *et al.*, 2003; Banudevi *et al.*, 2006).

1.3.2.2 SISTEMAS ANTIOXIDANTES NÃO ENZIMÁTICOS E ENZIMÁTICOS

Para a proteção celular contra a ação danosa das EROs, os organismos possuem sistemas antioxidantes, que têm como função inibir ou reduzir os danos causados pela ação deletéria desses agentes oxidantes. Os antioxidantes são definidos como qualquer substância que, presente em menores concentrações que as do substrato oxidável, seja capaz de atrasar ou inibir a oxidação deste de maneira eficaz, podendo agir diretamente, neutralizando a ação dos radicais livres e espécies não-radicaais, ou indiretamente, participando de sistemas enzimáticos com tal capacidade (Barbosa *et al.*, 2010).

Os sistemas antioxidantes podem ser enzimáticos ou não enzimáticos. O sistema não enzimático é composto por metabólitos, como a glutaciona, ácido ascórbico, tocoferol, dentre outros. O sistema enzimático, por sua vez, é composto por diferentes enzimas, dentre as quais, a Superóxido Dismutase (SOD), a Catalase (CAT) e a Glutaciona Peroxidase (GPx) são algumas das mais importantes e melhor estudadas, e são responsáveis por neutralizar ou reparar o dano celular induzido pelas EROs (Gil-del Valle *et al.*, 1999; Moraes, 2008). Neste contexto, podem-se destacar também as enzimas de detoxificação e excreção de compostos exógenos, com importante papel na manutenção da homeostase celular, como a Glutaciona S-Transferase (Freitas *et al.*, 2008).

A Superóxido Dismutase (SOD) é uma enzima chave na detoxificação de organismos, a qual catalisa a dismutação do ânion superóxido, resultando na formação de compostos hidrocarbonados (como o peróxido de hidrogênio), os quais são potencialmente menos nocivos à célula (Onwurah & Eze, 2000). Essa reação ocorre normalmente nos sistemas fisiológicos, porém, se torna muito acelerada (cerca de 104 vezes mais rápida) em decorrência da ação da SOD.

A Catalase (CAT) é uma das mais importantes enzimas do sistema antioxidante (Matés, 2000), se localiza nos peroxissomos e possui papel fundamental na detoxificação do peróxido de hidrogênio (Zhang *et al.*, 2005). A CAT atua de forma conjunta com a GPx, que tem ação complementar à CAT na detoxificação deste agente oxidante, produzido de forma orgânica ou não (Barata *et al.*, 2005). A CAT e a SOD formam um sistema que provê a primeira linha de defesa dos organismos contra a ação das EROs (Costa *et al.*, 2007).

As Glutationa S-Transferases (GSTs) são uma família de enzimas que ocupam diferentes compartimentos celulares (citoplasmática, mitocondrial e microsomal), que estão envolvidas na detoxificação de muitos xenobióticos e ainda têm um importante papel na proteção dos tecidos que se encontram em estresse oxidativo (Masella *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005). As GSTs atuam em conjunto com a GPx no processo de metabolização de agentes eletrofílicos e peróxidos, conjugando esses agentes com a glutatona reduzida (GSH) e facilitando sua remoção (Habig & Jakoby, 1981).

1.3.2.3 ESTRESSE OXIDATIVO

Os organismos que utilizam o oxigênio no seu metabolismo possuem mecanismos naturais para a remoção das EROs e, portanto, tais subprodutos do metabolismo aeróbico não são necessariamente uma ameaça, sob condições fisiológicas. Porém, se espécies reativas são geradas excessivamente ou em locais anormais do organismo, o balanço entre a formação e a remoção desses agentes pró-oxidantes é perdido, resultando em estresse oxidativo (Yoshikawa & Naito, 2002).

Dessa forma, o estresse oxidativo é definido como um estado danoso ao organismo, que ocorre quando reações oxidantes excedem reações antioxidantes (Yoshikawa & Naito, 2002), em decorrência da geração excessiva de espécies reativas ou em detrimento da velocidade de remoção dessas pelos sistemas antioxidantes, gerando um desequilíbrio entre estes compostos (Barbosa *et al.*, 2010).

As EROs são produzidas durante a função celular normal de células aeróbicas, mas podem ser geradas em excesso como consequência do metabolismo intracelular de compostos exógenos, como os pesticidas (Ahmad *et al.*, 2000; Matés, 2000; Üner *et al.*, 2006). Adicionalmente, a produção de espécies reativas pode ocorrer a partir de outros fatores ambientais, como a exposição à radiação ultravioleta e a metais pesados (Risso-de Facerney *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2006; Monteiro *et al.*, 2006).

1.3.2.4 A LIPOPEROXIDAÇÃO COMO BIOINDICADOR DE ESTRESSE OXIDATIVO

A atividade das principais enzimas antioxidantes, a perda de integridade do DNA e, principalmente a lipoperoxidação, têm sido largamente utilizadas como bioindicadores da exposição a contaminantes, em uma variedade de espécies (Downs *et al.*, 2001).

A peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO) consiste em uma cascata de eventos bioquímicos resultante da ação das EROs sobre os lipídios das membranas celulares, os quais se caracterizam como substratos facilmente oxidáveis e amplamente sensíveis ao ataque desses agentes oxidantes (Lushchak & Bagnyukova, 2006). A peroxidação lipídica resulta na formação de hidroperóxidos lipídicos (LOOH), principalmente, o radical alquila (L[•]), alcoxila (LO[•]) e peroxila (LOO[•]), que levam à degradação fosfolipídica, injúria à membrana celular, e, em casos extremos, à morte celular (Comporti, 1985; Georgieva, 2005; Oruç & Usta, 2007).

A LPO está entre um dos melhores preditores do nível de dano sistêmico induzido pelas EROs (Saygili *et al.*, 2003; Georgieva, 2005), por ser um mecanismo molecular envolvido na toxicidade de pesticidas aos organismos (Kehrer, 1993; Kavitha & Rao, 2007).

1.4 ANFÍBIOS

Os anfíbios (Classe Amphibia ou Lissamphibia) constituem um grupo de vertebrados tetrápodos, divididos em três linhagens distintas: Gymnophiona ou Apoda (cecílias ou cobras-cegas), Urodela ou Caudata (salamandras e tritões) e Anura (sapos, rãs e pererecas), sendo esta última a ordem com maior diversidade dentro da classe Amphibia (Pough *et al.*, 2008). No mundo, são conhecidas aproximadamente 7.319

espécies de anfíbios (Frost, 2014), das quais cerca de 1026 ocorrem no Brasil (Segalla *et al.*, 2014).

O tegumento altamente permeável dos anfíbios é onde ocorre a maioria das trocas gasosas e absorção de água e, também, onde se observa a presença de glândulas de muco, de ferormônios e de veneno, estas últimas responsáveis pela defesa contra predadores (Pough *et al.*, 2008). É composto por uma epiderme externa e uma derme interna, onde se localizam as glândulas, nervos, músculos e células de pigmento (cromatóforos), com a abertura de seus respectivos dutos na superfície da epiderme. Possui importante papel nas interações ambientais, defesa (secreções, principalmente das glândulas de veneno), seleção sexual e comportamentos associados à corte (padrões de coloração e ferormônios) e locomoção (Pough *et al.*, 2004).

A maioria dos anfíbios apresenta um ciclo de vida bifásico (aquático e terrestre), sendo que durante a fase larval ocupam ambientes essencialmente aquáticos, e, durante a fase adulta, ocupam ambientes terrestres, predominantemente. Em virtude da fase aquática do ciclo de vida e, principalmente, pela alta permeabilidade do tegumento (que facilita a perda de água por evaporação, podendo levar o animal a estresse hídrico), apresentam grande dependência da água, o que resulta na ocupação preferencial de ambientes úmidos. Anfíbios que vivem em desertos ou locais com baixa umidade restringem sua atividade durante o dia – se tornando ativos somente durante a noite. Durante períodos de seca, nos quais permanecem enterrados no subsolo, realizam a absorção de água do solo ao seu redor através do tegumento, a fim de manter seu balanço hídrico (Pough *et al.*, 2004).

Em decorrência da ocupação de ambientes terrestres e aquáticos e da grande permeabilidade e exposição do tegumento, os anfíbios se caracterizam como um grupo de grande importância ecológica, participando de diversos elos da cadeia trófica, e que podem ser bioindicadores altamente sensíveis a diferentes fatores ambientais (Blaustein, 1994). Dessa forma, quaisquer alterações causadas a populações de anfíbios podem ocasionar o desequilíbrio de toda a cadeia trófica onde estão inseridos, causando danos ao ecossistema como um todo (Vasconcelos, 2014). O crescente uso de agrotóxicos na agricultura, associado ou não a outros fatores, como a perda de habitat, super exploração, radiação ultra-violeta, aquecimento global e doenças, tem sido considerado como um dos principais fatores responsáveis pelos declínios populacionais destes animais observados nas últimas décadas (Alford & Richards, 1999; Houlihan *et al.*, 2001; Relyea, 2003; Kiesecker, Blaustein & Belden, 2001).

1.4.1 PROCESSO DE METAMORFOSE E O PAPEL DO TECIDO MUSCULAR

Os girinos representam a fase larval da ordem Anura e, de uma maneira geral, são animais completamente diferentes dos adultos, tanto morfológica como ecologicamente. A maioria dos girinos são herbívoros filtradores, enquanto os adultos são carnívoros. Além disso, os adultos se locomovem pela ação conjunta dos membros anteriores e posteriores, em uma variedade de formas de locomoção (salto, natação, cursorial, dentre outras), enquanto os girinos se locomovem basicamente através da natação, a qual é possível graças à presença de uma cauda, que constitui a maior parte do comprimento total do animal (Pough *et al.*, 2008).

Desta maneira, embora muitas espécies de Anura tenham desenvolvido modos reprodutivos que suprimem a fase larval aquática, a manutenção desta fase no ciclo de vida da maioria dos anuros representa uma vantagem evolutiva, visto que os girinos podem explorar recursos que não estão disponíveis para os adultos (Pough *et al.*, 2008).

