

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA**

**A INFLUÊNCIA DO HERBICIDA FACET® (QUINCLORAC) NOS NÍVEIS DE  
CORTICOSTERONA, METABÓLITOS PLASMÁTICOS E NAS  
DEFESAS ANTIOXIDANTES DO FÍGADO DE GIRINOS DE RÃ TOURO  
(*Lithobates catesbeianus* Shaw, 1802)**

**Mariana de Lima Coltro**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
Avenida Ipiranga, 6681 – Caixa Postal 1429  
Fone: (051) 3320-3500  
CEP 90619-900 Porto Alegre – RS  
Brasil**

**2015**

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA**

**A INFLUÊNCIA DO HERBICIDA FACET® (QUINCLORAC) NOS NÍVEIS DE  
CORTICOSTERONA, METABÓLITOS PLASMÁTICOS E NAS  
DEFESAS ANTIOXIDANTES DO FÍGADO DE GIRINOS DE RÃ TOURO  
(*Lithobates catesbeianus* Shaw, 1802)**

**Mariana de Lima Coltro**

**Orientadora: Dr<sup>a</sup> Guendalina Turcato Oliveira**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO  
PORTO ALEGRE – RS – BRASIL  
2015**

## Sumário

Relação de figuras .....	V
Relação de tabelas.....	VII
AGRADECIMENTOS .....	VIII
RESUMO.....	X
ABSTRACT .....	XI
1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Estresse Oxidativo .....	14
1.2 Defesas Antioxidantes Enzimáticas.....	16
1.2.1 – Defesas Antioxidantes Não Enzimáticas .....	18
1.3 Lipoperoxidação .....	19
1.4 Corticosterona .....	21
1.5 Glicose.....	24
1.6 Ácido Úrico .....	25
1.7 Índice Hepatosomático e Fatores de Condição .....	26
1.8 Justificativa e Objetivo .....	26
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	29
2.1 Os girinos de <i>Lithobates catesbeianus</i> .....	29
2.2 Análises Bioquímicas.....	32
2.3 Análise Estatística .....	37
3. RESULTADOS .....	39
3.1 Determinações no Plasma:.....	40
3.2 Determinações no Fígado.....	43

4. DISCUSSÃO.....	51
5. CONCLUSÃO.....	62
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	63

## Relação de figuras

- Figura 1 *Defesas enzimáticas antioxidantes trabalham em conjunto para proteger as células contra espécies reativas de oxigênio (EROs). As siglas SOD, CAT, GST, GR, GPX e G6PDH representam respectivamente as enzimas: Superóxido Dismutase, Catalase, Glutathione S-Transferase, Glutathione Redutase, Glutathione Peroxidase e Glicose-6-Fosfato Dehidrogenase (Hermes-Lima 2004).* ..... 18
- Figura 2 *Secreção hipotalâmica do hormônio corticotrópico, o qual estimula a hipófise, que por sua vez, secreta os hormônios TSH, estimulante da tireoide, e o adrenocorticotrópico (ACTH), que estimula a inter-renal. A inter-renal secreta o hormônio glicocorticoide (corticosterona) e a tireoide o hormônio T4. estes dois atuam diretamente na alteração da metamorfose.* ..... 22
- Figura 3: *girino de rã touro com aproximadamente 4 meses de vida (Foto: Mariana Coltro, câmera Nikon D5200 f/3,8)* ..... 29
- Figura 4: *amostra de sangue sendo coletada através de punção cardíaca com seringa heparinizada (Foto: Mariana Coltro, câmera: Nikon D5200 f/4)*..... 31
- Figura 5: *Curva Padrão obtida com concentração crescente de corticosterona* ..... 33
- Figura 6: *Níveis de ácido úrico no plasma de girinos mantidos em laboratório por 14 dias (C14) e expostos por 7 dias a diferentes concentrações de Facet<sup>®</sup> princípio ativo quinclorac. Os resultados são expressos como a média±erro padrão. Letras diferentes indicam diferença entre os grupos experimentais para um  $p < 0,05$*  ..... 41
- Figura 7: *Níveis de glicose no plasma de girinos mantidos em laboratório por 14 dias (C14) e expostos por 7 dias a diferentes concentrações de Facet<sup>®</sup>, princípio ativo quinclorac. Os resultados são expressos como a média±erro padrão. Letras diferentes indicam diferença entre os grupos experimentais para um  $p < 0,05$*  ..... 42
- Figura 8: *Níveis de corticosterona no plasma de girinos mantidos em laboratório por 14 dias (C14) e expostos por 7 dias a diferentes concentrações de Facet<sup>®</sup>, princípio ativo quinclorac. Os resultados são expressos como a média±erro padrão. Letras diferentes indicam diferença entre os grupos experimentais para um  $p < 0,05$* ..... 43
- Figura 9: *Níveis de lipoperoxidação hepática de girinos mantidos em laboratório por 14 dias (C14) e expostos por 7 dias a diferentes concentrações de Facet<sup>®</sup>, princípio ativo quinclorac. Os resultados são expressos como a média±erro padrão. Letras diferentes indicam diferença entre os grupos experimentais para um  $p < 0,05$*  ..... 44
- Figura 10: *Níveis da atividade da Superóxido Dismutase (SOD) hepática de girinos mantidos em laboratório por 14 dias (C14) e expostos por 7 dias a diferentes concentrações de Facet<sup>®</sup>, princípio ativo quinclorac. Os resultados*

são expressos como a média±erro padrão. Letras diferentes indicam diferença entre os grupos experimentais para um  $p<0,05$ ..... 45

Figura 11: Níveis da atividade da Catalase (CAT) hepática de girinos mantidos em laboratório por 14 dias (C14) e expostos por 7 dias a diferentes concentrações de Facet<sup>®</sup>, princípio ativo quinclorac. Os resultados são expressos como a média±erro padrão. Letras diferentes indicam diferença entre os grupos experimentais para um  $p<0,05$ ..... 46

Figura 12: Níveis da atividade da Glutathione S-Transferase (GST) hepática de girinos mantidos em laboratório por 14 dias (C14) e expostos por 7 dias a diferentes concentrações de Facet<sup>®</sup>, princípio ativo quinclorac. Os resultados são expressos como a média±erro padrão. Letras diferentes indicam diferença entre os grupos experimentais para um  $p<0,05$ ..... 47

Figura 13: Níveis de proteínas totais no fígado de girinos mantidos em laboratório por 14 dias (C14) e expostos por 7 dias a diferentes concentrações de Facet<sup>®</sup>, princípio ativo quinclorac. Os resultados são expressos como a média±erro padrão. Letras diferentes indicam diferença entre os grupos experimentais para um  $p<0,05$ ..... 48

Figura 14: Níveis do Índice K total de girinos mantidos em laboratório por 14 dias (C14) e expostos por 7 dias a diferentes concentrações de Facet<sup>®</sup>, princípio ativo quinclorac. Os resultados são expressos como a média±erro padrão. Letras diferentes indicam diferença entre os grupos experimentais para um  $p<0,05$ ..... 49

Figura 15: Níveis do Índice K do fígado de girinos mantidos em laboratório por 14 dias (C14) e expostos por 7 dias a diferentes concentrações de Facet<sup>®</sup>, princípio ativo quinclorac. Os resultados são expressos como a média±erro padrão. Letras diferentes indicam diferença entre os grupos experimentais para um  $p<0,05$ ..... 49

Figura 16: Níveis do Índice Hepatosomático de girinos mantidos em laboratório por 14 dias (C14) e expostos por 7 dias a diferentes concentrações de Facet<sup>®</sup>, princípio ativo quinclorac. Os resultados são expressos como a média±erro padrão. Letras diferentes indicam diferença entre os grupos experimentais para um  $p<0,05$ ..... 50

## Relação de tabelas

Tabela 1: *Resultados obtidos para os diferentes parâmetros analisados no plasma e no tecido hepático de animais do Grupo Controle 7 dias (C7) e Controle 14 dias (C14). As letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos C7 e C14, para um  $p < 0,05$ .* ..... 39

Tabela 2: *Resultados obtidos para a massa corporal e comprimento dos animais na chegada ao laboratório (inicial), após sete dias de aclimação (C7), quatorze dias de permanência no laboratório (C14) e expostos a diferentes concentrações do herbicida (X1=0,05 $\mu$ g/L; X2=0,10 $\mu$ g/L; X3=0,20 $\mu$ g/L e X4=0,40 $\mu$ g/L). O asterisco (\*) representa diferença significativa entre os valores iniciais e as letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos experimentais* ..... 40

## AGRADECIMENTOS

Em uma dissertação de Mestrado, seções como resultados e discussão são consideradas, de maneira geral, as mais relevantes. Porém, para pessoas que necessitam de tanta ajuda e compreensão de outras como no meu caso, o agradecimento torna-se item imperativo. Afinal, escolher trabalhar com animais e pesquisa em laboratório e ter disponível 50% de sua visão total nem sempre é tarefa fácil. Não foi para mim. Mas, com o passar dos meses, e com todo o respaldo da minha orientadora Guendalina Turcato Oliveira, a tarefa tornou-se viável e muito satisfatória para mim. E é por isto que não posso deixar de agradecer primeiramente à ela, minha orientadora, por me apoiar, me compreender e me dar forças para continuar em todo o tempo que precisei.

Não posso deixar de agradecer profundamente à equipe que também sempre esteve ao meu lado, que foram, literalmente, meus olhos nesta pesquisa: Betânia Souza de Freitas, Patrícia Rodrigues, Camila Miguel, Artur Navarro Valgas, Bruna Dutra de Castro, Sarah Santos e Luiza Petroli Rückheim.

Agradeço também a todos os professores que tive aulas nestes dois anos de mestrado, Santiago Jose Castroviejo Fisher, Eduardo Eizirik, Carlos Graeff Teixeira, Arno Antonio Lise, Sandro Bonatto, Ana Paula Duarte de Souza, Cleoni Maria Barboza Fernandes, Júlio César Bicca-Marques e Mônica Ryff Moreira Vianna. Todos sempre estiveram dispostos a ajudar-me no que era possível e me ensinaram muito.

Muito obrigada também à toda a equipe da secretaria da pós graduação de Zoologia, Patrícia Costa Baptista, Luana Oliveira dos Santos, Mauro Alex Gonçalves Rio e Rodrigo de Lima Correa, que não pouparam esforços para fornecer materiais e documentos que precisei.

Obviamente, eu nem estaria agradecendo a todas estas pessoas da Universidade se não fosse pelo apoio incondicional da minha família, aos meus

pais, Flávio Coltro e Maria Izabel Coltro, à minha irmã Maria Paula Coltro, que em momentos mais difíceis, nunca deixaram que eu pensasse em desistir. E a “alguém” que faz parte da minha família há oito anos e que ficou acordado comigo, aos meus pés, por madrugadas enquanto eu digitava e estudava: meu cachorro Hubble.

Muito obrigada aos meus médicos, principalmente à oftalmologista Dr<sup>a</sup> Paula Gross, sempre incansável em manter a pressão do meu olho estável e as consequências do glaucoma o mais longe que foi possível.

Deus, obrigada por manter todas estas pessoas próximas a mim e permitir que eu jamais voltasse atrás.

Obrigada a Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul que, desde a graduação, forneceu meios para minha formação.

Agradeço também à CAPES, pelo auxílio com a bolsa de estudos e pelo incentivo à Ciência, parte tão importante para o entendimento do mundo e de nós mesmos.

Este é o início da realização de um sonho.

*“O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza de seus sonhos”*

*(Eleanor Roosevelt)*

## RESUMO

Desde os princípios do manejo com agricultura pelo homem, a tecnologia tem aumentado de modo exponencial, permitindo a rápida evolução deste setor. Porém, muitas melhorias estão atreladas a utilização de compostos quimicamente sintetizados, sendo o meio ambiente e o próprio ser humano expostos a estes poluentes, muitas vezes nocivos. Mesmo assim, a quantidade desses herbicidas é crescente. Herbicidas a base de quinclorac, como o Facet<sup>®</sup> atuam como inibidores do crescimento, sendo imediatamente absorvidos por sementes germinadas, raízes e folhas e então translocados para a planta. Este agente é comumente aplicado em lavouras de arroz e, no sul do Brasil, o quinclorac é o mais frequentemente detectado em estudos com resíduos de agroquímicos utilizados nestas lavouras, sendo considerado um grande contaminante de águas. Diversos estudos com animais tem demonstrado o efeito biológico negativo de xenobiontes, como alterações no comportamento, desenvolvimento e produção de corticoides, podendo acarretar malformações, problemas de diferenciação celular e reprodução. Tendo em vista a alta sensibilidade de girinos a estressores ambientais, escolhemos como modelo a espécie *Lithobates catesbeianus*, que possui, dentro a família ranídea, uma grande plasticidade e resistência, sendo uma espécie introduzida no Brasil. Para a realização deste estudo foram adquiridos 79 girinos com 4 meses de vida, no estágio 25 (pró-metamórfico) da tabela de Gosner. Os animais foram divididos em aquários com 60L de água, com aeração constante em fotoperíodo e temperatura naturais, pH de 7,4, alimentados *ad libitum* com ração. Uma vez que houve manipulação e eutanásia dos animais, a pesquisa foi submetida à Comissão de Ética no Uso de animais (CEUA) da PUCRS. O herbicida foi adicionado no 8º dia nas concentrações X1(0,05µg/L), X2(0,1µg/L), X3(0,2µg/L) e X4(0,4µg/L). O objetivo da pesquisa foi analisar as possíveis alterações da atividade das enzimas antioxidantes e níveis de lipoperoxidação (LPO) hepática; assim como, dos níveis de corticosterona (CORT), glicose e ácido úrico (AU) no plasma frente à exposição do herbicida. Uma vez que não houve diferença entre os grupos controle 7 dias (C7) e controle 14 dias (C14), com exceção da medida de AU, assim os grupos foram comparados com o C14, onde os animais apresentam o mesmo tempo de desenvolvimento dos expostos. Os resultados mostraram diferenças significativas na LPO, principalmente nos animais expostos a concentração 0,1µg/L (X1) do herbicida; induzindo também, a aumento da atividade da GST, da SOD e da CAT; após seguiu-se uma diminuição desta atividade onde verificamos, no caso da SOD, CAT e GST, uma relação inversa entre a concentração do pesticida e a resposta do sistema enzimático. Porém, estes resultados não determinaram um aumento na lipoperoxidação e nem causam mortalidade aos animais o que sugere uma atividade constitutiva alta destas enzimas e/ou a presença de um sistema antioxidante não enzimático bastante eficiente. Os níveis de corticosterona plasmático apresentaram diferença entre os grupos X1(0,05µg/L) e X4(0,4µg/L), com decréscimo no X4, deduzindo uma diminuição da capacidade de resposta do animal frente à exposição prolongada, sete dias, a concentrações mais elevadas do pesticida; estando esta resposta aliada a um aumento da glicemia em X3. Os níveis de AU apresentaram uma redução significativa no grupo X4, porém, para maiores conclusões sobre o uso desta molécula como antioxidante e seu papel junto ao sistema não enzimático serão necessários novos estudos.

## ABSTRACT

Since the principles of management in agriculture by man, technology has increased exponentially, allowing rapid development of this sector. However, many improvements are linked to use of chemically synthesized compounds, with the environment and the human being exposed to these pollutants, often harmful. Nevertheless, the amount of these herbicides is increasing. The herbicide based on quinclorac, as Facet<sup>®</sup> acts as a growth inhibitor, immediately absorbed by germinated seeds, roots and leaves and then transported to the plant. This agent is commonly applied in rice fields and in southern Brazil, the quinclorac is most often detected in studies with agrochemical residues used on these crops and is considered a major water contaminant. Several animal studies have demonstrated the negative biological effect of this xenobiotic, as changes in behavior, development and production of corticosteroids, which may cause malformations, cell differentiation and reproduction problems. Given the high sensitivity of tadpoles to environmental stressors, we choose as model *Lithobates catesbeianus* species, which has, among ranidae family, a great plasticity and toughness, due probably to be an introduced species in Brazil. To perform this study were acquired 79 tadpoles with 4 months old, on stage 25 (pro metamorphic) of the Gosner table. Animals were divided into tanks of 60L of water with constant aeration in natural photoperiod and temperature, pH of 7.4, fed *ad libitum* on chow. Since there was manipulation and euthanasia of animals, the study was submitted to the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of PUCRS. The herbicide was added at day 8 in X1 concentrations (0,05µg/L), X2 (0,1µg/L), X3 (0,2µg/L) and X4 (0,4µg/L). The objective of the research was to analyze the possible alterations in the activity of antioxidant enzymes and levels of lipid peroxidation (LPO) liver; as well as the levels of corticosterone (CORT), glucose and uric acid (UA) in plasma after exposure of the herbicide. Since there was no difference between groups control 7 days (C7) and control 14 days (14), except for the UA as the groups were compared with the C14, where they show the same development time of exposed. The results showed significant differences in LPO, especially in animals exposed concentration 0.1 µ g/L (X1) of the herbicide; also induces the increased activity of GST, SOD and CAT; After it followed by a decrease in this activity where noticed in the case of SOD, CAT and GST, an inverse relationship between the concentration of the pesticide and the response of the enzyme system. However, these results did not determine an increase in lipoperoxidation and even cause death to the animal suggesting a high constitutive activity of these enzymes and / or the presence of a non-enzymatic antioxidant system rather desenvolvido. The plasma corticosterone levels showed differences between the groups X1 (0,05µg/L) and X4 (0,4µg/L), a decrease in X4, deducting a decreased responsiveness of animals to prolonged exposure front seven days, at higher concentrations of the pesticide; this response being coupled to increased glucose levels in X3. The UA levels showed a significant reduction in X4 group, however, for further findings on the use of this molecule and its role as an antioxidant by the non-enzymatic system will require new studies.