A metamorfose corresponde à transição dos girinos a adultos, e é caracterizada por drásticas transformações morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e comportamentais relacionadas às mudanças da vida aquática para a terrestre (Nakajima & Yaoita, 2003). Os girinos são classificados em estádios de desenvolvimento segundo a tabela de Gosner (1960), e em fases da metamorfose de acordo com a tabela de Etkin (1968). A tabela de Gosner se baseia em alterações morfológicas que ocorrem nos girinos no decorrer do desenvolvimento, e é dividida em 46 estádios de desenvolvimento, sendo os estádios 42 ao 46, correspondentes à metamorfose. A tabela de Etkin (1968) define o desenvolvimento dos girinos em fases de crescimentos dependentes dos hormônios da tireoide, sendo elas: pré-metamorfose, pró-metamorfose e clímax, ou metamorfose propriamente dita, a qual é subdividida em três fases: inicial, média e tardia.

Durante a metamorfose, ocorrem três grandes alterações: regressão de estruturas utilizadas apenas pelos girinos, transformações de estruturas larvais em estruturas úteis nos adultos e desenvolvimento de estruturas e funções que são essenciais apenas nos adultos (McDiarmid & Altig, 1999). Um dos eventos que mais têm despertado o interesse de vários pesquisadores durante a metamorfose é a absorção da cauda (através da morte celular dos tecidos) visto que esta corresponde a uma grande parte do corpo dos girinos (Gonçalves, 2013). No decorrer da metamorfose, a cauda pode ser uma importante fonte de energia, visto que ocorre uma redução no consumo de alimento em

girinos que estão em processo de transformação a indivíduos adultos (Albinati, 1999; Santos *et al.*, 2010).

O tecido muscular (cauda) dos girinos possui, portanto, papel crucial nessa fase da vida, auxiliando na nutrição durante a metamorfose e sendo diretamente responsável pela locomoção destes animais. Desta forma, alterações neste tecido, tais como deformidades decorrentes da exposição a agrotóxicos (Dornelles, 2013), poderiam ter implicações diretas no desenvolvimento (visto que prejudicaria a metamorfose) e nas chances de sobrevivência destes animais de uma forma geral, pois, por prejudicar a locomoção, prejudicariam o padrão de exploração ambiental e a aquisição de alimentos.

1.4.2 FAMÍLIA RANIDAE

A família Ranidae engloba as rãs verdadeiras. Os indivíduos pertencentes a esta família apresentam distribuição natural cosmopolita, com exceção ao Sul da América do Sul e à maioria da Austrália. A maioria dos ranídeos são indivíduos de médio a grande porte (até 180mm). A reprodução, normalmente, ocorre em lagos ou lagoas e os ovos são depositados em ninhos de espuma ou como filmes superficiais nos corpos d'água. A metamorfose, normalmente, leva vários meses, podendo levar até dois anos na rã-touro (Vitt & Caldwell, 2009).

1.4.2.1 *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802)

A espécie *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802), conhecida pelo nome popular rã-touro (Figura 1.A), é uma espécie de ranídeo originária da América do Norte, exótica no Brasil, tendo sido introduzida no país na década de 30, para cultivo comercial, em razão da grande demanda de consumo de sua carne na culinária, além de utilização da pele em subprodutos, como o couro (Culley, 1981). Possui porte avantajado, podendo atingir, quando adulta, medida rostro-cloacal equivalente a cerca de 180mm.

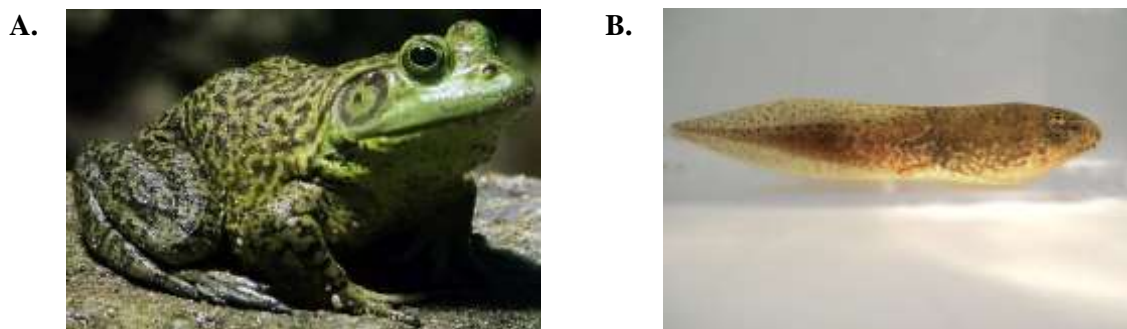


Figura 1. **A.** Indivíduo adulto e **B.** Fase larval (girino) de *Lithobates catesbeianus* (rã-touro).
Fonte: Google Imagens.

A rã-touro normalmente ocupa corpos d'água permanentes, onde se alimenta e se reproduz em taxas elevadas, apresentando uma temporada reprodutiva anual prolongada, sendo que os machos apresentam comportamentos territorialistas e agressivos durante o período reprodutivo (Ryan, 1980). Possui hábitos alimentares generalistas e predadores, tanto durante a fase larval (Figura 1.B), quanto na adulta (Bury & Whelan, 2006; Boelter & Cechin, 2007). Fatores como a grande plasticidade alimentar, bem como redução do tempo de metamorfose em condições adversas (Cohen & Howard, 1958; Bury & Whelan, 2006) garantem alta flexibilidade adaptativa a *L. catesbeianus*, garantindo seu sucesso de desenvolvimento em diversas regiões do mundo.

L. catesbeianus tem sido identificada como uma espécie com alto potencial na avaliação de efeitos deletérios de águas contaminadas. Vários autores (Boone *et al.*, 2007; Bueno-Guimarães *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*, 2004; Fordham *et al.*, 2001; Gervasi *et al.*, 2013; Lombardi *et al.*, 2002; Ossana *et al.*, 2013, Paetow *et al.*, 2013) propõem a utilização de girinos de rã-touro em experimentos de toxicidade e poluição aquática pela sua ampla ocorrência, facilidade de criação e aquisição, e por tratar-se de um animal importante na cadeia alimentar (Ferreira *et al.*, 2001). Além disso, os girinos dessa espécie possuem um longo período de desenvolvimento (com a duração de até dois anos), o que aumenta a probabilidade de exposição a contaminantes, principalmente em casos de exposições múltiplas. Espécies com período larval mais curto são mais propícias a evitar exposições múltiplas nos ambientes aquáticos e podem não ser organismos ideais para experimentos ecotoxicológicos (Boone *et al.*, 2001).

2 JUSTIFICATIVA

O aumento da demanda por produtos agrícolas intensificou a utilização de agrotóxicos, a fim de se obter uma produção em larga escala em menor período de tempo, fazendo com que a presença destes poluentes em corpos hídricos fosse cada vez mais frequente. Com isso, houve um aumento significativo dos riscos ambientais, visto que esses compostos podem ser extremamente tóxicos a todos os organismos expostos a tais substâncias (Vasconcelos, 2014). Tendo em vista o grande número de trabalhos científicos (Fordham *et al.*, 2001; Hayes *et al.*, 2003; Relyea, 2004; Sparling & Fellers, 2009; Storrs & Kiesecker, 2004) que têm demonstrado que o uso indiscriminado de pesticidas é um dos principais fatores relacionados a declínios de populações de anfíbios ao redor do mundo, o presente estudo torna-se justificável, visto que ainda é pequeno o número de trabalhos realizados neste grupo taxonômico, em comparação com outros grupos de vertebrados.

Por se tratar de uma espécie exótica e com grande plasticidade adaptativa (Cunha & Delariva, 2009), *Lithobates catesbeianus* tenderia a apresentar maior proteção contra alterações causadas por xenobióticos, em comparação com espécies nativas, possivelmente mais suscetíveis à ação destes poluentes. Além da verificação deste aspecto, a utilização dessa espécie no presente estudo se justifica por sua ampla ocorrência, facilidade de criação e aquisição, grande importância na cadeia trófica (Ferreira *et al.*, 2001) e longo período larval, o que aumenta a probabilidade de exposição a contaminantes, principalmente em experimentos de exposições múltiplas (Boone *et al.*, 2001).

A análise de possíveis alterações provocadas ao tecido muscular de girinos de rã-touro a partir da exposição ao herbicida Quinclorac se justifica pelo papel crucial da cauda para os girinos (nutrição durante a metamorfose, locomoção e exploração ambiental), sendo que alterações neste tecido implicariam prejuízo no ciclo de vida e na sobrevivência destes animais, de uma forma geral.

Por fim, o grande potencial agroindustrial do Rio Grande do Sul, com cultivo de diversas frutas, além de extensas áreas de plantação de grãos como soja e arroz, cria a necessidade de ampliar o número de marcadores bioquímicos e funcionais frente ao uso de tóxicos como o Quinclorac, amplamente utilizado nas lavouras orizícolas.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar os possíveis efeitos do herbicida Quinclorac sobre o tecido muscular (caudal) de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar possíveis alterações nas atividades das enzimas antioxidantes Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione S-Transferase (GST) a partir de exposição crônica a quatro diferentes concentrações do herbicida Quinclorac;
- Determinar possíveis danos oxidativos em lipídios (lipoperoxidação) de músculo caudal de girinos de *L. catesbeianus*, através da análise da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS);
- Relacionar estas respostas com a manutenção da homeostase e da sobrevivência dos animais, possibilitando uma melhor compreensão da plasticidade e da capacidade fisiológica desta espécie frente a pesticidas;
- Gerar subsídios que permitam a comparação com espécies nativas, possivelmente mais suscetíveis a alterações provocadas por xenobióticos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DOS ESPÉCIMES DE *Lithobates catesbeianus*

Foram adquiridos 79 girinos de *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) no ranário RanaSul (Imbé, RS, Brasil), sendo todos os girinos com 4 meses de vida, no estágio 26 conforme tabela de Gosner (1960), com ausência de membros, conforme padronizado por Dornelles (2013) e Dornelles & Oliveira (2014).

Uma vez que houve manipulação e sacrifício dos girinos, o projeto foi submetido à análise do Comitê de Ética para Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (CEUA-PUCRS), não sendo necessária a solicitação de licença do ICMBio por se tratar de animais oriundos de um ranário. Após análise do CEUA, foi concedida a autorização para a realização do presente projeto de pesquisa, através do Ofício nº 79/2014, sob registro do Comitê de Ética para Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (CEUA - PUCRS) nº 14/00384.

Os animais foram transportados em sacos plásticos aerados até o Laboratório de Fisiologia da Conservação da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), onde foram realizados os procedimentos experimentais.

4.2 ACLIMATAÇÃO E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Na chegada ao Laboratório de Fisiologia da Conservação da PUCRS, todos os girinos foram pesados em balança eletrônica (Gibertini R42S-B) e medidos com paquímetro (precisão de 0,01 cm).

Em seguida, os animais foram colocados em aquários de 60 litros para a realização da aclimatação, durante um período de 7 dias, com aeração constante; pH 7,4; salinidade de 0 psu; temperatura e fotoperíodo naturais e alimentação *ad libitum* uma vez ao dia com a mesma ração utilizada no ranário. Os parâmetros de qualidade da água (amônia e pH) dos aquários foram monitorados diariamente durante todo o período experimental (14 dias), utilizando kits comerciais para aquários da marca Labcon®.

Findo o período de aclimatação, 12 animais (Controle 7 dias) foram eutanasiados por decapitação após atordoamento em banho de gelo, pesados, medidos e

rapidamente foi retirado o tecido muscular (caudal), o qual foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido para realização *a posteriori* das análises bioquímicas. As amostras foram mantidas congeladas em *freezer* a -20°C .

O restante dos animais, com exceção do Controle 14 dias, foi exposto a quatro diferentes concentrações de formulação comercial contendo Quinclorac (Facet[®], 500g/Kg, Basf), conforme a Tabela 1, sendo que as concentrações utilizadas foram baseadas em valores encontrados na água em ambiente natural, como citado por diferentes autores (Lambropoulou *et al.*, 2002; Marchesan *et al.*, 2007; Paulino *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2009; Dornelles & Oliveira, 2014).

Tabela 1 - Concentrações utilizadas para os procedimentos experimentais com *L. catesbeianus*.

Concentrações	Quinclorac (Facet [®])
Conc. [1]	0,05 $\mu\text{g/L}$
Conc. [2]	0,10 $\mu\text{g/L}$
Conc. [3]	0,20 $\mu\text{g/L}$
Conc. [4]	0,40 $\mu\text{g/L}$

Os animais foram dispostos em diferentes aquários para a exposição às concentrações previstas conforme a Tabela 2. Findo o período de sete dias de exposição, totalizando 14 dias em laboratório, todos os animais foram eutanasiados e passaram pelos mesmos processos já descritos anteriormente.

Tabela 2. Organização do número de animais nos aquários, tempo de experimento por procedimento experimental e concentração de herbicida utilizada em cada grupo.

	Aquário	Nº indivíduos	Tempo de aclimação	Tempo de exposição
Controles	7 dias	12	7 dias	-
	14 dias	12	7 dias ¹	-
Herbicida	Concentração 1	16	7 dias	7 dias
	Concentração 2	13	7 dias	7 dias
	Concentração 3	13	7 dias	7 dias
	Concentração 4	13	7 dias	7 dias
Total de animais		79		

4.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

4.3.1 PREPARAÇÃO DO HOMOGENEIZADO

Para a realização das análises bioquímicas pretendidas, o tecido muscular (cauda) de cada animal passou por um processo de homogeneização. Para cada grama de tecido foi acrescentada solução de tampão fosfato (20mM) contendo 100mM de fluoreto de fenil metil sulfonila (PMSF) um inibidor de proteases, em uma proporção de 6mL de solução para cada grama de tecido (6 vezes de diluição). Em seguida, cada tecido foi homogeneizado em Ultra-Turrax (IKA-WERK) à temperatura de 4°C. Este homogeneizado foi centrifugado em centrífuga refrigerada (SORVALL RC-5B Refrigerated Superseed Centrifuge) por 10 minutos a 3000 rpm. O precipitado foi desprezado e o sobrenadante retirado e congelado em *freezer* para as dosagens posteriores (Llesuy *et al.*, 1985).

¹ O Controle 14 dias foi mantido até o final do experimento sem interação com o herbicida, sendo que o período de aclimação deste grupo (7 dias) foi o mesmo ao qual os outros animais foram submetidos. Portanto, apesar de não ter sido exposto ao herbicida durante o período de exposição, não se pode definir este período como “aclimação”.

4.3.2 DOSAGENS BIOQUÍMICAS

4.3.2.1 PROTEÍNAS

Para a determinação das atividades das enzimas antioxidantes e dos níveis de lipoperoxidação, a dosagem de proteínas se faz necessária, sendo que os resultados obtidos nesta quantificação não foram apresentados no presente trabalho.

As concentrações de proteínas no homogeneizado do músculo dos girinos foram determinadas utilizando kit comercial da Labtest. O princípio deste método é a reação de íons cobre (Cu^{+2}) com as ligações peptídicas das proteínas séricas, em um meio de reação alcalino (Reagente de Biureto), formando um líquido de coloração púrpura, com absorvância máxima em 545 nm (Lowry *et al.*, 1951). A concentração de proteínas totais é expressa em mg de proteína/g de tecido.

4.3.2.2 ENZIMAS ANTIOXIDANTES

4.3.2.2.1 GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST)

A atividade da enzima Glutationa S-Transferase (GST) foi medida de acordo com o método descrito por Boyland & Chasseaud (1969), através da quantificação da conjugação do 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) com a glutaciona reduzida (GSH), catalisada pela GST, produzindo um composto que pode ser detectado em 340 nm.

A atividade da GST se dá de acordo com o aumento nos valores da absorvância, e é proporcional à velocidade de produção do composto conjugado (Habig & Jakoby, 1981). Desta atividade é descontada a reação basal, obtida pela leitura da reação entre a GSH do ensaio e o CDBN, sem a presença da amostra. O ensaio enzimático foi realizado em tampão fosfato de potássio (KPi) 100 mM, EDTA 1 mM, pH 7,0 contendo 1 mM GSH e 1 mM de CDBN. A atividade da enzima foi expressa como mmoles de CDBN.mg de proteína⁻¹.min⁻¹.

4.3.2.2.2 SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

A técnica para determinação da atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD) está baseada na inibição da reação do radical superóxido com a adrenalina

através da quantificação em unidades relativas, sendo que uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima que inibe em 50% a velocidade de redução do detector (adrenalina). A oxidação da adrenalina leva à formação de um produto colorido, o adrenocromo, detectado espectrofotometricamente a 480nm. O meio de reação empregado consiste de glicina-NaOH (50mM, pH 10,5) e adrenalina (1mM) (Boveris & Cadenas, 1982). A quantificação da atividade da SOD foi expressa em unidades de SOD/mg de proteína.

4.3.2.2.3 CATALASE (CAT)

Para a determinação da atividade da enzima Catalase (CAT), foi necessária a ativação prévia da enzima, conforme método descrito por Aebi (1984). A ativação da CAT foi realizada adicionando-se 5µl de etanol a um eppendorf com 50 µl de amostra e, após banho de gelo durante 30 minutos, adicionou-se 5 µl de Triton X-100, um detergente não iônico (Endemann *et al.*, 2002; Galbraith *et al.*, 1983), a cada um dos eppendorfs.

Após estes procedimentos, as amostras foram lidas em cubeta de quartzo, onde foram adicionados 955µl de tampão fosfato e 10µl de homogeneizado do tecido e, por fim, 35µl de H₂O₂ (concentração final de 50mM). A leitura no espectrofotômetro foi realizada com absorvância de 240nm.

Para a expressão dos resultados, foram quantificadas as proteínas da amostra (Boveris & Chance, 1973). Os resultados foram expressos em pmoles de CAT.mg de proteína⁻¹.min⁻¹.

4.3.2.3 LIPOPEROXIDAÇÃO

Os níveis de lipoperoxidação foram determinados pela técnica de TBA-RS (*TBA reactive substances*, ou seja, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), que consiste em aquecer o material biológico a ser testado, sob condições ácidas, na presença de ácido tiobarbitúrico, que reage com o malondialdeído (MDA) (um dos produtos finais da lipoperoxidação), resultando na formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), que se caracteriza como um produto de cor rósea, com absorvância máxima em 535 nm (Buege & Aust, 1978).

Adicionou-se, em um eppendorf de fundo redondo, 300µl de ácido tricloroacético (TCA) a 10%, 100µl do homogeneizado, 200µl de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,67% e 100µl de água destilada, nesta ordem de adição, totalizando o volume de 700µl. Em seguida, as amostras foram incubadas a 100°C por 15 minutos e, logo depois, resfriadas em banho de gelo durante 30 minutos. Após, acrescentou-se 600µl de butanol, agitou-se brevemente as amostras em agitador (Biomatic) e estas foram centrifugadas em centrífuga refrigerada (SORVALL RC-5B Refrigerated Superseed Centrifuge) durante 10 minutos a 3000 rpm.

Foi realizada a leitura, em cubeta de quartzo, do volume total de 400µl de sobrenadante, em espectrofotômetro (CARY 3E - UV-Visible Spectrophotometer VARIAN), utilizando-se a absorvância de 535nm. A concentração de TBARS no homogeneizado foi expressa em nmoles de TBARS/mg de proteína.

4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média. Todos os resultados foram analisados quanto à normalidade, pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e homogeneidade, pelo teste de Levene.