## 1. INTRODUÇÃO

É sabido que desde o momento no qual o homem conseguiu e aprendeu a manejar a natureza e usufruí-la, da maneira que julga mais apropriada para si, os avanços tecnológicos aumentaram de maneira exponencial, permitindo com que setores como os relacionados à alimentação, saúde e agricultura rapidamente evoluíssem (Oga 2003).

O homem é o único animal que não se contenta com o que a natureza lhe oferece, tendo a necessidade, evolutiva ou não, de modificá-la e utilizá-la de modo intenso e ininterrupto (Alho 2006). Muitas melhorias estão atreladas a utilização de compostos quimicamente sintetizados, e o meio ambiente é continuamente carregado com estes elementos xenobióticos (van der Oost et al. 2003); contudo, também devemos considerar a exposição do próprio ser humano e do meio ambiente a compostos com propriedades muitas vezes desconhecidas e nocivas (Oga 2003). Ainda assim, o uso de herbicidas é crescente, sendo a quantidade destes agentes químicos lançados no mercado, principalmente nas últimas décadas, cada vez mais extensa (Marchi et al. 2008). No Brasil, a utilização de agrotóxicos comumente utilizados para evitar danos às colheitas e disseminação de pragas encontra-se em franca expansão (Dornelles 2013). O país é responsável por cerca de 50% do consumo destes xenobiontes em toda a América do Sul (somente na região sudeste, está estimado em 12kg de agrotóxico/trabalhador/ano), sendo o quarto colocado dentre os países consumidores no mundo (Moreira et al. 2002). Além disso, o desenvolvimento de herbicidas a partir dos anos 70 explodiu e atualmente a lista destes, disponíveis no mercado é muito grande - não somente o número aumentou como também os tipos de herbicidas com os mesmos ingredientes ativos e com diferentes nomes comerciais (Lein et al. 2004). Reforça-se, de mais a mais, que os dados da Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas (IUCN) de 2008 indicam que, logo após a perda de habitat, a poluição é a segunda maior causadora no processo de ameaça das populações de anfíbios (Mann et al. 2009).

A maioria dos herbicidas reguladores de crescimento é prontamente absorvida tanto pelas raízes como pelas folhas e transportado tanto pelo floema como pelo xilema (sistêmicos). A translocação destes herbicidas aplicados nas folhas de gramíneas, entretanto, é mais restrita que em folhas largas suscetíveis. Desse modo, esses compostos são usados, primariamente, para controlar plantas daninhas de folhas largas em culturas de gramíneas e pastagens, sendo assim mais efetivos para o controle destas.

Os herbicidas auxínicos a base de Quinclorac (3,7-dicloro-8-quinolino carboxílico) atuam como inibidores de crescimento, sendo prontamente absorvidos por sementes germinadas, raízes e folhas, e então translocados para a planta (Grassmann e Kwiatkowski 2000), semelhante ao Fenóxi 2,4-D, o qual foi o primeiro composto orgânico sintetizado pela indústria a ser utilizado como herbicida seletivo (Oliveira Júnior e Constantin 2001). A medida recomendada para uso da formulação comercial de Facet® WP é de 375g de quinclorac (ingrediente ativo) por hectare. Este agente é normalmente aplicado em lavouras de arroz em muitos países, e, nos últimos anos, estudos em campos de arroz irrigados no sul do Brasil revelaram a presença de resíduos de agroquímicos, sendo o Quinclorac o mais frequentemente detectado (Resgalla et al. 2007), além do acúmulo de cianetos em tecidos de plantas como gramíneas (Grossmann e Kwiatkowski 2000).

Este herbicida é classificado como um grande contaminante de águas, devido a sua alta solubilidade neste meio ( $W_s$ : 0,065 mg/kg em pH 7), sendo conhecido que soluções deste composto são estáveis em relação à hidrólise em pH de 5, 7 e 9 após 730 horas. Ligado a um solo aeróbico, a meia vida é de 211 dias. (PAN Pesticide Database; IUPAC) (Pareja et al. 2012). Finalmente, o emprego destas substâncias na agricultura apresenta um grande potencial de contaminação dos recursos hídricos devido às suas características como grande potencial de deslocamento (lixiviação), permanência no solo, solubilidade em água moderada e potencial de fixação aos solos e sedimentos, podendo alcançar lençóis freáticos (Moura et al. 2008)

Diferentes estudos com animais tem demonstrado um efeito biológico negativo do Quinclorac ou de herbicidas com base neste composto. A exposição à Quinclorac acarretou alterações de comportamento em Jundiás (*Rhamdia quelen*) após exposição de 96 horas em concentrações próximas a  $CL_{50}$ , de 745mg/L além de um aumento da ativação da acetilcolinesterase (AChE) cerebral, o que pode influenciar em processos de neurotransmissão colinérgica, acarretando efeitos como tremores, letargia e nado errático, onde os animais estariam compensando o estresse metabólico através do aumento da atividade da AChE cerebral (Cattaneo 2009). Estudos com carpas (*Cyprinus carpo*) expostas ao Quinclorac na concentração de 1mg/L por 192 horas, mostraram sinais claros de peroxidação lipídica identificado pelo aumento nos níveis de TBARS no fígado e brânquias (Menezes et al. 2012). Trabalhos realizados com anfíbios expostos a herbicidas e poluentes tóxicos evidenciam alterações no desenvolvimento, no comportamento, na produção de corticoides, aliado a uma deficiência imunológica nos animais expostos. Tais desequilíbrios podem acarretar malformações, problemas de diferenciação celular e reprodução (Bridges e Semlitsch 2000; Hontela 2005; Dornelles 2013).

Muitos pesticidas tem o potencial de afetar populações de anfíbios, causando mortalidade; assim, os estudos que examinam a toxicidade entre anfíbios geralmente observam manifestações de doses sub-letais afetando, entre outros pontos, o desenvolvimento dos animais pela interrupção de fatores endócrinos (Mann et al. 2009). De mais a mais, verifica-se a importância da explanação a seguir, resumindo itens do metabolismo, seu funcionamento e defesas.

### **1.1 Estresse Oxidativo**

O termo radical livre é utilizado para qualquer átomo ou molécula que contenha elétrons desemparelhados e existência independente. Estes radicais podem ser cátions, ânions ou de carga neutra (Hermes-Lima 2004), dependendo do tipo de reação. A presença destes elétrons desemparelhados confere a tais espécies caráter paramagnético, na maior parte dos casos, uma

alta reatividade e uma meia vida curta (Llesuy 2002). O interesse em seu estudo é recente, há cerca de 50 anos, devido à identificação de sua presença em materiais biológicos e teorias de envolvimento em processos mutagênicos e câncer (Belló-Klein 2002).

Os radicais livres centrados no Oxigênio ( $O_2$ ) são gerados fisiologicamente nos sistemas biológicos a partir de compostos endógenos que, por sua vez, ao metabolizar certos compostos exógenos ao organismo, também podem vir a gerar diferentes radicais livres (Llesuy 2002). O  $O_2$  por si só tem pouca capacidade de oxidar outros compostos químicos, então, em vez disso, ele é convertido em formas ativas de oxigênio, chamados de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), como o Superóxido  $O_2^-$  o peróxido na forma de peróxido de Hidrogênio e a Hidroxila, que são continuamente produzidos por células vivas como subprodutos do metabolismo normal, durante metabolismo de xenobiontes e radiação. No organismo, as EROs encontram-se envolvidas em produção de energia, regulação do crescimento celular, síntese de substâncias biológicas importantes, etc. Porém, apesar de os tecidos disporem de múltiplas enzimas que removem estas espécies reativas, incluindo peroxidases, catalases e superóxido dismutases, seu excesso apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação de lipídios de membrana, a agressão às proteínas dos tecidos, às enzimas, aos carboidratos e ao DNA (Warner 1994; Barreiros e David 2005; Guyton e Hall 2006).

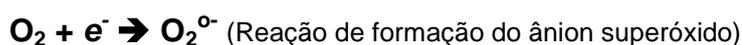
Muitos fatores, incluindo contaminantes, mudanças de temperatura, níveis de oxigênio, alta taxa metabólica e uso de agentes poluentes pelo homem - através da formação e liberação de EROs - causam **estresse oxidativo** levando a inatividade enzimática, dano ao DNA e morte celular (van der Oost et al. 2003; Lushchak 2010). Além disso, o equilíbrio *redox* da célula pode ter perda no seu balanço por exposição também a contaminantes, induzindo a danos em lipídios e proteínas, levando a processos mutagênicos e carcinogênicos (Sies e Stahl 1995). O aumento nos níveis de lipoperoxidação (LPO, da sigla em inglês *Lipid Peroxide Levels*) é um dos importantes fatores para a perda da função celular durante o estado de estresse oxidativo (Hermes-Lima et al. 1995; Hermes-Lima 2004).

Tais efeitos tóxicos, e ainda outros, podem ser originados pela geração e liberação de EROs, como já citado; assim, muitas enzimas antioxidantes e moléculas antioxidantes são importantes para lidar com a alta produção celular destas Espécies Reativas de Oxigênio (Zanette et al. 2015), apesar de nem sempre serem suficientes em casos de alta exposição.

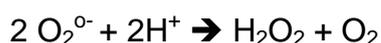
## 1.2 Defesas Antioxidantes Enzimáticas

Atualmente, as formas de vida estão equipadas com sistemas complexos para o controle de danos aos constituintes celulares provenientes das espécies reativas de oxigênio (Hermes-Lima 2004), como o do ânion radical superóxido pelo grupo de enzimas das **Superóxido dismutases (SOD)**.

A produção do ânion superóxido ocorre tanto nas mitocôndrias quanto no retículo endoplasmático e no citosol, devendo-se a auto-oxidação nas mitocôndrias (Llesuy 2002).



O radical livre assim gerado é altamente reativo, e sua formação também leva à produção do radical hidroxila (OH), ainda mais reativo. Para impedir o dano oxidativo do  $\text{O}_2^{\circ-}$ , as células têm diversas formas da enzima SOD, que catalisa a dismutação de  $\text{O}_2^{\circ-}$  através da reação:



Onde o peróxido de hidrogênio gerado é metabolizado pela ação da **glutathiona peroxidase** e **catalase** e aquele (peróxido de hidrogênio) tem sua passagem livre através de membranas (Nelson e Cox 2014; Warner 1994). Também, o peróxido de hidrogênio pode atuar não somente como um hidroperóxido, mas ainda como doador de hidrogênio (Llesuy 2002).

O aumento da atividade da SOD deve ser acompanhado, para que não ocorram danos celulares em alguns casos, pelo aumento de outra enzima, a **Catalase (CAT)** e/ou **Glutathiona Peroxidase (GPx)**, para evitar o acúmulo do peróxido de hidrogênio (Warner 1994). A enzima CAT tem como papel facilitar a remoção do peróxido de hidrogênio (daí o nome, pois ela *catalisa* a reação da

molécula), decompondo-o para um estado anterior, que é metabolizado para molécula de oxigênio e água (Hermes-Lima 2004). As CATs estão localizadas em diversos tecidos, mas sua maior atividade é verificada em eritrócitos, fígado, rins e tecido adiposo, nos peroxissomos da maioria das células, estando envolvidas no metabolismo de ácidos graxos. Porém, a atividade destas enzimas como marcadores nas hemácias mostrou-se mais apropriada em estudos de oxidação em vertebrados (van der Oost et al. 2003; Hermes-Lima 2004).

As células também podem aumentar a biossíntese de **Glutathione** (GSH), a qual pode atuar como antioxidante por si só, além do seu papel como co-substrato de GPx e da **Glutathione S-Transferase** (GST). Essas ações de defesa previnem o acúmulo de dano oxidativo aos componentes celulares (membranas, organelas, etc.), onde as consequências de cada um são altamente variadas dependendo do tipo celular (Hermes-Lima 2004; Nelson e Cox 2014). A GSH é considerada uma “chave de antioxidação solúvel” sozinha, mas também como um cofator para diversas enzimas. Porém, a enzima que mantém o balanço da GSH, chamada **Glutathione Redutase** (GR), ao contrário da CAT, requer NADPH e assim, portanto, mais energia de enzima demandante (Solé et al. 2010). A GR também tem utilidade para manter os grupos sulfidril das proteínas em seu estado reduzido, impedindo alguns dos efeitos deletérios do estresse oxidativo (Nelson e Cox 2014).

A GSH está presente em plantas, em animais e em algumas bactérias frequentemente em níveis altos, podendo ser considerada um tampão redox, sendo derivada dos aminoácidos glutamato, cisteína e glicina. A forma oxidada da glutathione (GSSG), produzida no curso das suas atividades redox, contém duas moléculas de glutathione ligadas por meio de uma ligação dissulfeto (Nelson e Cox 2014).

Por sua vez, as GSTs, família de enzimas multigênicas com múltiplas funcionalidades e de presença principalmente citosólica são encontradas em bactérias, fungos, plantas e animais. Elas catalisam uma variedade de reações onde são conjugadas moléculas de glutathione e substratos eletrofílicos são

descritas como as mais abundantes e largamente distribuídas da sua fase de atuação enzimática (van der Oost et al. 2003; Boutet et al. 2004), tendo um papel fundamental no metabolismo de muitas classes de contaminantes marinhos (Nunes et al. 2015). De mais a mais, análises de GSTs em mamíferos mostraram que elas também atuam intracelularmente montando proteínas de acordo com uma alta variedade de substâncias endógenas e reações a xenobiontes (Lüdeking e Köhler 2002), inclusive de potencial cancerígeno (Hermes-Lima 2004). A figura 1 (Hermes-Lima 2004) demonstra, de maneira resumida, como várias destas enzimas citadas estão associadas.

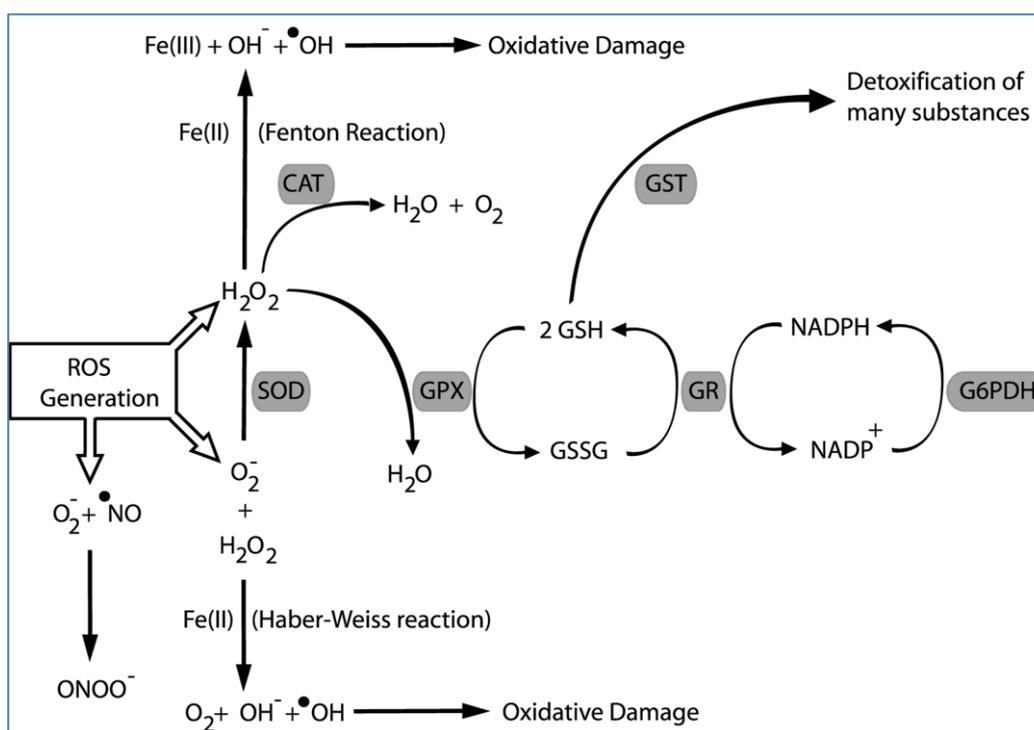


Figura 1 Defesas enzimáticas antioxidantes trabalham em conjunto para proteger as células contra espécies reativas de oxigênio (EROs). As siglas SOD, CAT, GST, GR, GPX e G6PDH representam respectivamente as enzimas: Superóxido Dismutase, Catalase, Glutationa S-Transferase, Glutationa Redutase, Glutationa Peroxidase e Glicose-6-Fosfato Dehidrogenase (Hermes-Lima 2004).

### 1.2.1 – Defesas Antioxidantes Não Enzimáticas

Fazem parte deste sistema um grande número de compostos de baixo peso molecular, incluindo o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), o ácido ascórbico (vitamina C), componentes do selênio, a glutatona, o ácido úrico, os estrógenos, a

melatonina, entre outros (Nordberg e Arnér 2001; Hermes-Lima 2004; Andrade et al. 2010).

Os antioxidantes de baixo peso molecular desempenham uma relevante ação antioxidante fisiológica. Este sistema pode atuar em duas linhas: como removedor do agente, antes que ele cause a lesão, ou como reparador da lesão ocorrida (Andrade et al. 2010).

Descreveremos brevemente os compostos que concerne no presente estudo, primeiramente, a glutathiona reduzida (GSH) que é uma substância presente na maioria das células e é o tiol (-SH) mais abundante do meio intracelular. Ela pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo-a contra lesões resultantes da exposição contra agentes como íons ferro, oxigênio hiperbárico radiação e luz ultravioleta. Também atua na diminuição a suscetibilidade à lesão renal decorrente da isquemia e reperfusão, participa da detoxificação de agentes químicos e da eliminação de produtos da lipoperoxidação (Ferreira e Matsubara 1997). O ácido úrico (ver seção 1.6), por sua vez, na forma de urato (quando em pH neutro) age como antioxidante *in vivo* como na doença de Wilson (em humanos) e hemocromatose. Em estudos na Universidade Federal do Rio de Janeiro mostrou-se a ação na defesa antioxidante do urato em insetos sugadores de sangue de maneira importante, onde, mesmo com altas quantidades deste elemento, os animais não desenvolviam doenças relacionadas ao ácido úrico (Hermes-Lima 2004).

### **1.3 Lipoperoxidação**

A peroxidação lipídica é definida como uma deterioração oxidativa de lipídios poli-insaturados - ácidos graxos que contém no mínimo duas ligações duplas carbono-carbono. Tanto as membranas celulares, como as organelas citoplasmáticas (mitocôndrias, peroxissomas, etc.) possuem alta quantidade de ácidos graxos insaturados que poderiam ser peróxidos (Llesuy 2002). Basicamente, a Lipoperoxidação (LPO) é uma reação em cadeia catalisada, na maioria dos casos, por metais de transição onde oxidantes causam o

desarranjo dos fosfolípidos de membrana, os quais contêm os ácidos graxos poli-insaturados (Hermes-Lima 2004)

Muitas espécies reativas de oxigênio podem dar início a peroxidação lipídica, um processo de auto propagação em que o radical peroxil é formado quando a ERO tem reatividade suficiente para extrair um átomo de hidrogênio de um lipídio que esteja intacto (grupo metileno), sendo o radical hidroxila (OH) uma das moléculas capazes desta iniciação do processo (Llesuy 2002; Vinagre et al. 2012).

A reação de EROs com lipídios é considerado um dos mecanismos mais comuns de danos celulares, além do que, a peroxidação lipídica tem alto nível de injúria e morte celular, assim como danos ao DNA (Sies e Stahl 1995; Vinagre et al. 2012). Muitas condições patológicas e doenças são atribuídas a peroxidação de lipídios. Os danos da LPO a membranas celulares possuem diferentes níveis de gravidade, dependendo da natureza e da concentração do oxidante, seu alcance e variando do local até o rompimento da integridade da bicamada lipídica (Hermes-Lima 2004), ou seja, enquanto estas reações em cadeia progredem, proteínas de transporte e enzimas de membrana podem ser inativadas ou a bicamada lipídica pode tornar-se mais permeável, alterando, desta forma, a homeostasia dos íons (Llesuy 2002). Assim, o aumento nos níveis de LPO é um dos maiores fatores para a perda das funções celulares durante o estado de estresse oxidativo e tem sido empregado como biomarcador para este estresse tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Zanette et al. 2015)

Com a descrição e o estudo de mecanismos de defesa através da SOD, CAT, GST, GPx e, através de substâncias como a Glutathiona (GSH) e Ácido Úrico, e da Lipoperoxidação, se tem demonstrando o potencial de certos animais em controlar os efeitos deletérios das espécies reativas de oxigênio (Lushchak 2010). Este sistema e seus constituintes enzimático e não enzimático desempenham um papel fundamental como marcadores biológicos e são importantes para análises de maiores ou menores níveis de estresse no organismo, assim como de alterações ambientais.

#### 1.4 Corticosterona

Trabalho desenvolvido por Glennermeier e Denver (2002) mostra que as concentrações de corticosterona (CORT) podem variar durante o desenvolvimento larval; geralmente observando-se níveis baixos em girinos pre-metamórficos e pro-metamórficos, valores aumentados no clímax metamórfico e níveis máximos em jovens recém metamorfoseados e também conforme o ciclo claro/escuro. Sabe-se que a administração de corticoides nos estágios iniciais do desenvolvimento tende a inibir a metamorfose, enquanto que nos estágios finais, acelera a conversão de tiroxina em triiodotironina ( $T_3$ ) e o aumento da ligação do  $T_3$  com o seu receptor, leva ao estímulo da metamorfose (Kloas et al. 1997). Neste mesmo estudo foi demonstrado este fato, em que nos estágios de maior atividade na metamorfose, houve um forte aumento nos níveis de corticoides, o qual estabilizou-se até os estágios finais, onde decaiu e mantiveram-se constantes até o final da metamorfose em girinos de *Lithobates catesbeianus* e *Xenopus laevis*.

Em anfíbios, os corticoides como o glicocorticoide Corticosterona agem de maneira sinérgica com os hormônios da tireoide (TH) nos últimos passos da metamorfose (pró-metamorfose e clímax, conforme tabela de Gosner 1960), podendo assim ter um importante papel na própria regulação hormonal destes animais, sendo a corticosterona (CORT), juntamente com a aldosterona, os principais hormônios esteroides da inter-renal (área análoga ao córtex da adrenal dos mamíferos), acelerando, no caso da primeira, a metamorfose induzida pelo hormônio tireóideo. Esses hormônios corticoides também têm papéis importantes no metabolismo de carboidratos, proteínas e sais, tanto nos estágios de larva quanto de adultos (Wright et al. 2003). Além disso, a disponibilidade biológica e as ações celulares a produtos químicos ambientais em vertebrados são muito influenciadas pela forma como estes produtos são transportados na corrente sanguínea (Jaffe 1981; Mann et al. 2009).

A mediação da tireoide na metamorfose também é induzida pelo estresse. Em condições naturais, o estresse está associado ao ambiente em que os anfíbios vivem, com aceleração da metamorfose como uma resposta

adaptativa a ele, a qual é mediada por uma cascata de eventos de sinalização hormonal, iniciando com a secreção hipotalâmica do hormônio corticotrópico (CRH), que, por sua vez, vai estimular a hipófise a secretar o hormônio estimulante da tireoide (TSH) e o adrenocorticotrófico (ACTH), que estimulam a tireoide a secretar o seu hormônio ( $T_4$ ) e a inter-renal a secretar o glicocorticoide, respectivamente (figura 2). Assim, a aplicação exógena de corticoides também acelera a metamorfose em várias espécies, semelhante ao que ocorre em ambientes contaminados com pesticidas, induzida pela resposta ao estresse (Mann et al. 2009).

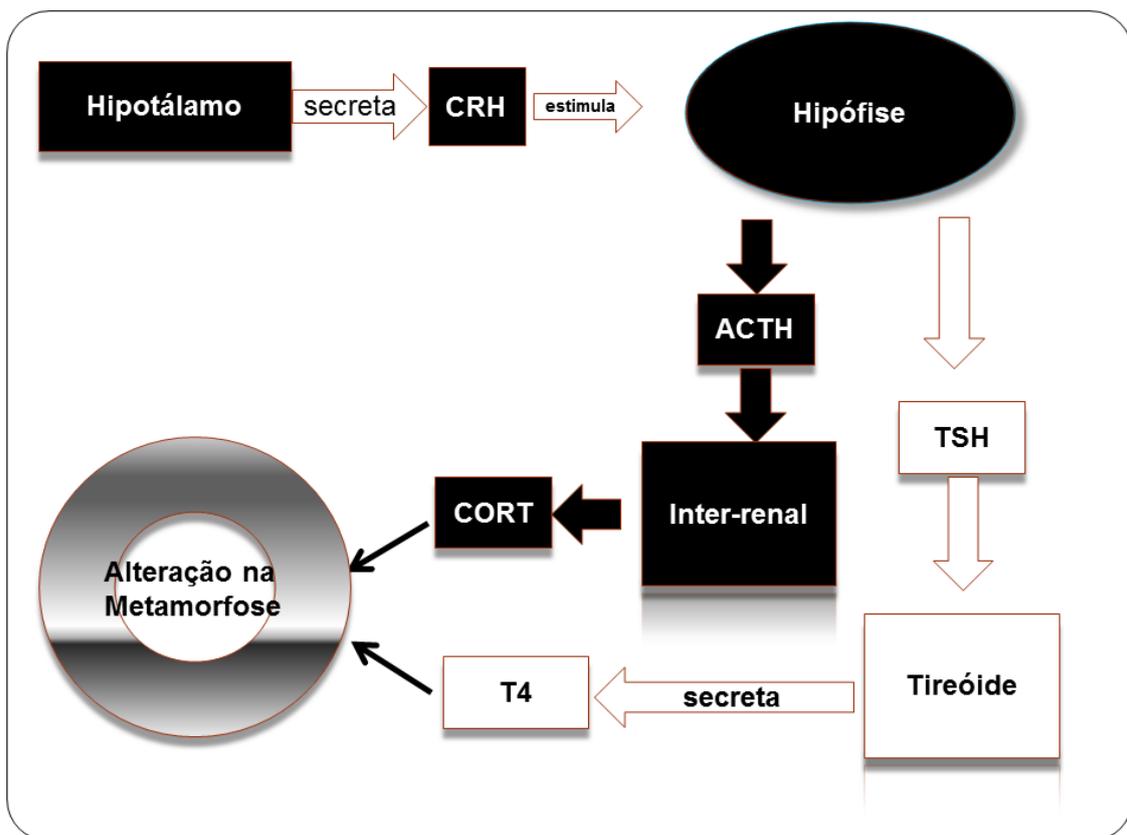


Figura 2 Secreção hipotalâmica do hormônio corticotrópico, o qual estimula a hipófise, que por sua vez, secreta os hormônios TSH, estimulante da tireoide, e o adrenocorticotrópico (ACTH), que estimula a inter-renal. A inter-renal secreta o hormônio glicocorticoide (corticosterona) e a tireóide o hormônio  $T_4$ . estes dois atuam diretamente na alteração da metamorfose.

Estes valores também apresentam variações relacionadas ao ritmo da alimentação, a atividade do animal e a fatores estressores naturais e antropogênicos (Glennemeier e Denver 2002; Wright et al. 2003; Burraco et al.

2013). Estudos com fungicidas mostraram um aumento no nível de corticosterona em girinos de *Bufo cognatus*, além do aumento na taxa de metamorfose, revelando-se um agente estressor (Hartman et al. 2014); McMahon et al. (2011), em experimento com fungicida a base de clorotalonil, verificou respostas diferentes da corticosterona em medidas do hormônio no corpo dos anfíbios, com níveis mais altos e mais baixos. Por outro lado, em aves *Turdus merula*, a corticosterona mostrou-se um limitador de estresse em animais que vivem em regiões urbanas em relação aos que vivem em florestas (Martin et al. 2010). E ainda, em peixes expostos a derramamento de óleo, que, além de sofrerem dificuldades respiratórias e de locomoção quando ficam presos na camada de petróleo, apresentaram falhas hepáticas, destruição do epitélio intestinal quando houve a ingestão do óleo. A exposição de ovos e larvas de peixes no petróleo causa aumento da taxa de má formação, crescimento lento e diminuição do desempenho natatório, além de afetarem nas funções endócrinas normais de peixes expostos com alterações na biossíntese de hormônios glicocorticoides (GC) (Berti et al. 2009), aumentando os níveis de corticoides no plasma e o tamanho do baço em *Carassius auratus* (Lister et al. 2008).

A CORT (hormônio corticosteroide) age no fígado, no músculo e no tecido adiposo para suprir o organismo com combustíveis para uma iminente situação de atividade intensa. Este hormônio tem uma ação relativamente lenta, alterando o metabolismo, mudando os tipos e as quantidades de certas enzimas que são sintetizadas nas suas células-alvo (Nelson e Cox 2014). Como há redução dos depósitos de proteínas em praticamente todas as células corporais, exceto no fígado, onde os níveis de proteínas hepáticas são aumentados, pode haver a redução do transporte de aminoácidos para os tecidos extra-hepáticos. Os corticóides parecem exercer um efeito direto sobre o aumento da oxidação de ácidos graxos nas células (Guyton e Hall 2006; Moyes e Schulte 2010). Além disto, os níveis de corticosterona em larvas de anfíbios, assim como em outros animais, estão associados com a intensidade de atividade exploratória, índice metabólico basal, como também exercem um

papel importante na modulação de resposta imune (Glennnermeier e Denver 2002).

O fígado desempenha inúmeras funções, não obstante ele seja, igualmente, um órgão discreto com muitas de suas funções se relacionando reciprocamente, possuindo uma elevada taxa metabólica, sintetizando e processando múltiplas substâncias que serão transportadas para outras áreas do corpo. Quase toda a síntese de lipídios a partir dos carboidratos e proteínas ocorre no fígado. Além disso, diversos hormônios secretados pelas glândulas endócrinas são quimicamente alterados ou excretados pelo fígado, incluindo a tiroxina, a corticosterona, entre outros. A lesão hepática pode levar ao excesso de acúmulo de um ou mais hormônios, provocando uma hiperatividade dos sistemas hormonais, e assim, alterando o desenvolvimento, padrões de crescimento e reprodutivos (Guyton e Hall 2006; Moyes e Schulte 2010).

## **1.5 Glicose**

A glicose ocupa uma posição central no metabolismo de plantas, animais e muitos microorganismos. É relativamente rica em energia potencial, sendo assim, um bom combustível para o organismo: a oxidação completa da glicose a dióxido de carbono e água ocorre com uma boa variação de energia livre, de aproximadamente 2.840kJ/mol. Por meio do armazenamento da glicose na forma de polímero de alta massa molecular, a célula pode estocar grandes quantidades desta hexose. Quando a demanda de energia aumenta, a glicose será liberada destes polímeros de armazenamento intracelulares e utilizada para produzir ATP, de maneira anaeróbia ou aeróbia (Nelson e Cox 2014).

A glicose também é uma molécula precursora extremamente versátil, capaz de suprir uma enorme variedade de intermediários metabólicos em reações biossintéticas; à vista disso, sabe-se que o efeito metabólico mais amplamente conhecido dos glicocorticoides é sua capacidade de estimular a gliconeogênese (a formação de carboidratos a partir de aminoácidos e de algumas outras substâncias, como ácido láctico) pelo fígado, cuja atividade

aumenta frequentemente de seis a dez vezes (Guyton e Hall 2006; Nelson e Cox 2014) mais especificamente, hormônios como a CORT possuem papéis metabólicos na regulação da glicose (Wright et al. 2003). Finalmente, embora menos específico que outros parâmetros, hematológicos, a glicose pode estar envolvida na sensibilidade a certos poluentes (van der Oost et al. 2003).

## 1.6 Ácido Úrico

O ácido úrico é o produto de excreção nitrogenada do catabolismo de aminoácidos e de purinas em diversos animais, sendo produto final em insetos, aves e répteis principalmente, e produto intermediário em animais como os anfíbios (cujo produto final principal é a uréia). (Nelson e Cox 2014). O ácido úrico é produzido, na sua fase final, pela conversão de hipoxantina a xantina e xantina a ácido úrico, catalisado pela enzima xantina oxido-redutase (XOR). O ácido é ainda degradado até a alantoína pela ação da enzima urato-oxidase (Glantzounis et al. 2005).

Após sua reciclagem, provas indiretas mostraram que o urato (ácido úrico em pH neutro) pode exercer funções *in vivo* como antioxidante, na qual foi produzida alantoína em pacientes com doenças ligadas a estresse oxidativo (Hermes-Lima 2004). Em aves, as propriedades antioxidantes do ácido úrico e sua alta concentração no plasma sugerem um possível mecanismo de proteção a danos oxidativos: em galinhas, o aumento da concentração deste ácido no plasma reduziu a atividade oxidativa dos leucócitos enquanto a queda na concentração foi associada ao aumento na atividade oxidativa leucocitária (Tsahar et al. 2006).

Ademais, o ácido úrico também foi produzido em condições de isquemia-reperfusão, durante a oxidação de hipoxantina e xantina pela enzima XOR. Esta enzima existe em duas formas: xantina dehidrogenase (XDH) e xantina oxidase (XO). Em condições fisiológicas, é encontrada na maioria com a forma XDH, em níveis altos no fígado. A XDH tem uma grande afinidade por Nicotinamida Adenina Dinucleotideo oxidado ( $\text{NAD}^+$ ) como acceptor de elétrons quando catalisa a oxidação de hipoxantina e xantina a urato. Em condições de

isquemia (estresse) o ATP é degradado em adenina e xantina, e, ao mesmo tempo, aumenta a conversão de XDH a XO; conseqüentemente, XO usa moléculas de oxigênio ao invés de  $\text{NAD}^+$  durante a reperfusão levando a formação do radical Superóxido ( $\text{O}_2^-$ ). Como visto na seção 1.2 *Defesas antioxidantes*, o ânion superóxido pode formar peróxido de hidrogênio através da atividade da SOD (Glantzounis et al. 2005), demonstrando a atividade destas enzimas através do ácido úrico.