Quando os resultados obedeceram a Hipótese nula, possuindo uma distribuição normal (índice de significância maior que 0,05 pelo teste de Kolmogorov-Smirnov), foi aplicado o teste de análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do teste de comparação de Bonferroni ($p > 0,05$ pelo teste de Levene) ou LSD e Games-Howel ($p < 0,05$ pelo teste de Levene). Caso os resultados obedeam a Hipótese alternativa (índice de significância menor que 0,05 pelo teste de Kolmogorov-Smirnov), assume-se que a distribuição não é normal e aplica-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste complementar de Dunn, buscando onde houve diferenças significantes.

Foi adotado o nível de significância de 5% ($p = 0,05$) para todas as análises, que foram realizadas com o programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) para Windows, da IBM[®], versão 20 (Zar, 1996).

5 RESULTADOS

5.1 ENZIMAS ANTIOXIDANTES

5.1.1 GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST)

Foi observado um decréscimo dos níveis de atividade da enzima GST no tecido muscular dos girinos expostos às diferentes concentrações do herbicida Quinclorac, em comparação ao Controle 7 dias (representado no gráfico como Cont. 7 dias).

Por outro lado, não foi observada diferença significativa entre os níveis de atividade da GST entre o Controle 14 dias (representado no gráfico como Cont. 14 dias) e os grupos expostos ao herbicida, apesar de estes últimos apresentarem níveis reduzidos de GST em comparação a este controle. A atividade da GST não diferiu significativamente entre os grupos de exposição (Figura 2).

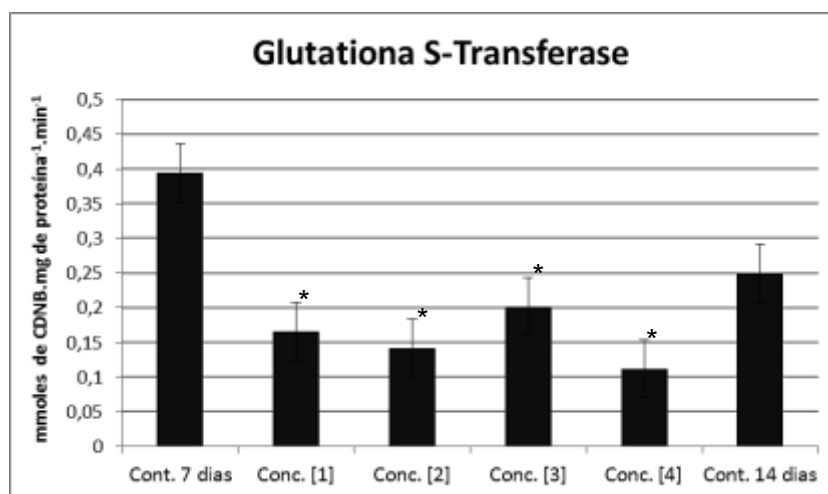


Figura 2. Níveis totais de atividade da enzima Glutaciona S-Transferase (GST) no tecido muscular de girinos de *Lithobates catesbeianus* submetidos às diferentes concentrações de Quinclorac (Facet®). Os resultados são representados como média \pm erro padrão e expressos como mmoles de CDNB.mg de proteína⁻¹.min⁻¹. Asteriscos (*) representam diferença significativa em relação ao Cont. 7 dias.

5.1.2 SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

Os níveis de atividade da enzima SOD apresentaram-se significativamente reduzidos nos grupos expostos às Concentrações 1, 2 e 4 do herbicida Quinclorac, em relação ao Controle 7 dias; enquanto o Controle 14 dias diferiu significativamente somente em relação à Concentração 2 do herbicida.

A Concentração 3 não apresentou diferença significativa em relação aos Controles 7 e 14 dias, porém, esta concentração diferiu significativamente em relação aos níveis de SOD das outras concentrações testadas (Figura 3).

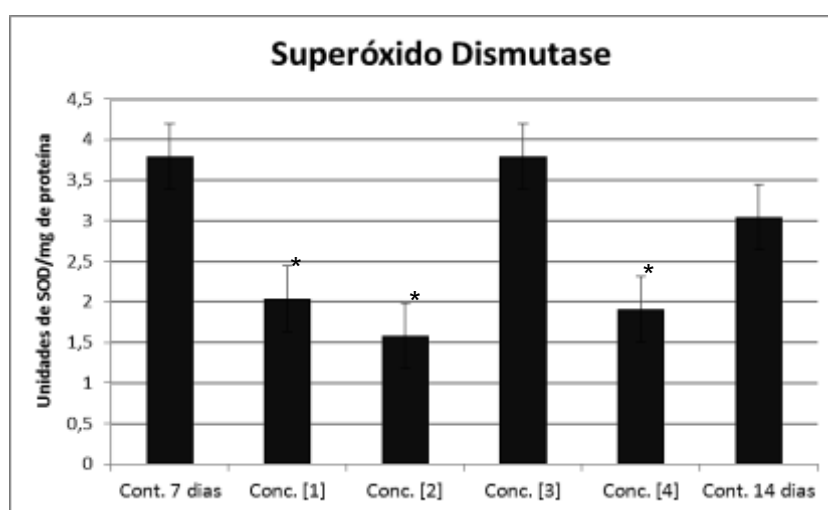


Figura 3. Níveis totais de atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD) no tecido muscular de girinos de *Lithobates catesbeianus* submetidos às diferentes concentrações de Quinclorac (Facet®). Os resultados são representados como média \pm erro padrão e expressos como Unidades de SOD/mg de proteína. Asteriscos (*) representam diferença significativa em relação ao Cont. 7 dias.

5.1.3 CATALASE (CAT)

Os níveis de atividade da enzima CAT não apresentaram diferenças significativas entre os Controles 7 e 14 dias e os grupos expostos às diferentes concentrações do herbicida, bem como estes não diferiram significativamente entre si.

Apesar do aumento dos níveis de CAT na Concentração 3 e da redução desta enzima nos grupos expostos ao herbicida Quinclorac, tais alterações não foram significativas (Figura 4).

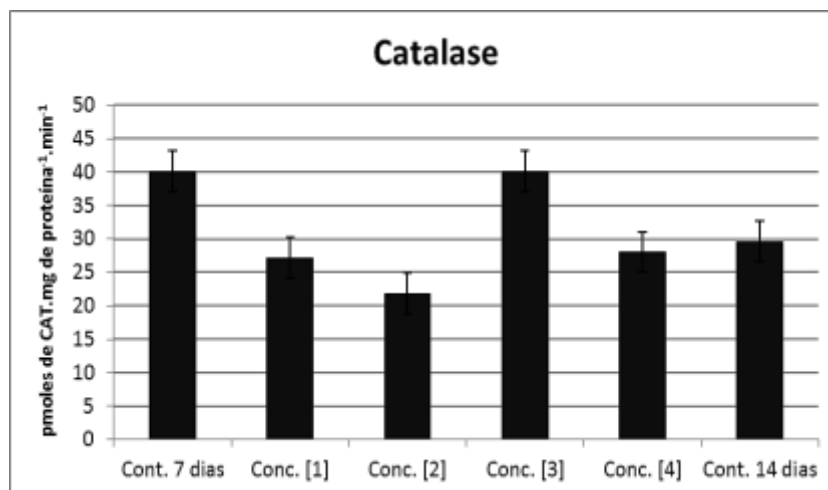


Figura 4. Níveis totais de atividade da enzima Catalase (CAT) no tecido muscular de girinos de *Lithobates catesbeianus* submetidos às diferentes concentrações de Quinclorac (Facet[®]). Os resultados são representados como média \pm erro padrão e expressos como pmoles de CAT.mg de proteína⁻¹.min⁻¹. Asteriscos (*) representam diferença significativa em relação ao Cont. 7 dias.

5.2 LIPOPEROXIDAÇÃO (TBARS)

Os níveis de lipoperoxidação do tecido muscular dos girinos de rã-touro, quantificados através dos níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), apresentaram um decréscimo significativo nos grupos expostos às Concentrações 2 e 4 do herbicida Quinclorac, em relação aos Controles 7 e 14 dias.

As Concentrações 1 e 3 de exposição ao herbicida apresentaram decréscimo dos níveis de lipoperoxidação, em relação aos Controles, porém, esta redução não foi significativa (Figura 5).

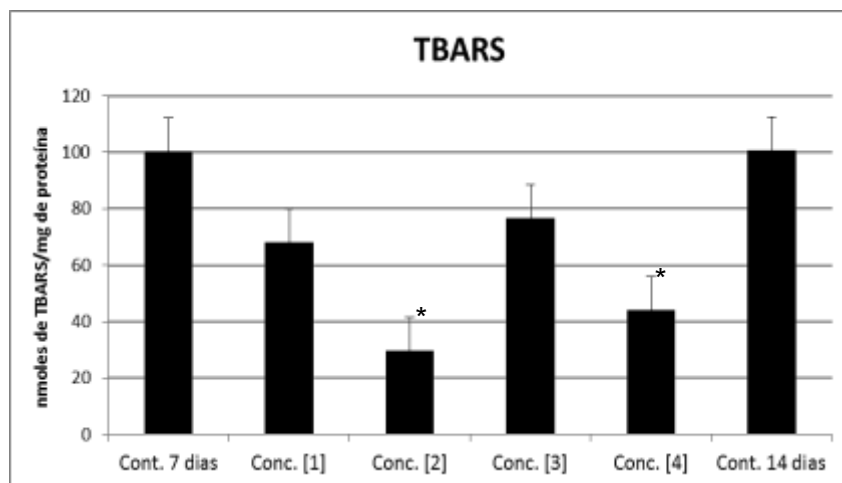


Figura 5. Níveis de lipoperoxidação no tecido muscular de girinos de *Lithobates catesbeianus* submetidos às diferentes concentrações de Quinclorac (Facet[®]). Os resultados são representados como média \pm erro padrão e expressos como nmoles de TBARS/mg de proteína. Asteriscos (*) representam diferença significativa em relação ao Cont. 7 dias.