### 1.7 Índice Hepatosomático e Fatores de Condição

Fatores de Condição, como o índice K que quantifica uma relação entre o peso dos órgãos, ou do animal inteiro e o comprimento total do mesmo. Este valor reflete o balanço energético dos animais, dentre estes podemos destacar o  $K_{\text{geral}}$ , o  $K_{\text{hepático}}$  e o  $K_{\text{intestinal}}$  que têm sido empregados em diversos estudos especialmente em animais aquáticos, assim como seu investimento energético em condições adversas do meio ambiente, (Nunes et al. 2011)

Já o Índice Hepatosomático (IHS) corresponde à massa relativa do fígado em comparação à massa total do animal (Fang et al. 2009). O IHS contribui com informações sobre o estado nutricional, já que o fígado é um importante depósito de armazenamento de energia (Sol et al. 2008). Alterações no IHS podem refletir mudanças de fatores extrínsecos, como toxicidade da água, mudança de alimentação e no ambiente (Yang et al. 1992; Sol et al. 2008; Fang et al. 2009).

### 1.8 Justificativa e Objetivo

Os anfíbios estão entre os animais que são indiretamente expostos a produtos químicos, e esta exposição pode estar associada a grande perda de diversidade biológica que tem sido observada ao longo dos últimos anos (Johansson et al. 2006), reforçada pelo alto índice de extinção destes animais – cerca de um terço dos amphibia estão ameaçados de extinção, sendo possivelmente um dos fatores os elementos contaminantes (MacCallum 2007).

Estudos desenvolvidos por Dornelles e Oliveira (2014) com formulações comerciais de Glifosato, Atrazina e Quinclorac, em concentrações encontradas em ambiente natural, mostram que a exposição de girinos de rã touro conduziu a uma drástica redução das reservas de carboidratos, lipídios e proteínas nos tecidos branquial, muscular, renal e hepático conduzindo também, a um aumento da lipoperoxidação nestes tecidos; com o Quinclorac exercendo o mais potente efeito sobre os animais; apesar de nenhum deles conduzir a uma mortalidade significativa nas concentrações estudadas.

Além deste, muitos trabalhos científicos tem mostrado que vários fatores, sejam antropogênicos ou não, exercem pressões ambientais afetando drasticamente as comunidades de anfíbios. Segundo alguns cálculos, a extinção de várias espécies ameaçadas parece eminente, sendo difícil de explicar se esta aceleração sem precedentes provem de fenômenos naturais (MacCallum 2007). Ademais, destacam-se os químicos exógenos que chegam ao meio ambiente, o que reveste de significância o desenvolvimento da presente pesquisa.

Respostas biológicas a estímulos ambientais também são descritas como fatores responsáveis por alterações nos mecanismos moleculares, mudanças histopatológicas (representando um indicativo de ação cumulativa de estressores exógenos a um organismo específico) e disfunções celulares em animais expostos a poluentes. Em diversos organismos aquáticos, alterações histopatológicas por exposição a níveis relativamente baixos de poluição têm sido claramente demonstrados, seja em laboratório ou campo (Bueno-Guimarães et al. 2001).

Finalmente, a rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) é um excelente modelo biológico apresentando grande plasticidade. É um ranídeo de porte avantajado, podendo atingir 20 centímetros de comprimento do focinho a região sacra, pesando cerca de 600 gramas aos dois anos de idade, embora possa atingir pesos bem maiores com o decorrer da idade (Vieira 1993), além de crescimento corpóreo no decorrer de quase todo período de vida, se reproduz em taxas elevadas, apresentando uma temporada reprodutiva anual

prolongada. Tem hábitos alimentares generalistas e alta flexibilidade adaptativa (Cunha e Delariva 2009). Tais características tenderiam a proteger uma espécie como esta de alterações por xenobiontes - porém, não é o demonstrado atualmente, pelos trabalhos citados como descrito anteriormente – o que nos leva a refletir nas consequências para espécies nativas, normalmente mais suscetíveis.

Levando-se em conta a necessidade de maiores informações sobre a interação entre herbicidas em concentrações próximas as encontradas em ambientes naturais e animais vertebrados como os supracitados, o presente trabalho teve como objetivo avaliar possíveis mudanças nos níveis de corticosterona, glicose e ácido úrico no plasma assim como analisar, no fígado as defesas antioxidantes enzimáticas (SOD, CAT, GST) e os níveis de LPO em girinos de rã touro (*Lithobates catesbeianus* – Shaw 1802) expostos a baixas concentrações do herbicida Facet<sup>®</sup>, tendo como ingrediente ativo o Quinclorac.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Os girinos de *Lithobates catesbeianus*

Para o proposto da presente pesquisa, foram utilizados 79 girinos de rã touro (*Lithobates catesbeianus* Shaw 1802) provenientes do ranário RanaSul, localizado no município de Imbé, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Todos os animais com quatro meses de vida, no estágio 25 (pró-metamórfico) conforme tabela de Gosner (1960) e, quanto a escolha destes, priorizou-se um comprimento semelhante, como recomendado por Landis e Yu (2004), ausentes os membros anteriores e posteriores, consoante ao procedimento já padronizado por Dornelles e Oliveira (2014). A figura 3 mostra um dos 79 girinos, com tamanho real de aproximadamente 5,5cm.



Figura 3: girino de rã touro com aproximadamente 4 meses de vida (Foto: Mariana Coltro, câmera Nikon D5200 f/3,8)

Os animais foram transportados em sacos plásticos aerados até o Laboratório de Fisiologia Comparada na Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), onde houve a medição e pesagem individual. Após, os mesmos foram divididos aleatoriamente em seis grupos, a saber: Grupo Controle 7 dias (C7), com n=12; grupo Controle 14 dias (C14), com n=12; grupo Concentração 1 (X1), onde n=16; Concentração 2 (X2), Concentração 3 (X3) e, finalmente, Concentração 4 (X4), estes com n=13 em cada grupo, totalizando 79 girinos.

A densidade de estocagem adequada a ser utilizada na criação de girinos de rã-touro, mesmo em tanques convencionais, ainda não está bem definida; contudo, Adams e Bruinsma (1987) indicam uma densidade de 1 a 2 girinos/L, enquanto Albinati et al. (1998) sugerem o uso de 0,10 girinos/L para o cultivo de rã touro, em condições práticas e, Hayashi et al. (2004) sugerem uma densidade de até 2,5 girinos por litro de água. Neste estudo utilizamos uma densidade de 0,2 até 0,27 indivíduos por litro de água do aquário ou um animal para cerca de 2 a 3 litros de água.

Uma vez que houve manipulação e eutanásia destes, a pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) da PUCRS e seu uso permitido sob autorização nº14/00384.

Os animais foram colocados em aquários com volume de 60L de água, aerados constantemente, em fotoperíodo de 12/12h (claro/escuro) alimentados *ad libitum* com ração uma vez ao dia, correspondendo a cerca de 5% de sua massa corporal e mantidos em pH de 7,4, em temperatura e fotoperíodo naturais. Cabe ressaltar que os parâmetros de qualidade da água dos aquários foram monitorados diariamente, durante todo o período experimental de 14 dias, onde os valores do pH mantiveram-se entre 7,2 e 7,4 e os níveis de amônia permaneceram estáveis, assim como a temperatura da água.

O período de aclimação totalizou 7 dias, e, no 8º, o herbicida foi adicionado nos aquários, utilizando-se a formulação comercial de Facet® (500g quinclorac/Kg) nas seguintes concentrações de ingrediente ativo: X1=0,05;

X2=0,10; X3=0,20 e X4=0,40 $\mu$ g/L. O Facet<sup>®</sup> foi pesado em balança de precisão (0,001g) dissolvido em água destilada para preparo de uma solução mãe concentrada (2,5g de i.a./L), da qual foram retiradas alíquotas que foram adicionadas proporcionalmente a água dos aquários para obtenção das concentrações especificadas acima. Tais concentrações foram baseadas em valores encontrados na água em ambiente natural, como citados por Lambropoulou et al. (2002), Silva et al. (2003); Marchezan et al. (2007), Silva et al. (2009), Paulino et al. (2012), e principalmente, aquelas utilizadas por Dornelles e Oliveira (2014).

Após o período de aclimação de 7 dias, os animais do grupo C7 foram atordoados em banho de água gelada, coletadas amostras de sangue através de punção cardíaca (figura 4), com seringa heparinizada, sendo então eutanasiados por transecção medular total. Após, foram pesados, medidos, o fígado extraído e congelado em nitrogênio líquido. Os mesmos procedimentos foram utilizados nos animais dos grupos subsequentes após os 14 dias de permanência em laboratório.



Figura 4: amostra de sangue sendo coletada através de punção cardíaca com seringa heparinizada (Foto: Mariana Coltro, câmera: Nikon D5200 f/4)

Após a excisão do fígado, este foi imediatamente congelado e pesado para posterior dosagem da atividade das enzimas antioxidantes e dos níveis de lipoperoxidação. As amostras de sangue foram centrifugadas a 4°C, por 10

minutos, a 628g para a separação do plasma, sendo este congelado para posterior quantificação dos níveis de corticosterona, glicose e ácido úrico.

## 2.2 Análises Bioquímicas

Todas as determinações experimentais foram feitas através de métodos espectrofotométricos, em duplicata (duas leituras de cada amostra); sendo utilizado para a corticosterona o aparelho EZ read 400 microplate reader biochrom e, para os demais parâmetros o CARY 3E – UV – Visible Spectrophotometer Varian.

***Determinação dos Metabólitos Plasmáticos:*** os resultados foram expressos em mg/dL para a glicose e ácido úrico e, para a corticosterona este foram expressos em ng/mL de plasma.

**Glicose:** Os níveis de glicose foram quantificados através do método da glicose oxidase com emprego do kit da Labtest, onde a glicose oxidase catalisa a reação da glicose formando peróxido de hidrogênio que reage com o 4-aminoantipirina a fenol, sob ação de uma peroxidase, através de uma reação oxidativa de acoplamento formando uma antipirilquinona vermelha. A intensidade de coloração formada é proporcional à concentração de glicose na amostra, sendo determinada em 500nm de absorbância.

**Ácido Úrico:** os níveis de ácido úrico foram medidos pela oxidação deste através da uricase à alantoina e peróxido de hidrogênio com emprego do kit da Labtest-Liquiform. O peróxido de hidrogênio, na presença de peroxidase, reage com o DHBS e a 4-aminoantipirina formando o cromogênio antipirilquinonimina. A intensidade da cor vermelha formada é diretamente proporcional à quantidade de ácido úrico na amostra, sendo determinada em 525nm de absorbância.

**Corticosterona (CORT):** os níveis de CORT foram quantificados através do método de enzaimunoensaio (ELISA) com emprego do kit da

Enzo Life Science (ADI-900-097) com limite de detecção de 27pg/mL e extensão de ensaio de 160–100.000 pg/mL, sendo detectados em 405nm de absorbância, tal kit pode ser utilizado para a quantificação de corticosterona no plasma de diferentes espécies de vertebrados, desde peixes até mamíferos conforme material do fabricante publicado em <http://www.enzolifesciences.com/ADI-900-097/corticosterone-elisa-kit>.

Os resultados foram expressos em ng/mL de plasma, obtidos a partir do cálculo do percentual de ligação, com a subsequente logaritmização destes resultados a partir de uma curva padrão obtida com concentrações conhecidas do hormônio (Figura 5); apresentando uma variação intraensaio de 2,23%, sendo esta calculada a partir das réplicas obtidas com os padrões.

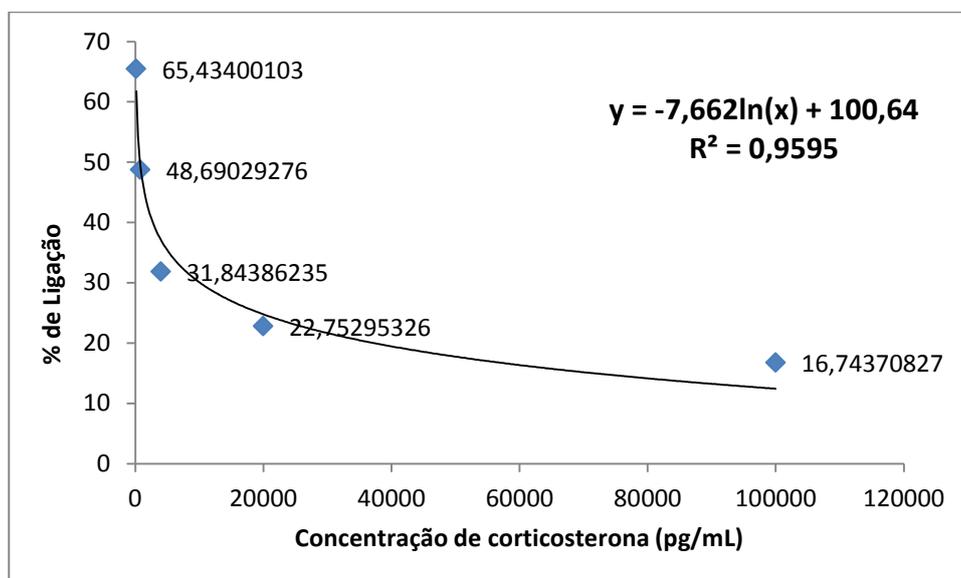


Figura 5: Curva Padrão obtida com concentração crescente de corticosterona

### **Determinação do Balanço Oxidativo**

**Preparação do homogeneizado:** para cada grama de tecido foi acrescentado tampão fostato (20mM), acrescido de cloreto de potássio (1,15%) e fluoreto de fenil metil sulfonila (PMSF), em concentração final de 1mM (inibidor de proteases); assim para cada grama de tecido utilizou-se 6ml desta solução tampão. O tecido foi homogeneizado em Ultra-Turrax (IKA-WERK), em banho de gelo (0-4°C) até homogeneização total do órgão. Este homogeneizado foi

centrifugado em centrífuga refrigerada (4°C), por 10 minutos, a 628g. O precipitado foi desprezado, o sobrenadante retirado, aliquotado em 4 sub-amostras e congelado em freezer a -20°C para as dosagens posteriores (Llesuy et al. 1985).

### **Dosagem das proteínas totais**

A concentração de proteínas totais no homogeneizado de cada fígado foi determinada com o uso do kit da labtest e como padrão, utilizou-se uma solução de albumina bovina 1 mg/mL (sendo empregado volumes de 50, 100 e 150µL). Após, realizou-se a medida em espectrofotômetro a 545 nm.

### **Medida de Lipoperoxidação**

A Lipoperoxidação (LPO) foi determinada por meio do método das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Esta técnica é bastante utilizada para medir o dano dos lipídios de membrana, porque o ácido tiobarbitúrico reage com os produtos da LPO, entre eles o malondialdeído (MDA) e outros aldeídos. A técnica consiste em aquecer o material biológico a ser testada na presença de ácido tiobarbitúrico, que produz um meio ácido, para medir espectrofotometricamente a formação de um composto corado (base de Schiff). Foram colocados em tubos de ensaio, nesta ordem de adição, 0,5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67%, 0,25 mL de água destilada, 0,75 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% e 0,25 mL do homogeneizado. O TBA reage com produtos da lipoperoxidação formando uma base de Schiff, e o TCA tem a função de desnaturar as proteínas presentes, além de acidificar o meio de reação. A seguir, agitam-se os tubos, os quais foram aquecidos à temperatura de 100° C durante 15 minutos. Após, os mesmos foram resfriados em banho de gelo, e acrescentou-se 1,5 mL de álcool n-butílico, para extrair o pigmento formado. Os tubos foram colocados em agitador (Biomatic) por 45 segundos e centrifugados, por dez minutos a 628g. Por último, retirou-se o produto corado e foi realizada a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 535nm. A concentração de TBA-RS será expressa em nmoles/mg de proteína. (Ohkawa et al. 1979).

### **Enzimas Antioxidantes**

## **1. Superóxido Dismutase (SOD)**

Esta enzima catalisa a reação de dois ânions superóxido, com a consequente formação de peróxido de hidrogênio, que é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas, como a catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx). A velocidade da reação catalisada pela SOD é  $10^4$  vezes maior do que a velocidade da dismutação espontânea em pH fisiológico (Boveris et al. 1983; Southorn e Powis 1988).

A técnica utilizada neste estudo está baseada na inibição da reação do radical superóxido com a adrenalina. A SOD presente na amostra em estudo compete pelo radical superóxido com o sistema de detecção. Dado que não se pode determinar a concentração da enzima nem sua atividade em termos de substrato consumido por unidade de tempo, utiliza-se a quantificação em unidades relativas. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima que inibe em 50% a velocidade de oxidação do detector (adrenalina). A oxidação da adrenalina leva à formação de um produto colorido, o adrenocromo, detectado espectrofotometricamente. A atividade da SOD é determinada medindo a velocidade de formação do adrenocromo, observada a 480nm, em meio de reação contendo glicina-NaOH (50mM, pH 10) e adrenalina (1mM) (Boveris et al. 1983).

## **2. Catalase (CAT)**

A enzima CAT é altamente específica e possui atividade apenas para peróxido de hidrogênio, hidroperóxidos de metila e etila (Webster e Nunn, 1988). A atividade da catalase é diretamente proporcional à taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio, e obedece a uma cinética de pseudo primeira ordem. Sendo assim, a atividade da enzima catalase pode ser medida através da avaliação do consumo do peróxido de hidrogênio (Morgan-Martins 2003). Na realização deste experimento utilizou-se os seguintes reagentes: solução tampão de fosfato de sódio a 50mM e pH 7,4, e peróxido de hidrogênio 0,3M. Em cubeta de quartzo, serão adicionados 955 $\mu$ L do tampão fosfato e 10  $\mu$ L de amostra do tecido, essa cubeta foi colocada em espectrofotômetro e descontada contra um branco de tampão fosfato. Após, adicionou-se 35 $\mu$ L do

peróxido de hidrogênio para o tecido e feito o monitoramento da diminuição da absorvância no comprimento de onda selecionado. Os resultados estão expressos em nmoles por mg de proteína ( $\mu\text{moles de H}_2\text{O}_2$ ), no comprimento de onda de 240 nm. (Boveris e Chance 1973).

### **3. Glutathione S-transferase (GST)**

A atividade da glutathione S-transferase foi medida de acordo com método descrito (Boyland e Chasseaud 1969), o qual consiste na medida da conjugação do 1-cloro 2,4 dinitrobenzeno (CDNB) com a glutathione reduzida (GSH) a atividade é medida com o aumento nos valores da absorvância lida a 340 nm e os resultados expressos em nmoles de conjugado CNDB.  $\text{min}^{-1}.\text{mg}$  proteínas<sup>-1</sup>.

### ***Determinação de Parâmetros de Condição dos Animais***

#### **Fatores de Condição**

Todos os animais foram medidos e pesados no momento de sua chegada ao laboratório para estabelecermos a quantidade de ração a ser utilizada, após foram distribuídos aleatoriamente em seis aquários (C7, C14, X1, X2, X3 e X4). Ao final da aclimação e do período experimental, após a eutanásia todos os animais foram pesados e medidos por grupo experimental. Visto que após a determinação da massa e do comprimento corporal os animais foram distribuídos aleatoriamente nos aquários não podemos estabelecer um incremento em cada grupo experimental; considerando este aspecto optamos por calcularmos um fator de condição corporal (K).

Os fatores de condição traduzem a relação entre o massa total do animal e seu comprimento (K) e a massa do órgão, no caso, o fígado, em relação também ao comprimento do animal ( $K_{\text{hepático}}$ ), refletindo o balanço energético dos animais como descrito anteriormente por Nunes et al (2011; 2015) e expressos através das seguintes fórmulas:

$$K_{\text{total}} = ( P_{\text{total}} / S_{\text{total}}^3 ) \times 1000$$

$$K_{\text{hepático}} = ( P_{\text{fígado}} / S_{\text{total}}^3 ) \times 1000$$

Onde vejamos P como a massa do animal (seja ele total ou do órgão em questão),  $S_{total}$  como o comprimento total do animal.

### **Índice Hepatosomático:**

O índice hepatossomático (IH), ou seja, o percentual da massa do fígado foi obtido em relação ao massa total do indivíduo, conforme método descrito por Grant e Tyler (1983) e Vazzoler (1996) através da seguinte equação matemática:

$$IH(\%)= (PH / PA) \times 100$$

Na equação acima se entende por PH = massa do fígado e PA = massa do animal; os valores são multiplicados por 100 a fim de obter-se a porcentagem na relação.

### **2.3 Análise Estatística**

Os resultados para todos os grupos foram obtidos pelo teste de normalidade por Kolmogorov-Smirnov tendo todos os grupos, com exceção da SOD, apresentado uma distribuição não paramétrica e por isto, foi realizado o teste de comparação múltipla de Kruska-Wallis, seguido pelo teste para amostras com n desigual de Dunn para detectar as diferenças entre os grupos experimentais.

Para análise da massa total, do comprimento corporal e do índice hepatossomático foram utilizados análise de variância (ANOVA) e se constatada diferença entre as médias, foi aplicado o teste das mínimas diferenças (LSD) para identificar quais as médias diferiam entre si significativamente.

Foi adotado o nível de significância de 5%, e as análises estatísticas foram realizadas com o programa BioEstatistic, versão 5.0.

Para todos os parâmetros analisados, com exceção do ácido úrico e massa corporal, não existiu diferença entre o período de aclimatação (C7) e o controle tempo de cultivo total (C14), portanto todos os grupos experimentais

foram comparados com o C14 em função do tempo de vida semelhante entre os animais.

### 3. RESULTADOS

Para a maioria dos parâmetros analisados, não existiu diferença entre o período de aclimação, grupo controle 7 dias (C7) e o período de cultivo, grupo controle 14 dias (C14), nem mesmo em função do tempo de vida diferente destes animais, um mantido por sete dias no laboratório e o outro por 14 dias, ambos nas mesmas condições de cultivo (tabela 1). Apenas para os níveis de ácido úrico encontramos uma variação significativa, onde observamos um aumento de 94,05% de seus níveis totais no grupo C14 (1,568mg/dL) em relação ao grupo C7 (0,808mg/dL).

**Tabela 1:** Resultados obtidos para os diferentes parâmetros analisados no plasma e no tecido hepático de animais do Grupo Controle 7 dias (C7) e Controle 14 dias (C14). As letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos C7 e C14, para um  $p < 0,05$ .

Parâmetro	Controle 7 dias	Controle 14 dias
<b>Plasma:</b>		
Corticosterona	4,13±0,302ng/mL	4,11±0,163ng/mL
Glicose	10,74±3,583mg/dL	10,97±4,906mg/dL
<b>Ácido Úrico</b>	<b>0,808±0,244<sup>a</sup>mg/dL</b>	<b>1,568±0,64<sup>b</sup>mg/dL</b>
<b>Fígado:</b>		
Lipoperoxidação (LPO)	15,406±2,039 $\mu$ moles/mg de proteína	11,017±2,337 $\mu$ moles/mg de proteína
Superóxido Dismutase (SOD)	20,802±6,272 U/mg de proteína	24,096±6,955 U/mg de proteína
Catalase (CAT)	110,038±13,976 pmoles/mg proteína.min	105,783±26,413 pmoles/mg proteína.min.
Glutaciona S-Transferase	0,242±0,049 mmoles/mg proteína.min.	0,167±0,034 mmoles/mg proteína. min.
Proteínas totais	9,870±0,907 mg/g de tecido	10,776±2,313 mg /g de tecido
Índice K	0,00943±0,00025g/mm	0,00951±0,00032g/mm
Fator $K_{\text{hepático}}$	0,000788±0,000083g/mm	0,000664±0,000084g/mm
Índice Hepatosomático	8,305%±0,833	7,098%±0,9551

Ao compararmos os valores da massa corporal obtidos para os animais que chegaram ao laboratório (inicial) e o controle sete dias (C7) não observamos diferença significativa; contudo, ao comparamos tal valor com o observado para os girinos após 14 dias (C14) de cultivo sem exposição ao herbicida verificamos um incremento da massa corporal. Os animais expostos às concentrações de 0,05; 0,10 e 0,40 $\mu$ g/L mostrando uma diminuição ( $p < 0,05$ ) da massa corporal em relação ao controle quatorze dias (C14) e ao X3 (0,20  $\mu$ g/L) (Tabela 2).

Com relação ao comprimento corporal total observamos para os animais que chegaram ao laboratório (inicial) e o controle sete dias (C7) e quatorze dias (C14) uma diferença significativa, com um incremento de 10 e 12% respectivamente; contudo, não houve diferença entre os grupos C7 e C14. Já para os animais expostos quando comparados ao controle quatorze dias verificamos apenas que a concentração mais elevada do pesticida (0,40µg/L) determinou uma ausência de crescimento em comprimento dos animais, mostrando uma diminuição de cerca de 9% (Tabela 2).

**Tabela 2:** Resultados obtidos para a massa corporal e comprimento dos animais na chegada ao laboratório (inicial), após sete dias de aclimação (C7), quatorze dias de permanência no laboratório (C14) e expostos a diferentes concentrações do herbicida (X1=0,05µg/L; X2=0,10µg/L; X3=0,20µg/L e X4= 0,40µg/L). O asterisco (\*) representa diferença significativa entre os valores iniciais e as letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos experimentais

Grupos	Massa Final (gramas)	Comprimento (mm)
Inicial	2,920±0,328	62,60±1,25
C7	3,186±0,333	68,83±2,35*
C14	3,457±0,351 <sup>*,a</sup>	70,63±2,25 <sup>*,a</sup>
X1	2,581±0,231 <sup>b</sup>	66,65±2,28 <sup>a</sup>
X2	2,658±0,242 <sup>b</sup>	67,32±2,65 <sup>a</sup>
X3	3,413±0,363 <sup>a</sup>	70,11±2,65 <sup>a</sup>
X4	2,514±0,186 <sup>b</sup>	64,36±2,24 <sup>b</sup>

Salientamos também que não houve mortalidade em nenhum grupo, nem nos expostos a diferentes concentrações do herbicida Quinclorac o que denota a boa qualidade do cultivo e do uso de concentrações sub letais de herbicida.

### 3.1 Determinações no Plasma:

**Ácido Úrico:** verificou-se diferença significativa entre os grupos controle 7 dias e o controle 14 dias (tabela 1). Para os grupos expostos ao herbicida, verificou-se uma diminuição gradual dos níveis deste elemento atingindo uma redução significativa de 50,82% na concentração X4 (0,04µg/L) quando comparada ao grupo C14, com valores de 0,771mg/dL e 1,568mg/dL, respectivamente; sendo

este também, diferente em relação as concentrações X1(0,05µg/L) e X2(0,10µg/L) ( $p < 0,05$ ), conforme a figura 6.

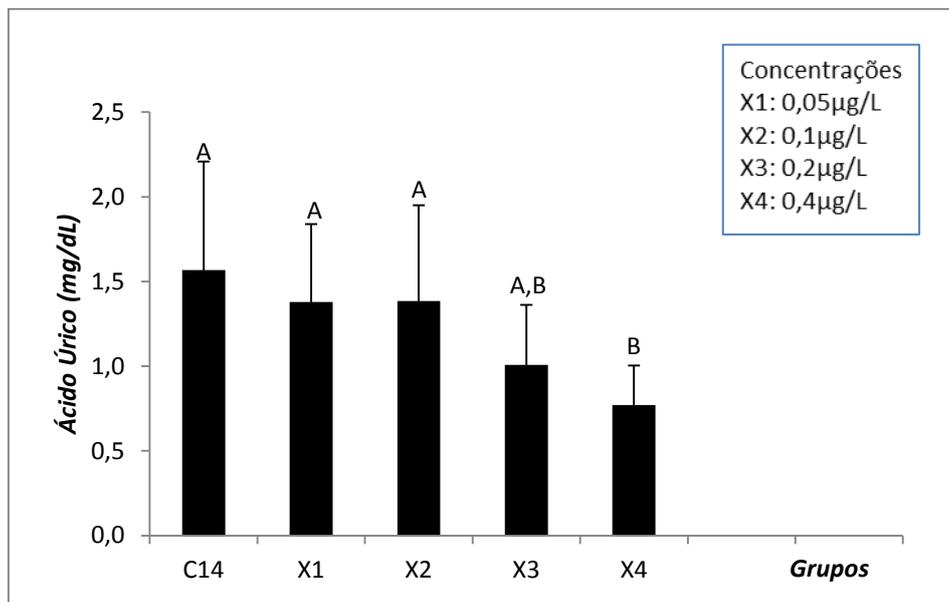


Figura 6: Níveis de ácido úrico no plasma de girinos mantidos em laboratório por 14 dias (C14) e expostos por 7 dias a diferentes concentrações de Facet® princípio ativo quinclorac. Os resultados são expressos como a média±erro padrão. Letras diferentes indicam diferença entre os grupos experimentais para um  $p < 0,05$

**Glicose:** a glicose apresentou uma diminuição significativa nos seus níveis no grupo X1 (0,05µg/L) somente em relação ao grupo X3 (0,20µg/L), mostrando neste caso uma diminuição de 74,63%. Em termos de valores, a concentração de glicose plasmática foi de 3,288mg/dL no grupo X1 e de 12,931 mg/dL no grupo X3 (figura 7).

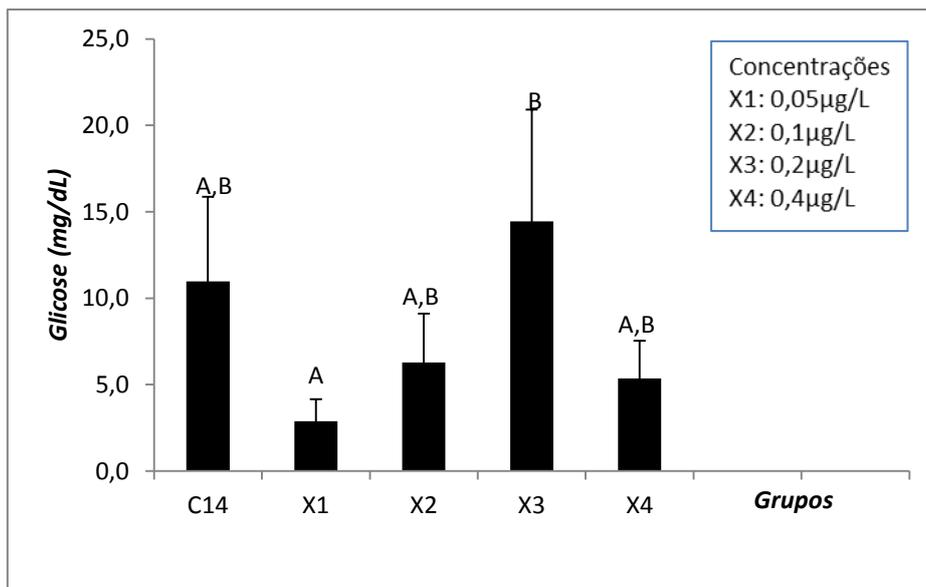


Figura 7: Níveis de glicose no plasma de girinos mantidos em laboratório por 14 dias (C14) e expostos por 7 dias a diferentes concentrações de Facet<sup>®</sup>, princípio ativo quinclorac. Os resultados são expressos como a média  $\pm$  erro padrão. Letras diferentes indicam diferença entre os grupos experimentais para um  $p < 0,05$

**Corticosterona (CORT):** quanto aos níveis de corticosterona plasmáticos verificamos uma diferença significativa entre os grupos X2 (concentração de 0,1µg/L do herbicida) em relação ao grupo X4 (concentração de 0,4µg/L), onde observamos uma redução de 25,49% dos níveis deste hormônio, com valores de X2=4,381ng/mL e X4=3,264ng/mL, respectivamente, nestes grupos, como mostra a figura 8.

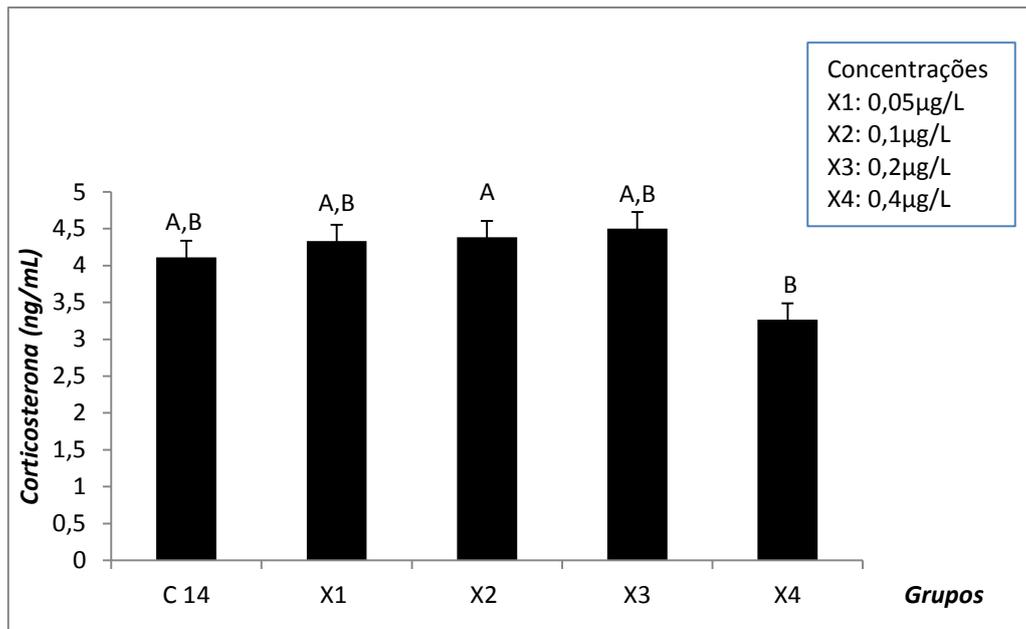


Figura 8: Níveis de corticosterona no plasma de girinos mantidos em laboratório por 14 dias (C14) e expostos por 7 dias a diferentes concentrações de Facet®, princípio ativo quinclorac. Os resultados são expressos como a média±erro padrão. Letras diferentes indicam diferença entre os grupos experimentais para um  $p < 0,05$

### 3.2 Determinações no Fígado

**Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS):** no presente experimento, houve diferença significativa entre os níveis de TBARS do grupo exposto à concentração X2 do herbicida (0,1µg/L), os quais atingiram a média de 26,9µmoles de TBARS/mg de proteínas em relação ao grupo controle (C14) onde observamos um valor médio de 11,01µmoles/mg de proteínas (figura 9), evidenciando um aumento da LPO de 144,32%.