6 DISCUSSÃO

Os anfíbios constituem, possivelmente, o grupo de vertebrados mais ameaçado do mundo (Houlihan *et al.*, 2001; Wake & Vredenburg, 2008), sendo que anfíbios que habitam áreas próximas a lavouras são diretamente expostos a pesticidas, principalmente durante sua fase larval aquática (girinos) (Johansson *et al.*, 2006), resultando em alterações no desenvolvimento, na reprodução e na sobrevivência desses animais (Blaustein & Johnson, 2003). Apesar disso, ainda são escassos os estudos sobre o estresse oxidativo gerado em anfíbios que habitam áreas agrícolas com uso de agrotóxicos, embora haja uma grande quantidade e diversidade de anuros que habitam esses locais (Modesto, 2009).

Após sete dias de exposição à formulação comercial de Quinclorac (Facet[®], 500g/Kg, Basf), todos os girinos estavam vivos e pareciam saudáveis, sugerindo que estes animais foram relativamente tolerantes às baixas concentrações de herbicida utilizadas no presente estudo. *Lithobates catesbeianus* congrega uma série de características que tenderiam a fornecer maior proteção contra alterações provocadas por xenobióticos, tais como: é uma espécie exótica de porte avantajado, podendo atingir 50 centímetros de comprimento do focinho à região sacra e pesando cerca de 600 gramas aos dois anos de idade (os girinos utilizados no presente estudo apresentaram comprimento, em média, igual a 6 cm e peso médio de 3 gramas); crescimento corpóreo ao longo de quase todo período de vida; reprodução em taxas elevadas; apresenta uma temporada reprodutiva anual prolongada; tem hábitos alimentares generalistas e alta flexibilidade adaptativa (Vieira, 1993; Cunha & Delariva, 2009).

Espécies nativas normalmente apresentam porte e peso menores (tanto os indivíduos adultos quanto os girinos), além de maior sensibilidade a alterações ambientais, em comparação à rã-touro. Tais diferenças poderiam explicar a resistência observada nos girinos de rã-touro utilizados no presente estudo, sendo que, possivelmente, a resposta de girinos de espécies nativas seria diversa a esta. Porém, outros estudos são necessários para confirmar tal hipótese.

A exposição a pesticidas pode ocasionar diversas alterações a nível tecidual e molecular em indivíduos expostos a tais substâncias (Berti *et al.*, 2009; Poleza *et al.*, 2008), sendo as alterações em marcadores bioquímicos normalmente os primeiros sinais a serem detectados (Van Der Oost *et al.*, 2003).

A Glutathione S-Transferase (GST) é considerada uma importante enzima de desintoxicação, por metabolizar grande variedade de compostos xenobióticos orgânicos, por meio da conjugação destes com a glutathione reduzida (GSH), formando substâncias de baixa toxicidade (Viléla, 2008). Os resultados encontrados no presente estudo apontaram uma redução geral dos níveis de atividade da GST no músculo dos girinos expostos às diferentes concentrações do herbicida Quinclorac, em comparação aos controles. Modesto (2009) e Viléla (2008) também observaram uma redução da atividade da GST no tecido hepático do peixe *Prochilodus lineatus* após 24 horas de exposição ao herbicida Roundup® e exposição a chumbo, respectivamente. Adicionalmente, Lajmanovich *et al.* (2011) também observaram uma inibição da GST em espécimes de *Rhinella arenarum* (sapo-da-areia) expostos a formulações comerciais do herbicida Glifosato, sendo esta resposta, provavelmente, relacionada a esgotamento enzimático decorrente de estresse oxidativo e citotoxicidade a partir da exposição ao xenobiótico. Tais resultados, bem como os obtidos no presente estudo, evidenciam uma baixa atividade (possível inibição) da GST, possivelmente promovida pela baixa disponibilidade do substrato GSH, decorrente da exposição ao herbicida. Durante o processo de detoxificação de xenobióticos, o GSH se associa com os agentes pró-oxidantes a fim de facilitar sua remoção do organismo; com isso, ocorre uma redução do GSH disponível para utilização como substrato de ação da GST no processo de detoxificação.

O sistema antioxidante enzimático é o primeiro sistema acionado pelos organismos para evitar ou conter danos morfofisiológicos ocasionados por um excesso de espécies reativas de oxigênio (EROs), decorrente da exposição a xenobióticos. A atividade das enzimas antioxidantes pode ser aumentada ou inibida a partir da exposição a esses poluentes, dependendo da intensidade e da duração do estresse, das condições de cultivo e da suscetibilidade das diferentes espécies expostas a essas substâncias (Oruç & Usta, 2007).

A ação conjunta das enzimas Superóxido Dismutase (SOD) e Catalase (CAT) constitui a primeira linha de defesa contra a toxicidade dos derivados reativos do oxigênio (Pandey *et al.*, 2003), e é um sistema que pode ser acionado simultaneamente à ação da enzima GST, que, normalmente, é a primeira a agir no processo de detoxificação de poluentes, como os pesticidas.

Os resultados encontrados no presente estudo apontam uma redução nos níveis de atividade do sistema SOD/CAT nos grupos expostos às diferentes concentrações do

herbicida Quinclorac, em relação aos grupos controle, evidenciando uma situação de inibição enzimática no tecido muscular dos girinos de *L. catesbeianus*.

Resultado semelhante foi observado por Jones *et al.* (2010), em girinos de rã-touro expostos a diferentes concentrações de Paraquat. No tecido muscular, estes autores observaram uma redução na atividade da SOD e manutenção da atividade da CAT, em associação ao aumento expressivo da atividade da glutathione redutase no tecido muscular dos girinos. A glutathione redutase é a enzima que reduz a glutathione dissulfeto (GSSG) para a forma sulfidril através da oxidação do NADPH, com a GSH atuando como um importante antioxidante celular. Já no tecido hepático, Jones *et al.* (2010) verificaram um incremento de todo o sistema antioxidante enzimático, com aumento da atividade da glutathione redutase, das peroxidases e da SOD, aliado à manutenção dos níveis de CAT. Os resultados obtidos por estes autores, em associação aos encontrados no presente estudo, sugerem que o fígado atua como o principal órgão responsável pela metabolização de xenobióticos nos girinos e, portanto, é o mais afetado (resposta enzimática mais evidente), sugerindo uma responsividade seletiva entre os diferentes tecidos.

A peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO) é o resultado da atuação das EROs sobre as membranas biológicas, ricas em ácidos graxos poliinsaturados (Oruç & Usta, 2007), que, dentre os lipídios, são os mais sensíveis ao ataque das EROs (Lushchak & Bagnyukova, 2006). A LPO causa sérias consequências nos sistemas biológicos, como dano tecidual, e, conseqüentemente, disfunção e morte celular (Halliwell & Gutteridge, 1999).

No presente estudo, se observou uma redução dos níveis de TBARS no tecido muscular dos girinos de rã-touro, nos grupos expostos ao herbicida Quinclorac, em comparação aos grupos controle. Tal resultado está de acordo com o encontrado por Menezes *et al.* (2007), que também verificaram diminuição dos níveis de TBARS em cérebro, fígado e músculo de piavas (*Leporinus obtusidens*) expostas aos herbicidas Quinclorac e Metsulfuron-Methyl, utilizados em lavouras de arroz irrigado. Por outro lado, este perfil de resposta da LPO difere daquele encontrado por Dornelles & Oliveira (2014), que observaram um incremento dose-dependente dos níveis de TBARS no músculo de girinos de rã-touro expostos às mesmas concentrações de Quinclorac utilizadas neste trabalho; contudo, estes autores aclimataram os girinos com fotoperíodo (12h de luz:12h de escuro) e temperatura (22±2°C) controlados, além de o cultivo ter ocorrido nos meses de inverno. No presente estudo, a aclimação foi realizada com

fotoperíodo e temperatura naturais, nos meses do outono, sendo que as diferenças nas condições de aclimação, possivelmente, explicam os diferentes resultados de lipoperoxidação obtidos neste estudo, em relação àqueles observados por Dornelles & Oliveira (2014).

A redução nos níveis de TBARS observada no presente trabalho pode ser decorrente da adaptação do tecido muscular dos girinos frente à exposição ao herbicida, bem como a ativação de sistemas antioxidantes não enzimáticos, compensando ou contendo o estresse oxidativo e lipoperoxidação induzidos por este poluente. Adicionalmente, tal resultado pode evidenciar que o tempo de cultivo (total de 14 dias) e as baixas concentrações utilizadas não induzem a aumento nos níveis de lipoperoxidação do tecido muscular de *L. catesbeianus*.

Além disso, sugere-se uma alta capacidade antioxidante enzimática constitutiva no tecido muscular dos girinos de rã-touro, o que impediria o dano oxidativo ocasionado a este tecido decorrente de produção excessiva de EROs, desencadeada pela exposição ao herbicida. Porém, são necessários outros estudos com diferentes tecidos destes animais, sobretudo o tecido hepático, para confirmar tal hipótese. Estão sendo desenvolvidos, no Laboratório de Fisiologia da Conservação, da PUCRS, estudos com o fígado de girinos de rã-touro expostos ao Quinclorac, a fim de avaliar o papel deste órgão no balanço oxidativo destes animais.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo permitem sugerir que as concentrações de Quinclorac aos quais os girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) foram expostos não induziram à mortalidade ou a um aumento das defesas antioxidantes enzimáticas (enzimas Glutathione S-Transferase, Superóxido Dismutase e Catalase), sugerindo uma inibição enzimática. Contudo, tal inibição não resultou em dano oxidativo via peroxidação lipídica do tecido muscular dos girinos, visto que os níveis de TBARS também se mostraram reduzidos nos grupos expostos ao herbicida, em comparação aos controles.

Esses resultados sugerem uma adaptação fisiológica do tecido muscular dos girinos frente ao agente estressor e/ou a ativação de sistemas antioxidantes não enzimáticos ou, ainda, a ativação de outras enzimas antioxidantes, como a glutathione peroxidase. Em conjunto, estes fatores estariam sendo utilizados para neutralizar a ação de agentes pró-oxidantes produzidos a partir da exposição ao agroquímico. Além disso, possivelmente, o fígado está agindo como centro detoxificador destes animais, neutralizando de forma eficiente as concentrações testadas deste xenobiótico, e, portanto, a resposta no tecido muscular não se torna tão evidente.

Por fim, outros estudos devem ser desenvolvidos a fim de elucidar o papel de outros órgãos no processo de detoxificação, além de avaliar como esta espécie reagiria frente a maiores concentrações deste herbicida; bem como a resposta de outras espécies, sobretudo espécies nativas, normalmente mais suscetíveis à ação de xenobióticos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, W. J. **Aquatic Toxicology Testing Methods**. In: HOFFMAN, D. J. *et al.* Handbook of ecotoxicology. Boca Raton, Lewis Publishers. Cap. 13, p. 25-46, 1995.
- AHMAD, I.; AHMADA, I.; HAMIDB, T.; *et al.* **Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure**. Biochim Biophys Acta 1519:37–48. 2000.
- ALBINATI, R. C. B. Avanço na nutrição de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*, Shaw 1802). In: **Encontro Nacional de Ranicultura**, 1., 1999, São Miguel do Iguaçu. Anais. São Miguel do Iguaçu: ABETRA, p. 13-31. 1999.
- ALFORD, R. A. & RICHARDS, S. J. **Global amphibian declines: a problem in applied ecology**. Annual Review of Ecology and Systematics. 30:133–165. 1999.
- BAIRD, C. **Chemistry in your life**. 2. ed. New York: W. H. Free-man. 2006.
- BANUDEVI, S.; KRISHNAMOORTHY, G.; VENKATATAMAN, P.; VIGNESH, C.; ARULDHAS, M. M.; ARUNAKARAN, J. **Role of a-tocopherol on antioxidant status in liver, lung and kidney of PCB exposed male albino rats**. Food Chem Toxicol. 44:2040–2046. 2006.
- BARATA, C.; VARO, I.; NAVARRO, J.C.; ARUN, S.; PORTE, C. **Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds**. Comp Biochem Physiol C, v. 140, p. 175-186, 2005.
- BARBOSA, K. B. F; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; DE PAULA, S. O. MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. **Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios**. Rev. Nutr., Campinas, 23(4):629-643, 2010.
- BAUDO, R. **Ecotoxicological testing with *Daphnia***. Instituto Italiano de Idrobiologia, v. 45, p. 461-482, 1987.
- BERGHAUS, R.; WUERZER, B. Uptake, translocation and metabolism of quinclorac (BAS 514H) in rice and barn yard grass. In: **12th Asian Pacific Weed Science Society Conference**, p 133. 1989.
- BERTI, A.P., DÜSMAN, E., SOARES, L. C., GRASSI, L. E. A. **Efeitos da contaminação do ambiente aquático por óleos e agrotóxicos**. Sabios Rev. Saúde Biol. 4:45–51. 2009.
- BLAUSTEIN, A. R. **Chicken Little or Nero's fiddle? A perspective on declining amphibian populations**. Herpetologica. 50:85-97. 1994.
- BLAUSTEIN, A. R. & JOHNSON, P. T. J. **The complexity of deformed amphibians**. Front. Ecol. Enviro. 1:87–94. 2003.

- BOELTER, R. A. & CECHIN, S. Z. **Impacto da dieta de rã-touro (*Lithobates catesbeianus* – Anura, Ranidae) sobre a fauna nativa: estudo de caso na região de Agudo – RS – Brasil.** *Natureza & Conservação*, Curitiba, v.5, n. 2, p. 45-53, 2007.
- BOHRER, M. B. C. **Biomonitoramento das lagoas de tratamento terciário dos efluentes líquidos industriais (Sitel) do Pólo Petroquímico do Sul, Triunfo, RS, através da comunidade zooplantônica.** 1995. 470 p. Tese (Doutorado). Departamento de Ciências, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1995.
- BOONE, M. D.; BRIDGES, C. M.; ROTHERMEL, B. B. **Growth and development of larval green frogs (*Rana clamitans*) exposed to multiple doses of an insecticide.** *Oecologia*, v. 129, p. 518-524, 2001.
- BOONE, M. D. *et al.* **Multiple stressors in amphibian communities: effects of chemical contamination, bullfrogs and fish.** *Ecological Applications*, v. 17, n. 1, p. 229-301. 2007.
- BOVERIS, A. & CHANCE, B. **The Mitochondrial Generation of Hydrogen Peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen.** *Biochem. J.* 134. 707-716. 1973.
- BOVERIS, A. & CADENAS, E. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. In: Oberley LW, ed., **Superoxide dismutase**, vol. 2. Boca Raton, FL, USA: CRC. Press, Inc., 15–30. 1982.
- BOYLAND, E. & CHASSEAUD, L. F. **The Role of Glutathione and Glutathione S-Transferases in Mercapturic Acid Biosynthesis.** *Advan. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 32, 172-129. 1969.
- BRAIBANTE, M. E. F. & ZAPPE, J. A. **A Química dos Agrotóxicos.** *Química e Sociedade: Química Nova na Escola*, Santa Maria, v. 34, n. 1, p.10-15. 2012.
- BRASIL. **Decreto nº 4074**, de 4 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que 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. In: *Legislação federal de agrotóxicos e afins*. Brasília (DF): Ministério da Agricultura e do Abastecimento; 1998.
- BUEGE, J. A & AUST, S. D. **Microsomal lipids peroxidation.** *Methods Enzymology*, 52: 302-310. 1978.
- BUENO-GUIMARÃES, H. M. *et al.* **Tadpole Epithelium Test: Potential use of *Rana catesbeiana* histopathologic epithelial changes to evaluate aquatic pollution.** *Bulletin of Environmental Contaminant and Toxicology*, n. 67, p. 202-209, 2001.
- BURY, R.B. & WHELAN, J.A. Ecology and management of the bullfrog. U.S. Fish and Wildlife Service Resource. Publication 155, 1986 In: GOVINDARAJULU, P.; PRICE, W.S.; ANHOLT, B.R.

- Introduced Bullfrogs (*Rana catesbeiana*) in western Canada: Has their ecology diverged?** Journal of Herpetology, Salt Lake City, v. 40, n. 2, p. 249-260, 2006.
- CARNEIRO, F. F.; PIGNATI, W.; RIGOTTO, R. M.; AUGUSTO, L. G. S. *et al.* **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde.** Rio de Janeiro: ABRASCO; 2012. 1ª Parte. 98 p. 2012.
- COHEN, N. W. & HOWARD, W. E. **Bullfrog food and growth at the San Joaquin experimental range.** Copeia, Washington, v.3, p. 223-225, 1958.
- COLLINS J. P. & STORFER, A. **Global amphibian declines: sorting the hypotheses.** Divers Distrib 9:89–98. 2003.
- COMPORTI, M. **Lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury.** Lab Investig 523:599–623. 1985.
- COSTA, M. A. G. **Poluição ambiental: herança para gerações futuras.** Santa Maria, RS: Orium. 254p. 2004.
- COSTA, M. J.; MONTEIRO, D. A.; OLIVERA-NETO, A. L.; RANTIN, F. T.; KALININ, A. L. **Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original®.** Ecotoxicology. 17:153–163. 2007.
- CULLEY, D. D. J. **Have we turned the corner in bullfrog culture?** 1981. Aquaculture Magazine, Asheville, n. 7, p.20-24.
- CUNHA, E. R. & DELARIVA, R. L. **Introdução da rã-touro, *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802): uma revisão.** SaBios-Revista de Saúde e Biologia, Maringá, 4(2): 34-46. 2009.
- CUZZOCREA, S.; RILEY, D.P.; CAPUTI, A.P.; SALVEMINI, A. **Antioxidant therapy: A new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury.** The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics, v.53, p.135-159, 2001.
- DORNELLES, M. F. **Efeito dos herbicidas atrazina, glifosato e quinclorac sobre a composição bioquímica, a peroxidação lipídica e a sobrevivência de girinos de *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802).** 2013. 155 p. Dissertação (Mestrado). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, 2013.
- DORNELLES, M. F. & OLIVEIRA, G. T. **Effect of atrazine, glyphosate and quinclorac on biochemical parameters, lipid peroxidation and survival in bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*).** Arch. Environm. Contam. Toxicol., 66: 415-29. 2014.
- DOWNS, C. A.; FAUTH, J. E.; WOODLEY, C. H. **Assessing the health of Grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) exposed to natural and anthropogenic stressors: a molecular biomarker system.** Mar. Biotechnol. 3, 380–397. 2001.

- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Arroz Irrigado no Sul do Brasil**. Brasília – DF. 2004.
- ENDEMANN, M.; HRISTOFOROGLU, K.; STAUBER, T. E.; WILHELM, E. **Assessment of age-related polyploidy in *Quercus robur* L. somatic embryos and regenerated plants using DNA flow cytometry**. *Biologia Plantarum*, v. 44, n. 3, p. 339-345. 2002.
- ETKIN, W. **Metamorphosis: a problem in development biology**. New York: Appleton Century Crofts, 459 p. 1968.
- FERREIRA, A. L. A. & MATSUBARA, L. S. **Radicais livres: conceitos doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo**. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v.43, p. 61-68, 1997.
- FERREIRA, C. M.; PIMENTA, A. G. C.; PAIVA-NETO, J. S. **Introdução à Ranicultura**. *Boletim Técnico do Instituto de Pesca*, n. 33, 14 p. 2001.
- FERREIRA, C. M. *et al.* **Effects of Copper Oxychloride in *Rana catesbeiana* tadpoles: Toxicological and Bioaccumulative Aspects**. *Bulletin of Environmental Contaminant and Toxicology*, v. 73, p. 465-470, 2004.
- FERREIRA, L. R.; SILVA, A. A. & FERREIRA, F. A. **Mecanismos de ação de herbicidas**. V Congresso Brasileiro de Algodão, Embrapa, Salvador, BA. 2005.
- FORDHAM, C. L. *et al.* **Effects of malathion on survival, growth, development and equilibrium posture of bullfrog tadpoles (*Rana catesbeiana*)**. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 20, n. 1, p. 179-184, 2001.
- FREITAS, D. R. J.; VAZ JUNIOR, I. S. & MASUDA, A. **Expressão e atividade enzimática de Glutathione S-Transferase em tecidos de fêmeas de *Boophilus microplus***. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 17, 2, 99-104. 2008.
- FROST, D. R. **Amphibian Species of the World: an Online Reference**. Version 6.0. Disponível em: <<http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/>>. Acesso em: nov.2014.
- GALBRAITH, D. W.; HARKINS, K. R.; MADDON, J. M.; AYRES, N. M.; SHARMA, D. P.; FIROOZABADY, E. **Rapid flow cytometric analysis of the cell-cycle in intact plant-tissues**. *Science* v. 220, p. 1049-1051. 1983.
- GEORGIEVA, N. V. **Oxidative stress as a factor of disrupted ecological oxidative balance in biological systems – a review**. *Bulg J Vet Med* 8(1):1–11. 2005.
- GERVASI, S. S. *et al.* **Experimental evidence for American bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) susceptibility to chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*)**. *EcoHealth*, v. 10, n. 2, p. 166-171, 2013.