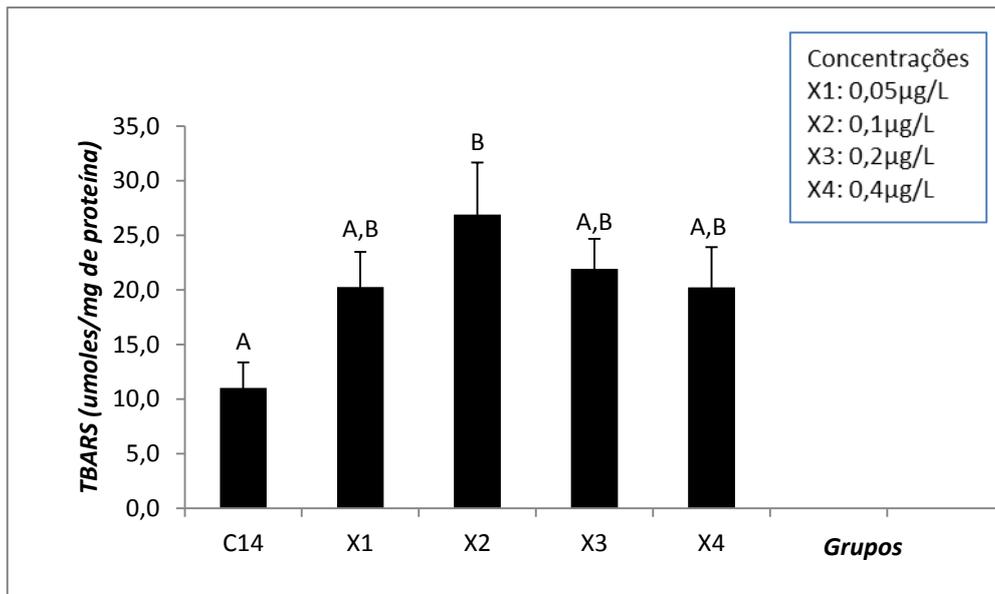


Figura 9: Níveis de lipoperoxidação hepática de girinos mantidos em laboratório por 14 dias (C14) e expostos por 7 dias a diferentes concentrações de Facet<sup>®</sup>, princípio ativo quinclorac. Os resultados são expressos como a média±erro padrão. Letras diferentes indicam diferença entre os grupos experimentais para um  $p < 0,05$

**Superóxido Dismutase (SOD):** não existe diferença entre os grupos expostos e o controle C14 ( $p > 0,05$ ); contudo, existe diferença significativa entre os níveis de atividade da SOD dos girinos expostos à concentração de 0,05 µg/L (X1) e os animais expostos a concentração X2 (0,1 µg/L), com um incremento de cerca de 59,15%; como também entre a maior concentração X4(0,4 µg/L) do herbicida, com uma redução de 55,99% em relação à X2. Verificamos também, uma diferença entre a concentração mais elevada (X4) e a X3 (0,2 µg/L) de quinclorac, com uma redução de 51% (figura 10).

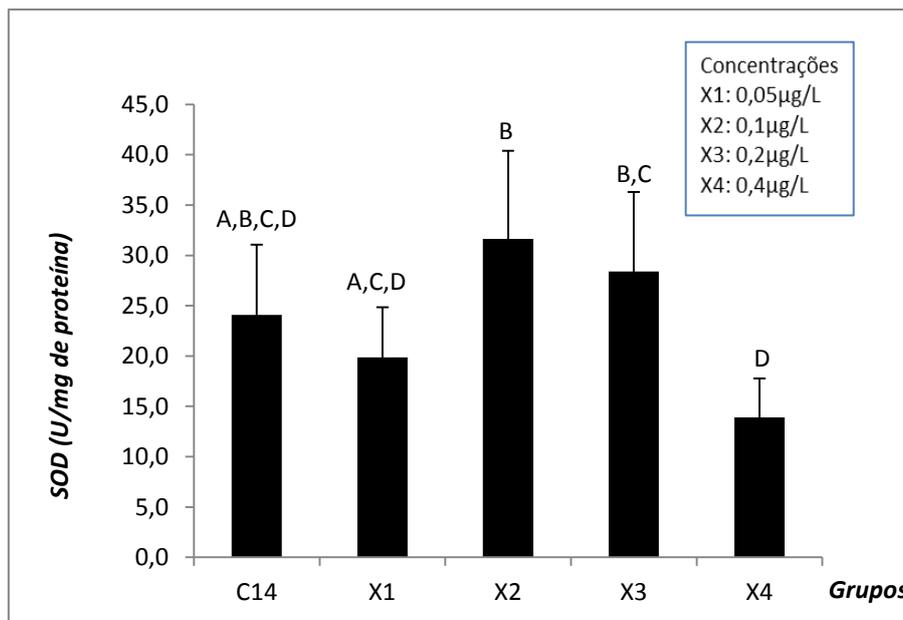


Figura 10: Níveis da atividade da Superóxido Dismutase (SOD) hepática de girinos mantidos em laboratório por 14 dias (C14) e expostos por 7 dias a diferentes concentrações de Facet<sup>®</sup>, princípio ativo quinclorac. Os resultados são expressos como a média±erro padrão. Letras diferentes indicam diferença entre os grupos experimentais para um  $p < 0,05$

**Catalase (CAT):** não existe diferença da atividade da CAT quando comparamos os grupos expostos e o controle 14 dias; contudo, a concentração mais elevada do pesticida determina uma diminuição significativa da atividade enzimática em relação à concentração de 0,1ug/L do pesticida (X2 difere de X4). O valor obtido no grupo X4 de 47,08 pmoles/mg de proteínas.minuto evidenciando uma redução de 68,96% em relação ao valor do grupo X2, de 151,70 pmoles/mg de proteína.minuto (figura 11).

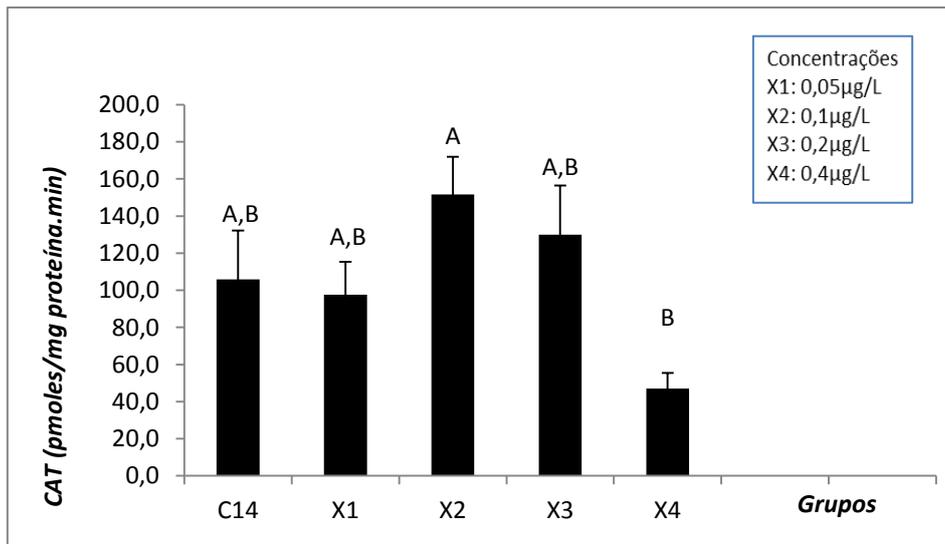


Figura 11: Níveis da atividade da Catalase (CAT) hepática de girinos mantidos em laboratório por 14 dias (C14) e expostos por 7 dias a diferentes concentrações de Facet<sup>®</sup>, princípio ativo quinclorac. Os resultados são expressos como a média±erro padrão. Letras diferentes indicam diferença entre os grupos experimentais para um  $p < 0,05$

**Glutathione S-Transferase (GST):** No grupo denominado X2, cuja concentração do herbicida foi de 0,1µg/L, a atividade da enzima difere de todos os outros grupos experimentais, exceto de X1 (0,05µg/L) apresentando um aumento significativo da GST (X2=0,447mmoles/mg de proteínas.minuto) em relação ao grupo controle (C14=0,167mmoles/mg de proteínas.minuto), apresentando um incremento de 167,66%; já com relação às concentrações mais elevadas de quinclorac observamos uma diminuição de até 79,23% no caso da concentração X4 (figura 12).

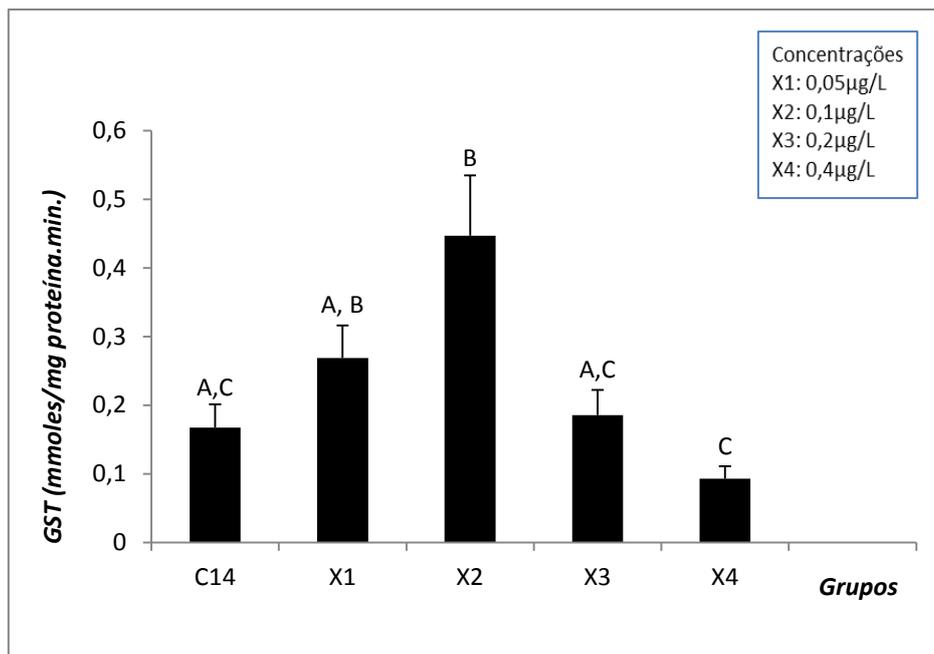


Figura 12: Níveis da atividade da Glutathione S-Transferase (GST) hepática de girinos mantidos em laboratório por 14 dias (C14) e expostos por 7 dias a diferentes concentrações de Facet<sup>®</sup>, princípio ativo quinclorac. Os resultados são expressos como a média  $\pm$  erro padrão. Letras diferentes indicam diferença entre os grupos experimentais para um  $p < 0,05$ .

**Proteínas totais:** nos valores obtidos não existe diferença entre a concentração das proteínas do tecido hepático entre os grupos expostos e o grupo controle (C14), porém, a concentração X2 (0,1µg/L) do herbicida determina uma diminuição significativa, de cerca de 48,41%, da concentração de proteínas em relação à concentração mais elevada do xenobionte (concentração X4=0,4µg/L), conforme figura 13.

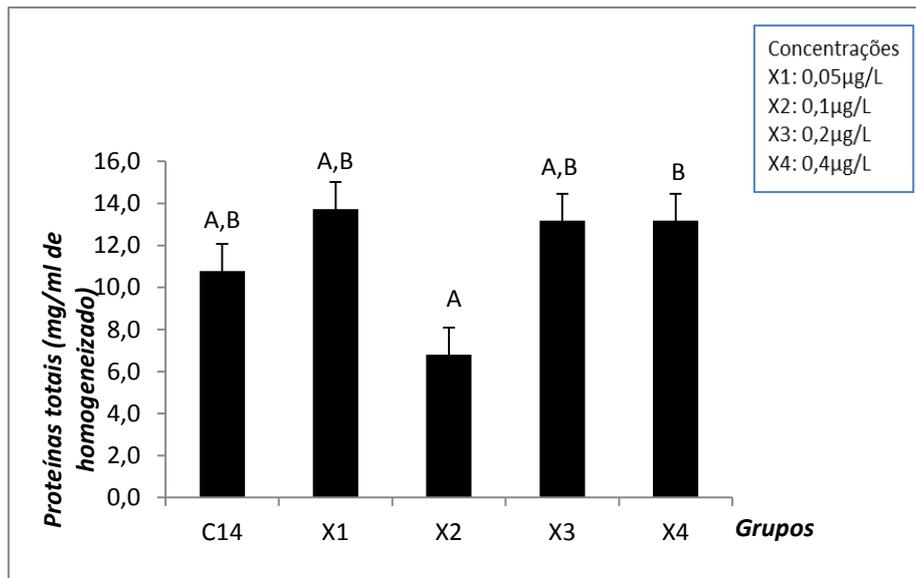


Figura 13: Níveis de proteínas totais no fígado de girinos mantidos em laboratório por 14 dias (C14) e expostos por 7 dias a diferentes concentrações de Facet®, princípio ativo quinclorac. Os resultados são expressos como a média±erro padrão. Letras diferentes indicam diferença entre os grupos experimentais para um  $p < 0,05$ .

**Índice K total e hepático:** O índice K total mostrou uma diferença significativa entre o grupo controle e os animais expostos a 0,1 µg/l de quinclorac, apresentando uma redução neste valor; já quando comparamos os grupos expostos entre si não verificamos diferenças significativas, como mostra a figura 14. O índice  $K_{\text{hepático}}$  mostra uma elevação significativa do grupo X3 (0,2µg/L) em comparação aos demais grupos, com um valor de 0,0091g/mm, o que significa um aumento de 1.270% em relação ao grupo controle e 1.187% ao grupo X1 (figura 15).

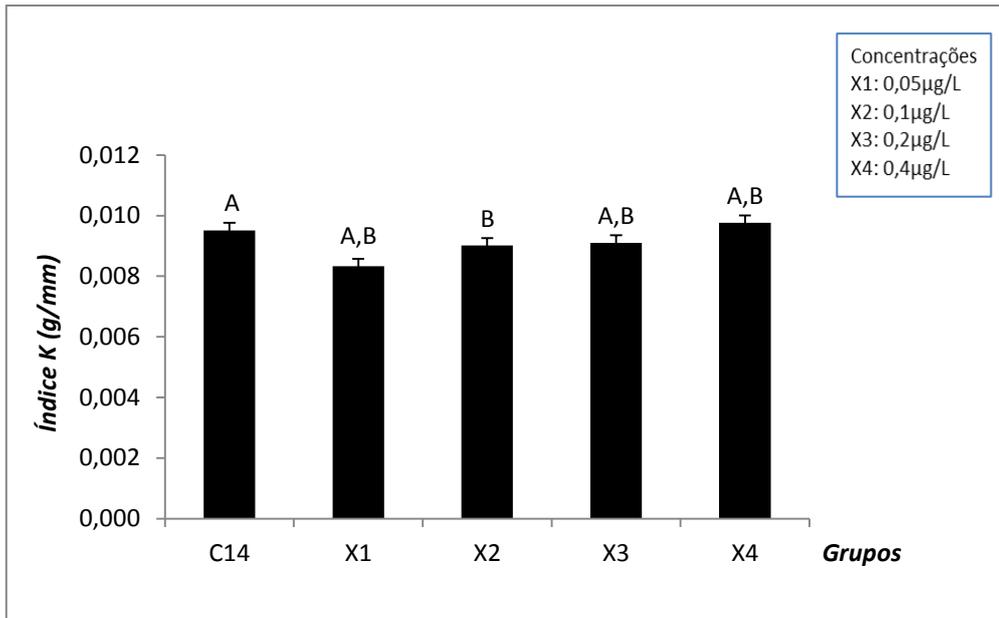


Figura 14: Níveis do Índice K total de girinos mantidos em laboratório por 14 dias (C14) e expostos por 7 dias a diferentes concentrações de Facet<sup>®</sup>, princípio ativo quinclorac. Os resultados são expressos como a média±erro padrão. Letras diferentes indicam diferença entre os grupos experimentais para um  $p < 0,05$

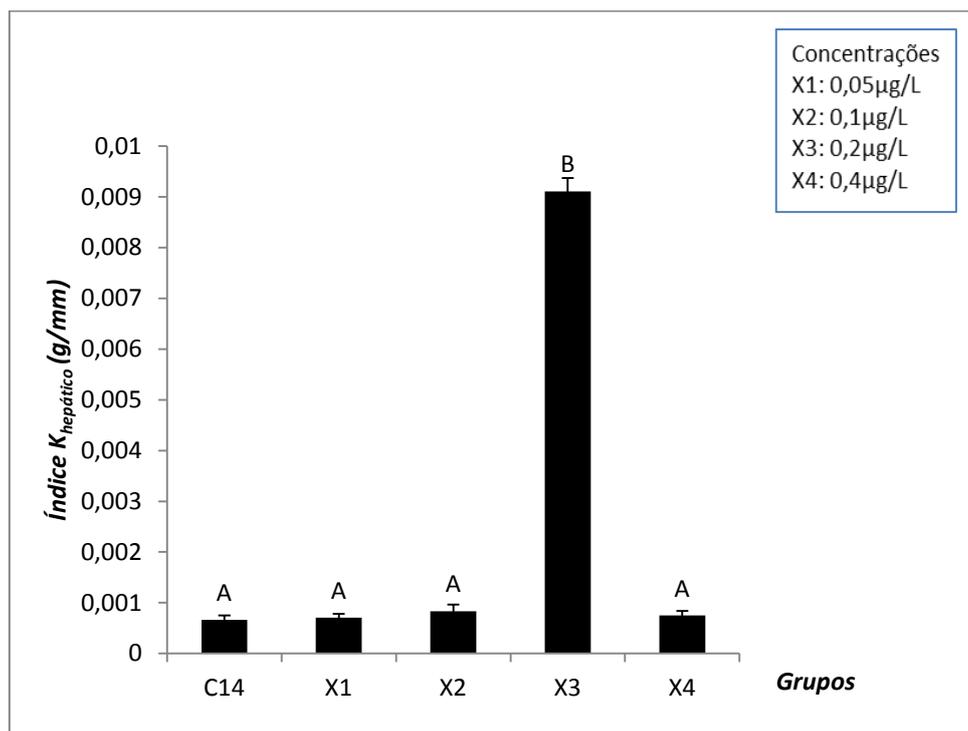


Figura 15: Níveis do Índice K do fígado de girinos mantidos em laboratório por 14 dias (C14) e expostos por 7 dias a diferentes concentrações de Facet<sup>®</sup>, princípio ativo quinclorac. Os resultados são expressos como a média±erro padrão. Letras diferentes indicam diferença entre os grupos experimentais para um  $p < 0,05$

**Índice Hepatosomático:** o índice hepatossomático não apresentou diferenças significativas quando comparamos os diferentes grupos experimentais estudados, conforme a figura 16.