- GIL-DEL VALLE, L.; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, G.; GONZÁLEZ-BLANCO, I.; PÉREZ-AVILA, L. J. **Estrés oxidativo: mecanismos generales involucrados y su relación con el virus de la inmunodeficiencia humana.** Bioquímica 24, 85–93. 1999.
- GOMES, A. S.; PAULETTO, E. A.; FRANS, A. F. H. Uso e manejo da água em arroz irrigado. In: GOMES A. da S.; MAGALHÃES JR. A. M (Ed.) **Arroz Irrigado no Sul do Brasil.** Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas, p.417-455. 2004.
- GONÇALVES, A. M. **Atividade de fosfomono-hidrolases envolvidas com o crescimento e absorção da cauda de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*).** 2013. 49 p. Dissertação (Mestrado). Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo. 2013.
- GOSNER, K. L. **A simplifield table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification.** Herpetologica, v. 16, p. 183-190, 1960.
- GROSSMANN, K. **Quinclorac belongs to a new class of highly selective auxin herbicides.** Weed Sci 46:707. 1998.
- GROSSMANN, K. & KWIATKOWSKI, J. **The mechanism of quinclorac selectivity in grasses.** Pesticide Biochemistry Physiology, v. 66, p. 83-91. 2000.
- HABIG, W. H. & JAKOBY, W.B. **Glutathione S-transferases (rat and human).** Methods Enzymol. 77, 218–234. 1981.
- HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine.** Oxford University Press, New York, 2ed., 1999.
- HAYES, T. *et al.* **Atrazine-Induced Hermaphroditism at 0,1 ppb in American Leopard Frogs (*Rana pipiens*): Laboratory and Field Evidence.** Environmental Health Perspectives, v. 111, n. 4, p. 568-575, 2003.
- HESS, F. D.; WELLER, S. C. Principles of selective weed control with herbicides. In: **Herbicide Action: an intensive course of the activity, selective, behavior, and fate of herbicides in plants and soils.** West Lafayette Purdue University, p. 112-134. 2000.
- HOULIHAN, J. E.; FINDLAY, C. S.; B. R.; SCHMIDT, A. H.; MEYERS & KUZMIN, S. L. **Quantitative evidence for global amphibian population declines.** Nature 404:752–755. 2001.
- IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>> Acesso em: outubro de 2014.
- IRGA – INSTITUTO RIO GRANDENSE DO ARROZ. Disponível em: <<http://www.irga.rs.gov.br>> Acesso em: outubro de 2014.
- JOHANSSON, M.; PIHA, H.; KYLIN, H.; MERILA, J. **Toxicity of six pesticides to common frog (*Rana temporaria*) tadpoles.** Environ Toxicol Chem 25(12):3164–3170. 2006.

- JONES, L.; GOSSETT, R. D.; BANKS, S. W. & MCCALLUM, M. L. **Antioxidant Defense System in Tadpoles of the American Bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) Exposed to Paraquat.** Journal of Herpetology, Vol. 44, No. 2, pp. 222–228, 2010.
- KAVITHA, P. & RAO, V. **Oxidative stress and locomotor behavior response as biomarkers for assessing recovery status of mosquito Wsh, *Gambusia aynis* after lethal effect of an organophosphate pesticide, monocrotophos.** Pest Biochem Physiol 87:182–188. 2007.
- KEHRER, J. P. **Free radicals as mediators of tissue injury and disease.** Crit Rev Toxicol 34:21–48. 1993.
- KIESECKER, J. M.; BLAUSTEIN, A. R. & BELDEN, L. K. **Complex causes of amphibian population declines.** Nature. 410:681–684. 2001.
- KOURY, J. C. & DONANGELO, C. M. **Zinco, estresse oxidativo e atividade física.** Rev. Nutr. 16(4):433-41. 2003.
- LAJMANOVICH, R. C.; ATTADEMO, A. M.; PELTZER, P. M.; JUNGES, C. M.; CABAGNA, M. C. **Toxicity of four herbicide formulations with glyphosate on *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) tadpoles: B-esterases and glutathione S-transferase inhibitors.** Arch Environ Contam Toxicol. May;60(4):681-9. 2011.
- LAMBROPOULOU, D. A.; SAKKAS, V. A.; HELA, G. D.; ALBANIS, T. A. **Application of solid-phase microextraction in the monitoring of priority pesticides in the kalamas river (N.W. Greece).** J. Chromatogr. 963:107-116. 2002.
- LAMOUREUX, G. L. & RUSNESS, D. G. **Quinclorac absorption, translocation, metabolism, and toxicity in leafy spurge (*Euphorbia esula*).** Pesticide Biochemistry and Physiology 53:210-226. 1995.
- LEBBORONI, M. *et al.* **Potential use of anurans as indicators of biological quality in upstreams of Italy.** Amphibia-Reptilia, v. 27, p. 73-79, 2006.
- LIU, Y.; ZHANG, Y.; LIU, J.; HUANG, D. **The role of reactive oxygen species in the herbicide acetochlor-induced DNA damage on *Bufo raddei* tadpole liver.** Aquatic Toxicol 78:21–26. 2006.
- LLESUY, S. F.; MILEI, J.; MOLINA, H.; BOVERIS, A.; MILEI, S. 1985. **Comparision of lipid peroxidation and myocardia damage induced by adriamycin and 4'-epiadrimicin in mice.** Tumor 71:241-249. 1985.
- LOMBARDI, J. V. *et al.* **Acute toxicity of the fungicide copper oxychloride to tadpoles of the bullfrog *Rana catesbeiana*.** Bulletin of Environmental Contaminant and Toxicology, v. 69, p. 415-420, 2002.

- LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, N. J.; FAU, A. L.; RANDAL, R. J. **Protein measurements with the folin phenol reagent.** Journal of Biological Chemistry. 183, 265-275, 1951.
- LUSHCHAK, V. I. & BAGNYUKOVA, T. V. **Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues: Antioxidant and associated enzymes.** Comp. Biochem. Physiol., C 143, 36-41. 2006.
- MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Meios de produção. Tabela 4.3: Vendas de defensivos agrícolas.** Vendas 1992-2004. Disponível: <<http://www.agricultura.gov.br>>.
- MARCHESAN, E.; ZANELLA, R.; AVILA, L. A.; CAMARGO, E. R.; MACHADO, S. L. O.; MACEDO, V. R. M. **Rice herbicide monitoring in two brazilian river during the rice growing season.** Sci. Agric., 64, 131-137. 2007.
- MARTINEZ, N. L.; SHIMABUKURO, R. H.; PRADO, R. D. **Effect of quinclorac on auxin-induced growth, transmembrane proton gradient and ethylene biosynthesis in *Echinochloa* spp.** Functional Plant Biology. p. 851-857. 1998.
- MASELLA, R.; BENEDETTO, R. D.; VARÌ, R.; FILESI, C.; GIOVANNINI, C. **Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes.** J Nutr biochem, v. 16, p. 577-586, 2005.
- MATÉS, J. M. **Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology.** Toxicology, v. 153, p. 83-104, 2000.
- McDIARMID, R. W. & ALTIG, R. **Tadpoles: the biology of anuran larvae.** Chicago: University of Chicago Press, 1999. 458 p.
- McELROY J. S. & G. K. BREEDEN. **Tall fescue seedling tolerance to carfentrazone, bromoxynil, quinclorac, and sidron.** HortScience. 41 (1):252-254. 2006.
- MEIRELLES, C. E. *et al.* **Agrotóxicos riscos e prevenção.** São Paulo: Fundacentro, 130 p. 1991.
- MENEZES, C. C.; PRETTO, A.; MORAES, B.; FONSECA, M. B.; RAABE, A.; GLUSCZAK, L.; DORNELES, A. G.; LORO, V. L. **Parâmetros oxidativos e atividade da ache em piavas (*Leporinus obtusidens*) expostas aos herbicidas quinclorac e metsulfuron-methyl em sistema de arroz irrigado.** IN: **XXII Reunião Anual da FeSBE (Federação das Sociedades de Biologia Experimental).** 2007.
- MODESTO, K. A. **Efeitos de dois herbicidas à base de glifosato para um peixe neotropical, com enfoque nos biomarcadores bioquímicos.** 2009. 69 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Londrina, Paraná. 2009.