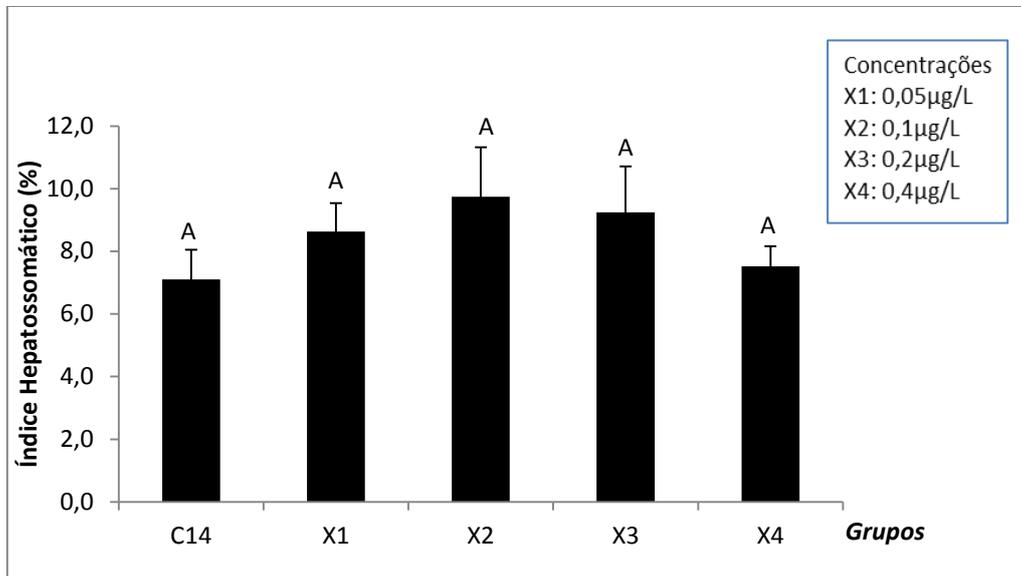


Figura 16: Níveis do Índice Hepatosomático de girinos mantidos em laboratório por 14 dias (C14) e expostos por 7 dias a diferentes concentrações de Facet®, princípio ativo quinclorac. Os resultados são expressos como a média±erro padrão. Letras diferentes indicam diferença entre os grupos experimentais para um  $p < 0,05$ .

## 4. DISCUSSÃO

No presente estudo, não houve mortalidade dos animais em nenhum dos grupos analisados visto que estes foram expostos a concentrações extremamente baixas deste herbicida, tendo estas sido comprovadas como sub-letais por Dornelles e Oliveira (2014). Tal padrão de resposta pode estar relacionado com peculiaridades próprias da espécie utilizada, onde podemos destacar uma alta capacidade adaptativa e plasticidade fisiológica (Vieira 1993).

Apesar de não ter havido mortalidade entre os animais dos diferentes grupos experimentais, os níveis de lipoperoxidação (LPO) apresentaram um incremento até a concentração de 0,1µg/L de quinclorac, ou seja, a concentração chamada X2, sendo que nas concentrações subsequentes, isto é 0,2µg/L (X3) e 0,4µg/L (X4) os níveis de LPO apresentaram um decaimento. Este perfil de resposta da lipoperoxidação (TBARS) difere daquele encontrado por Dornelles e Oliveira (2014) que mostra um incremento dose-dependente dos níveis de TBARS no fígado de girinos de rã-touro quando expostas as mesmas concentrações deste herbicida; contudo, os autores aclimataram os animais em condições diferentes de fotoperíodo (12h de luz: 12h de escuridão) e temperatura de 22±2°C, além deste cultivo ter ocorrido nos meses de inverno. Em nosso trabalho os animais foram mantidos em fotoperíodo natural, com temperatura natural entre 10 e 25°C e o fotoperíodo natural de cerca de 10,5h de luz.

Rodrigues (2014) trabalhando com músculo de rã touro expostas às mesmas concentrações de Quinclorac e mantidas sob as mesmas condições experimentais, isto é com fotoperíodo e temperatura naturais nos meses do outono, verificou que os níveis de lipoperoxidação neste tecido (músculo) apresentaram um padrão geral de diminuição em relação aos Controles 7 e 14 dias. Adicionalmente, tais resultados estão de acordo com os resultados encontrados 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.

Pesticidas podem induzir à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) alterando os mecanismos de defesa antioxidante, incluindo a capacidade de detoxificação além da perda de atividade enzimática, levando ao incremento do estresse oxidativo com a ocorrência, entre outros efeitos, de lipoperoxidação, como resultado da interação entre as EROs e as membranas celulares (Yin et al. 2014). Nesta situação há uma quebra no equilíbrio entre a produção destes radicais livres e os mecanismos de defesa antioxidante do organismo (Abdollahi et al. 2004). A exposição de animais como os anfíbios, a estes herbicidas, pode levar a esta quebra no balanço, resultando em danos maiores, como a mortalidade, ou menores, como alterações de funções e órgãos (Johansson et al. 2006); fato não verificado neste estudo, pois não ocorre mortalidade, o que condiz com a diminuição da lipoperoxidação nas concentrações mais elevadas de exposição (0,2 e 0,4µg/L de água do aquário).

O mais alto nível de LPO foi observado na concentração X2, tendo atingido 114% de aumento em relação ao controle, esta concentração (0,1µg/L) induziu uma modulação do sistema antioxidante onde observamos uma clara tendência de aumento ( $p>0,05$ ) da atividade da superóxido dismutase (SOD) e da catalase (CAT), aliado a um incremento ( $p<0,05$ ) da atividade da glutathione S-transferase (GST). Contudo, tais alterações parecem ser insuficientes para manterem os níveis de LPO estáveis nesta concentração do herbicida (0,1µg/L).

Sabe-se que a GST utiliza a glutathione (GSH) para detoxificação, metabolismo, de alguns pesticidas, assim o aumento da atividade da GST é mais utilizado em mecanismos adaptativos para conter situações de estresse oxidativo (Banerjee et al. 1999). Durante o processo de detoxificação de xenobióticos a GSH associa-se com os agentes pró-oxidantes, a fim de facilitar sua retirada do organismo, ocorrendo, assim, uma redução da GSH disponível para utilização como substrato de ação da GST neste processo (Oruç e Usta 2007), o que pode explicar a diminuição da atividade desta enzima observada neste estudo nas concentrações mais elevadas (0,2 e 0,4 µg/L) do herbicida.

A atividade antioxidante pode ser aumentada ou diminuída sob estresse químico, dependendo da intensidade, da duração da exposição, do tecido analisado, assim como da suscetibilidade das espécies expostas (Oruç e Usta 2007), sendo este talvez, o que está ocorrendo no caso da lipoperoxidação e da atividade das enzimas estudadas (SOD, CAT e principalmente GST) em que, em dado momento, mesmo com as concentrações mais altas, este conjunto de enzimas diminui sua atividade.

A superóxido dismutase em conjunto com a catalase constitui a primeira linha de defesa contra a toxicidade dos derivados reativos do oxigênio. A SOD catalisa a dismutação do ânion superóxido em água e peróxido de hidrogênio, o qual é detoxificado pela atividade da CAT. Normalmente, uma resposta de indução simultânea na atividade da CAT e da SOD é observada quando há exposição a poluentes (Pandey et al. 2003), bem como o ocorrido no experimento, em que a atividade da SOD, semelhante ao já observado na atividade GST, mostrou um aumento na concentração X2 (0,1µg/L), em sincronia com a atividade da CAT, que também mostrou um aumento na mesma concentração, e, nas concentrações subsequentes, um decaimento da atividade mesmo com concentrações mais altas do Quinclorac. Resultados semelhantes foram observados em experimentos com baixas concentrações de chumbo e zinco por Dimitrova et al (1994) e em experimentos com girinos de *Bufo bufo gargarizans* com *spirotetramat*, sendo que as concentrações mais altas levaram a um decréscimo da atividade da SOD (Yin et al. 2014).

Verificamos, no caso da SOD, uma relação inversa entre a concentração do pesticida e a resposta do sistema enzimático, assim como ocorreu com a CAT e a GST, onde as maiores concentrações de exposição levam a uma diminuição da atividade enzimática. Em termos percentuais, na relação entre a concentração X2(0,1µg/L) e X1(0,05µg/L), observamos um acréscimo de 59,15% da concentração X2 em relação à X1, enquanto que a concentração X4(0,4µg/L) teve sua atividade diminuída em 51% em relação à concentração X3(0,2µg/L) e 55,9% em relação ao grupo X2. Porém, estes resultados não determinaram um aumento na lipoperoxidação e nem causam mortalidade aos animais o que sugere uma atividade constitutiva alta destas enzimas e/ou a presença de um sistema antioxidante bastante desenvolvido.

Rodrigues (2014) estudando o tecido muscular destes mesmos animais verificou um perfil de resposta muito semelhante ao aqui encontrado para o tecido hepático em termos de atividade destas mesmas enzimas antioxidantes. Contudo, ao comparamos os níveis de atividade da superóxido dismutase e da catalase entre os dois tecidos verificamos valores de 4 a 8 vezes mais elevadas no tecido hepático, sugerindo uma atividade constitutiva elevada o que pode relacionar-se a resposta por nós observada. Reforçando esta hipótese foi observada, no presente estudo, uma diminuição dos níveis de TBARS no tecido hepático dos girinos de rã-touro nas concentrações mais elevadas.

Estudo desenvolvido por Jones et al. (2010) no tecido hepático e muscular de girinos de rã-touro expostos a diferentes concentrações de paraquat também, verificaram um incremento de todo o sistema antioxidante enzimático, com aumento da atividade da glutathione redutase, das peroxidases e da superóxido dismutase, aliado a uma manutenção da catalase. Estes autores sugerem que os aumentos nas atividades destas enzimas, nestes tecidos, podem ser causados pelo aumento da transcrição dos genes responsáveis pela codificação de proteínas específicas; como também, por uma alta capacidade antioxidante enzimática constitutiva o que impediria o dano oxidativo. Em outro estudo Jones et al. (2010) verificaram um efeito de *down-regulation* de alguns genes de antioxidantes, onde baixas concentrações de Cd aumentam a expressão da SOD; os autores também, verificaram um efeito de *up-regulation* de metalotioneínas, sugerindo a participação de proteínas de baixo peso molecular e ricas em cisteínas.

O conjunto de resultados aqui encontrados para estas enzimas sugerem a participação de outras enzimas antioxidantes não analisadas neste estudo, como também o uso do sistema de defesa antioxidante não enzimático. Sabe-se que a enzima glutathione peroxidase (GPx) atua em conjunto com a CAT, sendo que essas duas enzimas atuam de forma complementar na detoxificação de peróxidos, tanto orgânicos como inorgânicos (Barata et al. 2005), vários autores demonstraram a importância desta enzima (GPx) em girinos de rã touro e peixes (Guo et al. 2010; Jones et al. 2010; Modesto et al. 2010; Zhu et al. 2015) exposta a contaminantes.

O ácido úrico é o produto da excreção do catabolismo de aminoácidos e das purinas em diversos animais (insetos, répteis e aves), sendo produto intermediário em animais como os anfíbios (Nelson e Cox 2014). Neste estudo, verificou-se diferença significativa entre os grupos Controle 7 dias (C7) e Controle 14 dias (C14), possivelmente devido ao aumento da taxa metabólica, em virtude do ganho de peso e comprimento dos animais, assim como à demanda do organismo por alimentos, liberando uma taxa maior de ácido úrico pela digestão proteica (Moyes e Schulte 2010), evidenciando um incremento significativo deste. Também nos grupos expostos, verificamos diferença significativa entre o grupo X4(0,4µg/L) e o grupo C14, e também do grupo X4 e os grupos X1(0,05µg/L) e X2(0,1µg/L), que foi sempre menor em relação aos outros, mostrando uma queda na sua concentração plasmática. Trabalhos anteriores sugerem que o ácido úrico (AU) e a glutathione (GSH) são inibidores específicos de radicais gerados pela decomposição de peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), o produto da interação entre óxido nítrico (NO) com o ânion superóxido. Assim, o ácido úrico mostrou-se capaz na proteção contra danos oxidativos e um antioxidante natural, agindo como um doador de elétrons na relação proteína/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Regoli e Winston 1999; Squadrito et al. 2000; Glantzounis et al. 2005; Zanette et al. 2015), o que pode ajudar a explicar o perfil de resposta (diminuição) dos níveis de LPO observado no tecido hepático, nas concentrações mais elevadas de herbicida, neste estudo. Notamos, de mais a mais, que tanto os níveis da atividade da SOD quanto da GST apresentam um aumento no grupo X2 seguido de um decréscimo nas suas atividades nos grupos X3 e X4, os quais necessitariam de estudos futuros para que possamos chegar a uma conclusão sobre a existência de uma relação entre a queda de ácido úrico e o aumento seguido de diminuição da atividade das enzimas citadas. Mesmo que já saibamos que há uma capacidade limitada de *scavenging* no meio celular contra a potencial toxicidade destas espécies reativas (Regoli e Winston 1999), o que, entre outros fatores, poderia levar ao decréscimo observado.

Chung e Yu (2000) trouxeram resultados em seu trabalho em que o aumento de ácido úrico mostrou um efeito antioxidante eficaz, tendo a habilidade de limpeza de peroxinitrito do sistema, como já havia proposto

Squadrito et al. (2000), fato que pode explicar o uso do ácido úrico no presente trabalho. Para maiores conclusões sobre o sistema que envolve o ácido úrico e a GSH (que fazem parte do sistema não enzimático) serão necessários novos estudos, já que, mesmo a GSH sendo substrato da GST, não podemos responder certas questões sobre suas interações.

A partir deste conjunto de resultados e da mesma forma que Dornelles e Oliveira (2014) e França et al. (2015) a rã touro americana, *Lithobates catesbeianus*, pode constituir-se em uma ponderosa ferramenta para o desenvolvimento de estudos visando o entendimento do efeito de poluentes podendo atuar também, como uma sentinela para diferentes alterações ambientais.

No que tange aos valores de proteínas totais, estas atingem uma diferença significativa no grupo X2 (0,1µg/L), em que há uma queda nos seus valores, e um retorno destas proteínas nas concentrações X3(0,2µg/L) e X4(0,4µg/L). Sabe-se que as proteínas oxidadas recicladas por proteólise são o meio para que a célula previna o acúmulo de proteínas mal formadas. Os aminoácidos não oxidados são então transportados para serem reutilizados para biossíntese de novas proteínas sendo isto interessante, pois esta biossíntese de proteínas é altamente regulada por condições de estresse oxidativo. Porém, as proteínas podem sofrer danos pela ação de vários radicais livres, incluindo radiação, produção de peróxidos de lipídio e oxidação por açúcares (Hermes-Lima 2004), incluindo a produção destes radicais livres pela poluição devido ao uso de pesticidas (Dornelles e Oliveira 2014), que, na concentração X2 (0,1µg/L), novamente mostrou diferença significativa e uma redução em relação aos valores apresentados pelos animais do grupo controle.

Dornelles e Oliveira (2014) também observaram uma diminuição da concentração de proteínas totais hepáticas e musculares em girinos expostos as mesmas concentrações de quinclorac. Zyha et al. (2011) observaram um aumento da transcrição de enzimas associadas a conversão de lipídios e proteínas em energia, em girinos de *Xenopus laevis* expostos ao herbicida atrazina. Tais trabalhos nos permitem sugerir também uma possível alocação das proteínas totais para vias oxidativas e possível manutenção da síntese de ATP.