- MONTEIRO, D. A.; ALMEIDA, J. A.; RANTINM F, T.; KALININM A. L. **Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion).** Comp Biochem Physiol 143:141–149. 2006.
- MORAES, B. S. **Parâmetros toxicológicos em carpas (*Cyprinus carpio*) expostos a formulações comerciais de diferentes herbicidas em condições de lavoura de arroz e em laboratório.** 2008. 97p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.
- NAKAJIMA, K. & YAOITA, Y. **Dual mechanisms governing muscle cell death in tadpole tail during amphibian metamorphosis.** Developmental Dynamics, v. 227, p. 246-255, 2003.
- ONWURAH, I. N. E. & EZE, M. O. **Superoxide dismutase activity in *Azotobacter vinelandii* in the disposition of environmental toxicants exemplified by Fenton reagent and crude oil.** J. Tox. Subst. Mech. 19: 111 – 123. 2000.
- ORUÇ, E. O. & USTA, D. **Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential of diazinon in different tissues of *Cyprinus carpio*.** Environ Toxicol Pharmacol 23:48–55. 2007.
- OSSANA, N. A.; CASTAÑÉ, P. M.; SALIBÁN, A. **Use of *Lithobates catesbeianus* tadpoles in a multiple biomarker approach for the assessment of water quality of the Reconquista River (Argentina).** Archives of environmental contamination and toxicology, v. 65, n. 3, p. 486-497, 2013.
- PAETOW, L. J. *et al.* **Mortality of American bullfrog tadpoles *Lithobates catesbeianus* infected by *Gyrodactylus jennyae* and experimentally exposed to *Batrachochytrium dendrobatidis*.** Journal of aquatic animal health, v. 25, n. 1, p. 15-26, 2013.
- PANDEY, S.; PARVEZ, S.; SAYEED, I.; HAQUE, R.; BIN-HAFEEZ, B.; RAISUDDIN, S. **Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl and Schn).** Sci Total Environ 309:105–115. 2003.
- PAULINO, M. G.; SAKURAGUI, M. M. & FERNANDES, M. N. **Effects of atrazine on the gill cells and ionic balance in a neotropical fish, *Prochilodus lineatus*.** Chemosphere 86:1-7. 2012.
- PEÑA-LLOPIS, S.; FERRANDO, M. D.; PEÑA, J. B. **Fish tolerance to organophosphate-induced oxidative stress is dependent on the glutathione metabolism and enhanced by N-acetylcysteine.** Aquat Toxicol 65:337–360. 2003.
- PERES, F & MOREIRA, J. C. **É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente.** Rio de Janeiro: Fiocruz. 2003.
- POLEZA, F.; SOUZA, R. C.; STRAMOSK, C. A.; RORIG, L. R.; RESGALLA, C. JR. **Avaliação da toxicidade aguda para o organismo-teste *Vibrio fischeri* dos principais herbicidas e inseticidas aplicados na lavoura de arroz irrigado dos estados de Santa Catarina e Rio Grande Do Sul.** Pesticidas. Rev. Ecotoxicol. Meio Ambiente. 18:107–114. 2008.

- POUGH, F. H.; ROBIN, M. A.; JOHN, E. C.; MARTHA, L. C.; ALAN, H. S.; KENTWOOD, D. W. **Herpetology**, Third Edition. New York: Prentice Hall. 726 pp. 2004.
- POUGH, F. H.; JANIS, C. M. & HEISER, J. B. **A vida dos vertebrados**. 4a edição. Atheneu, São Paulo. 750p. 2008.
- RAND, G. M. & PETROCELLI, S. R. **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**. Hemishpere, 666 p. 1995.
- RELYEA, R. A. **Predator cues and pesticides: A double dose of danger for amphibians**. *Ecol Appl* 13(6):1515–1521. 2003.
- RELYEA, R. A. **Growth and survival of five amphibian species exposed to combinations of pesticides**. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 23, n. 7, p. 1737-1742, 2004.
- RESGALLA, C. J; NOLDIN, J. A; SANTOS, A. L; SATO, G; EBERHARDT, D. S. **Toxicidade aguda de herbicidas e inseticidas utilizados na cultura do arroz irrigado sobre juvenis de carpa (*Cyprinus carpio*)**. *Rev. Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, Curitiba, v. 12, p. 59-68, 2002.
- RISSE-DE-FAVERNEY, C.; DEVAUX, A.; LAFURIE, M.; GIRARD, J. P.; BAILLY, B.; RAHMANI, R **Cadmium induces apoptosis and genotoxicity in rainbow trout hepatocytes through generation of reactive oxygen species**. *Aquat Toxicol* 53:65–76. 2001.
- RODRIGUES, B. N. & ALMEIDA, F. L. S. **Guia de Herbicidas**. 5a edição. Grafmark, Londrina, p. 592. 2005.
- RYAN, M. J. **The reproductive behavior of the bullfrog (*Rana catesbeiana*)**. *Copeia*, Washington, v. 1, p.108-114, 1980.
- SANTOS, L. F. J.; OLIVEIRA-BAHIA, V. R. L.; NAKAGHI, L. S. O.; STÉFANI, M. V.; GONÇALVES, A. M.; PIZAURO, J. M. Hydrolases activities in *Lithobates catesbeianus* tadpoles digestive system during larval development. In: **Reunião anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**, 39., 2010, Foz do Iguaçu. Anais... São Paulo: SBBBM, 2010.
- SAYGILI, E. I.; KONUKOGLU, D.; PAPILA, S.; AKSAY, T. **Levels of plasma vitamin E, vitamin C, TBARS and cholesterol in male patients with colorectal tumors**. *Biochemistry (Moscow)* 68(3):325–328. 2003.
- SCHMIDT, O.; AURICH, O.; MARTINEZ, N. L.; DE-PRADO, R.; WALTER, H. **Botanical identification of Spanish *Echinochloa* biotypes with differential responses to quinclorac**. In: 6th EWRS Mediterranean Symposium, Montpellier, France, p. 232, 1998.
- SCHNEIDER, C. D. & OLIVEIRA. A. R. **Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico**. *RBME*. 10(10):308-13. 2004.

- SEGALLA, M. V.; CARAMASCHI, U.; CRUZ, C. A. G.; GRANT, T.; HADDAD, C. F. B.; *et al.* Brazilian Amphibians: List of Species. In: **Herpetologia Brasileira**. 3 (2): 37-48.
- SILVA, C.M.M. & FAY, E.F. **Agrotóxicos e ambiente**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. 2004.
- SILVA, D. R.O.; AVILA, L. A.; AGOSTINETTO, D.; DAL MAGRO, T.; OLIVEIRA, E.; ZANELLA, R.; NOLDIN, J. A. **Monitoramento de agrotóxicos em águas superficiais de regiões orizícolas no sul do Brasil**. Ci. Rural 39:2383-2389. 2009.
- SINDAG – SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA A DEFESA AGRÍCOLA. Disponível em: <<http://www.sindag.com.br>> Acesso em: outubro de 2014.
- SOARES, A. M. V. M. Ecotoxicologia e determinação de riscos ecológicos. Práticas e perspectivas. IN: **Conferência Nacional Sobre Qualidade Do Ambiente**. Lisboa, Universidade de Lisboa. v. 143, 52 p., 1990.
- SOSBAI – SOCIEDADE SUL-BRASILEIRA DE ARROZ IRRIGADO. Arroz Irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil / 28 In: **Reunião Técnica da Cultura do Arroz Irrigado**, 11 a 13 de agosto de 2010, Bento Gonçalves, RS. - Porto Alegre: 188 p., il. 2010.
- SPARLING D. W. & FELLERS, G. M. **Toxicity of two inseticides to Califórnia, USA, anurans and its relevance to declining amphibian populations**. Environmental Toxicology and Chemistri, v. 8, p. 1696-1703, 2009.
- STORRS, S. I. & KIESECKER, J. M. **Survivorship patterns of larval amphibians exposed to low concentrations of atrazine**. Environmental Health Perpspectives, v. 112, n. 10, p. 1054-1057, 2004.
- TOMITA, R. Y. & BEYRUTH, Z. **Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático**. Biológico, v. 64, n. 2, p. 135-142, 2002.
- ÜNER, N., ORUÇ, E.O., SEVGILER, Y., SAHIN, N., DURMAZ, H., USTA, D. **Effects of diazinon on acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation in the brain of *Oreochromis niloticus***. Environ Toxicol Pharmac, v.21, p.241-245, 2006.
- USDA - UNITED STATES DEPARTAMENT OF AGRICULTURE. **Estatísticas**. Disponível em: <<http://www.usda.gov/wps/portal/usdahome/>>. Acesso em: outubro de 2014.
- VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. **Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review**. Environ. Toxicol. Pharmacol. 13, 57–149. 2003.
- VASCONCELOS, A. M. **Avaliação dos efeitos do agrotóxico Vermitec 18CE sobre girinos de *Lithobates catesbeianus* (Amphibia, Anura, Ranidae)**. Tese (Doutorado). 2014. 149 p. Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.
- VIEIRA, M. I. **Rã-touro gigante: características e reprodução**. Infotec, São Paulo. 1993.

- VILÉLA M. B. F. A. **Estresse oxidativo em *Prochilodus lineatus* expostos ao chumbo.** 2007. 51 p. Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas. Universidade Estadual de Londrina, Paraná. 2007.
- VITT, L. J. & CALDWELL, J. P. **Herpetology: An introductory biology of Amphibians and Reptiles,** Third Edition. London: Elsevier. 697 p. 2009.
- WAKE, D. B. & VREDENBURG, V. T. **Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians.** Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America, 105, 11466–11473. 2008.
- WINSTON, G. W. **Oxidants and antioxidants in aquatic animals.** Comp Biochem Physiol 100:173–176. 1991.
- YOSHIKAWA, T. & NAITO, Y. **What is oxidative stress?** Journal of the Japan Medical Association, v. 124, n. 11, p. 1549–1553, 2002.
- ZANELLA, R.; PRIMEL, E. G.; MACHADO, S. L. O.; GONÇALVES, F. F.; MARCHEZAN, E. **Monitoring of the herbicide clomazone in environmental water samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection.** Chromatographia: 55, 573–577. 2002.
- ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis.** New Jersey: Prentice-hall, 663 p. 1996.
- ZHANG, J.F.; LIU, H.; SUN, Y.Y.; WANG, X.R.; WU, J.C.; XUE, Y.Q. **Responses of the antioxidant defenses of the Goldfish *Carassius auratus*, exposed to 2,4-dichlorophenol.** Environ Toxicol Pharm, v. 19, p. 185-190, 2005.