Um dos principais hormônios esteroides produzido pela inter-renal nos anfíbios é a corticosterona (CORT), encontrado tanto no plasma de girinos de rã touro quanto em adultos. Estes valores também apresentam variações relacionadas ao ritmo da alimentação, a atividade do animal e a fatores estressores naturais e antropogênicos (Glennermeier e Denver 2002; Wright et al. 2003; Burraco et al. 2013). Esse hormônio tem papel metabólico na regulação de glicose e sais, e também participa na regulação hormonal da metamorfose durante o desenvolvimento destes anfíbios (Wright et al, 2003).

No presente estudo, não houve diferença significativa entre os grupos expostos ao xenobionte e o grupo controle, porém, houve diferença entre o grupo X1 (0,05µg/L) e o grupo X4 (0,4µg/L), onde o resultado a exposição da concentração X1 apresentou-se mais alto, havendo um decréscimo nos níveis encontrados nos animais do grupo X4, concentrações mais altas de herbicida. Sabe-se que os níveis de corticosterona em larvas de anfíbios, assim como em outros animais, estão associados com o índice metabólico basal, com a intensidade da atividade exploratória dos animais e com sua responsividade frente a pistas químicas liberadas por predadores (Glennermeier e Denver 2002); o que nos permite sugerir que um alongamento da exposição dos animais a esta concentração de herbicida pode conduzir a uma diminuição da capacidade de resposta dos animais frente a estresses ambientais, como a presença de predadores, levando a uma diminuição da sua capacidade de sobrevivência em ambiente natural.

Contrariamente ao resultado observado para a corticosterona, os níveis de glicose plasmática no grupo exposto a X1 mostrou um resultado significativamente baixo em relação aos outros grupos, principalmente ao grupo X3 (0,2µg/L), coincidindo com os mais altos níveis de hormônio. Nesta situação a corticosterona pode induzir a um aumento da capacidade gliconeogênica hepática conduzindo a manutenção de níveis mínimos de glicemia nestes animais. Nas concentrações mais elevadas do herbicida verificamos uma diminuição dos níveis de corticosterona aliados a um retorno dos valores glicêmicos. Estudos com anfíbios mostram que a corticosterona pode aumentar os níveis de glicose nos fluídos corporais quando injetadas em girinos, podendo estimular a gliconeogênese; não podemos descartar a participação de

outros hormônios contra regulatórios nesta resposta. Esta hipótese é reforçada pelos resultados encontrados por Dornelles e Oliveira (2014) trabalhando com o mesmo modelo experimental exposto as mesmas concentrações de pesticida deste estudo; onde as autoras observaram uma depleção severa e generalizada nos tecidos hepático e muscular dos níveis de glicogênio a partir da concentração de 0,05µg/L de Quinclorac, estando esta aliada a uma diminuição das proteínas totais destes tecidos nesta mesma concentração.

A ação dos glicocorticóides (GC), como a corticosterona, mostra-se essencial em diversos efeitos metabólicas, como prover energia durante o crescimento e a diferenciação dos órgãos destes animais, a já citada estimulação da gliconeogênese, inibição da captação de glicose por tecidos periféricos e supressão de insulina, causando a mobilização da energia estocada e seu redirecionamento ao tecido muscular (Jaudet e Hatey 1984; Costantini et al. 2011).

Estudos com a manipulação nos níveis de glicocorticoides mostram que estes hormônios podem também, afetar o balanço redox. De um lado, os GC podem aumentar o dano oxidativo, e de outro possam aumentar a regulação de defesas antioxidantes e reduzir a produção de radicais livres, protegendo, conseqüentemente, contra patologias causadas por estresse oxidativo. Por exemplo, foi demonstrado que os glicocorticoides podem induzir a síntese de superóxido dismutase (SOD) através da modulação de expressão gênica em células glomerulares bovinas (Yoshioka et al. 1994; Romero 2004; Costantini et al. 2011). No presente estudo foi observado um aumento nos grupos expostos a X2 (0,1µg/L) e X3 (0,2µg/L) e um decréscimo no grupo X4 (0,4µg/L), na atividade da enzima SOD, concomitantemente ao observado com os níveis de CORT, em que também há um decréscimo no grupo X4, porém, estudos futuros seriam necessários para comprovar, na espécie *Lithobates catesbeianus*, se há esta relação entre GC e SOD ou não.

Finalmente, como observado anteriormente na atividade antioxidante enzimática, em que observamos uma diminuição das enzimas SOD, CAT e GST no fígado, esta resposta talvez possa ocorrer devido à concomitante diminuição dos níveis de glicocorticoides circulantes verificadas nas concentrações mais elevadas do herbicida. Uma vez que a provocação

prolongada do eixo hipotálamo-hipofise determinada pelo tempo de exposição/concentração do xenobionte aliada a níveis altos e constantes de corticosterona circulantes podem conduzir a um efeito de *feed-back* negativo diminuindo assim, a responsividade deste eixo e a secreção de corticosterona, podendo alterar inclusive o funcionamento dos receptores celulares de glicorticóides (GC). Além disso, o aumento do estresse oxidativo observado na concentração de 0,2 µg/L de quinclorac pode também estar relacionado ao acionamento do *feedback* negativo, ou seja, a ação do hormônio é suprimida e os antioxidantes podem ter uma diminuição com o tempo, decaindo também a produção de radicais livres com a queda na atividade metabólica, contudo, alguns componentes oxidantes (como hidroperóxidos) produzidos antes deste *feedback* negativo permanecem nos organismo e bioquimicamente ativos, como a hipótese do estudo de Costantini et al. (2011).

Reforçando tal conjunto de dados e hipóteses, ressaltamos que o perfil de resposta encontrado para os valores de massa corporal e comprimento, em que o cultivo sem pesticida não gerou um estresse aos animais, possibilitando a manutenção de seu crescimento, ora em comprimento ora em massa corporal. Contudo, após a adição do herbicida os animais que foram expostos às concentrações de 0,05; 0,10 e 0,40µg/L mostram uma diminuição ( $p < 0,002$ ) da massa corporal em relação ao controle quatorze dias (C14) e ao X3 (0,2 µg/L), evidenciando um retardo no ganho de peso. Com relação ao comprimento corporal total observamos somente para os animais expostos a concentração mais elevada do pesticida (0,4µg/L) uma ausência de crescimento em comprimento dos animais, mostrando uma diminuição de cerca de 9% quando comparados ao controle quatorze dias.

Tais alterações podem conduzir a um comprometimento futuro no tempo de metamorfose e no padrão de desenvolvimento dos animais; é sabido que em anfíbios o desenvolvimento larval dos girinos precisa conduzir a uma massa e comprimento ideais para garantirem sucesso no ciclo de vida adulto (Harris 1999). Durante a fase da 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 e Altig 1999). Um dos eventos mais importante durante a metamorfose é a absorção da cauda, 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 para suprir a diminuição no consumo de alimento observado em girinos que estão em processo de transformação (Albinati 1999; Santos et al. 2010).

O índice K e o  $K_{\text{hepático}}$  refletem, como já dito, o balanço energético dos animais e o seu investimento energético em condições adversas do ambiente. Para o índice K observamos uma redução significativa somente em relação ao grupo controle quando os animais foram expostos por sete dias à concentração de  $0,01\mu\text{g/L}$  ( $X_2$ ) indicando que esta concentração e este momento parecem ser críticos a sobrevivência dos animais, refletindo um estado de alteração possivelmente, no balanço energético dos animais. Dornelles e Oliveira (2014) mostraram neste mesmo modelo experimental, sob o mesmo tempo de exposição e em concentrações semelhantes deste herbicida uma redução drástica dos níveis de glicogênio e proteínas totais no tecido branquial, aliada a uma redução do glicogênio, triglicerídeos, lipídeos e proteínas totais tanto no tecido hepático como renal. Tais resultados reforçam a hipótese anteriormente apresentada.

Já para o  $K_{\text{hepático}}$  verificamos que o grupo exposto à concentração  $X_3$  ( $0,2\mu\text{g/L}$ ) mostrou uma diferença bastante significativa se comparada aos outros grupos, inclusive ao controle 14 dias (C14), demonstrando, possivelmente, um aumento na atividade hepática devido a alocação de nutrientes do trato digestório ou aporte de substrato de outros tecidos para este órgão, com a finalidade de manter o balanço energético deste na detoxificação deste xenobionte e/ou na síntese de glicose para manutenção da glicemia, visto que neste momento observamos um retorno deste carboidrato a níveis semelhantes aos do grupo controle. Como ocorrido em trabalhos com sardinhas, de Nunes et al. (2011), e pesquisa com *Chanos chanos*, onde os animais eram expostos a situações com mais ou menos oferta de alimento, sendo que, aqueles em que estavam em ambiente a vontade, apresentaram um índice de condição mais alto (Bagarinao e Thayaparan 1986),

diferentemente dos animais do presente estudo, em que a ração foi oferecida *ad libitum*; por este fator, fica claro do porquê que o índice hepatossomático não sofreu alterações significativas— os animais, mesmo com uma dose maior do xenobionte, conseguiram manter seus percentuais hepáticos.

Desta maneira, após a análise de diversos fatores, podemos afirmar ser de claridade solar a necessidade de maiores estudos e pesquisas, com uma quantidade maior de elementos para que possamos compará-los aos já estudados - mesmo com a positiva contribuição da presente pesquisa - e chegarmos a conclusões mais diretas e específicas do organismo como um todo, e de como este conjunto de enzimas, hormônios, etc., pode nos informar e ensinar mais sobre estes e outros animais, permitindo que possamos entendê-los e quiçá, auxiliar em maneiras de melhor manejo e cuidados.

## 5. CONCLUSÃO

Um organismo vivo não funciona em partes ou como um pequeno sistema individual. É um todo, um conjunto em que cada ação poderá ter várias reações. Não podemos atribuir a apenas um ou dois resultados, o funcionamento de todo um sistema complexo de vida. Seres complexos funcionam em conjunto e de maneira igualmente complexa. Assim, não podemos esperar que, mesmo com resultados importantes como os obtidos neste estudo, a pesquisa se dê por encerrada.

Encontramos evidências de que os níveis de algumas substâncias ou de suas atividades vêm repercutir na ação e resultado de outras. Podemos dizer que a corticosterona, possivelmente aliada a outros hormônios, provocou alterações metabólicas, assim como no balanço oxidativo e por isso os resultados encontrados. Também podemos ver, claramente, as diferenças nas atividades de enzimas como a superóxido dismutase, a catalase e a glutathione S-transferase apresentam um acréscimo, na concentração X2 de 0,1µg/L, e uma queda sequencial nas demais concentrações, mesmo não havendo mortalidade dos animais ou injúria celular por LPO, talvez por que estes animais possuam um sistema antioxidante bem desenvolvido.

Os níveis de ácido úrico também mostram que esta substância parece agir contra as EROs compondo um sistema não-enzimático, porém, neste caso, torna-se clara a necessidade de maiores estudos, já que análises de GSH seriam necessárias para melhor afirmarmos tal questão.

De modo geral, o organismo da rã touro parece ter mecanismos de adaptação bastante avançados frente ao agente estressor quinclorac, com uma linha de defesa antioxidante ativa, e a manutenção de índices, como o hepatossomático, estável, mantendo o fígado possivelmente íntegro mas não em relação a massa e comprimento corporal que mostram um padrão de redução. Não obstante, mesmo que não tenha havido mortalidade, valores significativos foram encontrados, mostrando que houve modificações em razão do estressor. O que pode vir a prejudicar estes animais em seu ambiente natural, em termos de desenvolvimento e talvez até na reprodução.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdollahi M, Ranjbar A, Shadnia S, Nikfar S, Rezaie A (2004) Pesticides and oxidative stress: a review. *Medical science monitor* 10:141-147
- Adams LK, Bruinsma EC (1987) Intensive commercial bullfrog culture: a brazilian experience. *Aquaculture management* 358:28-44
- Albinati RCB, Costa GB, Neves AP, (1998) Efeito da densidade populacional de girinos de (*Rana catesbeiana*, Shaw, 1802) sobre o tempo de metamorfose e peso do ímagos. *Arquivos da escola de medicina veterinária da UFBA* 19:75-86
- Albinati RCB (1999) Avanço na nutrição de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*, Shaw 1802). In: Encontro Nacional de Ranicultura 1, São Miguel do Iguaçu, Anais, São Miguel do Iguaçu: Abetra pp. 13-31
- Alho CS (2006) Ética no desenvolvimento científico e tecnológico: questões da genética atual. In: Timm RS (ed) *Ciência e ética os grandes desafios*. Edipucrs, Porto Alegre, pp. 13-20
- Andrade FR, Melo-Sterza FA, Seneda MM, Alfieri AA (2010) Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. *Revista brasileira de reprodução animal* 34:79-85
- Bagarinao T, Thayaparan K (1986) The length-weight relationship, food habits and condition factor of wild juvenile Milkfish in Sri Lanka. *Aquaculture* 55:241-246
- Banerjee BD, Seth V, Bhattacharya A, Pasha ST, Chakraborty AK (1999) Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers. *Toxicology letters* 107:33-47
- Barata C, Lekumberri M, Vila-Escalé M, Prat N, Porte C (2005) Trace metal concentration, antioxidant enzyme activities and susceptibility to oxidative stress in the tricoptera larvae *Hydropsyche exocellata* from the Llobregat river basin (NE Spain). *Aquatic toxicology* 74:3-19
- Barreiros ALBS, David JM (2005) Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova* 29:113-123
- Belló-Klein A (2002) Dano oxidativo e regulação biológica pelos radicais livre. In: Marroni NP (ed) *Estresse oxidativo e antioxidantes*. Editora da Ulbra, Canoas, pp 15-19

- Berti AP, Düsman E, Soares LC, Grassi LEA (2009) Efeitos da contaminação do ambiente aquático por óleos e agrotóxicos. SaBios Revista de saúde e biologia 4:45-51
- Boutet I, Tanguy A, Moraga D (2004) Response of the pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. Gene 329:147-157
- Boveris A, Chance B (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: general properties and effect of hyperbaric oxygen. Biochemical Journal 34:707-717
- Boveris A, Fraga CG, Varsaysky AI, Koch OR (1983) Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. Archives of biochemistry and biophysics 227:534-541
- Boyland E, Chasseaud LF (1969) The role of glutathione and glutathione S-transferases in mercapturic acid biosynthesis. Advances in enzymology and related areas of molecular biology 32: 173-219
- Bridges CM, Semlitsch RD (2000) Variation in pesticide tolerance of tadpoles among and within species of ranidae and patterns of amphibian decline. Conservation Biology 14:1490-1499
- Bueno-Guimarães HM, Ferreira CM, Garcia MLB, Saldiva PHN (2001) Tadpole epithelium test: potential use of *Rana catesbeiana* histopathologic epithelial changes to evaluate aquatic pollution. Bulletin of environmental contamination and toxicology 67:202-209
- Burraco P, Duarte LJ, Gomez-Mestre I (2013) Predator-induced physiological responses in tadpoles challenged with herbicide pollution. Current Zoology 59:475-484
- Cattaneo R (2009) Parâmetros metabólicos e histológicos de Jundiás (*Rhamdia quelen*) expostos à formulação comercial do herbicida 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Dissertação, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Brasil
- Chung HY, Yu BP (2000) Significance of hepatic xanthine oxidase and uric acid in aged and dietary restricted rats. Age 23:123-128
- Costantini D, Marasco V, Moller AP (2011) A meta-analysis of glucocorticoids as modulators of oxidative stress in vertebrates. Journal of comparative physiology 181:447-456
- Cunha ER, Delariva RL (2009) Introdução da rã touro, *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802): uma revisão. SaBios revista de saúde e biologia 4:34-46

- Dimitrova MS, Tishinova V, Velcheva V (1994) Combined effect of zinc and lead on the hepatic superoxide dismutase-catalase system in carp (*Cyprinus carpio*). *Comparative biochemistry and physiology* 108:43-46
- Dornelles MF (2013) Efeito dos herbicidas Atrazina, Glifosato e Quinclorac sobre a composição bioquímica, a peroxidação lipídica e a sobrevivência de girinos de *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802). Dissertação, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Brasil
- Dornelles MF, Oliveira GT (2014) Effect of atrazine, glyphosate and quinclorac on biochemical parameters, lipid peroxidation and survival in bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 66:415-429
- Fang JKH, Au DWT, Wu RSS, Chan AKY, Mok HOL Shin PKS (2009) The use of physiological indices in rabbitfish *Siganus oramin* for monitoring of coastal pollution. *Marine pollution bulletin* 58:1229-1235
- Ferreira ALA, Matsubara LS (1997) Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da associação médica brasileira* 43:61-68
- França FM, Paiva TCB, Marcantônio AS, Teixeira PC, Ferreira CM (2015) Acute toxicity and ecotoxicological risk assessment of rice pesticides to *Lithobates catesbeianus* tadpoles. *Journal of environmental science and health* 50:406-410
- Frings CE, Dunn RA (1970) Colorimetric method for determination of total serum lipids based on the sulfophosphovanillin reaction. *American Journal Of Clinical Pathology* 53:89-91
- Glantzounis GK, Tsimoyiannis EC, Kappas AM, Galaris DA (2005) Uric acid and oxidative stress. *Current pharmaceutical design* 11:4145-4151
- Glennemeier KA, Denver RJ (2002) Role for corticoids in mediating the response of *Rana pipiens* tadpoles to intraspecific competition. *Journal of experimental zoology* 292:32-40
- Gonçalves AM (2013) Atividade de fosfomonohidrolases envolvidas com o crescimento e absorção da cauda de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*). Dissertação, Universidade Estadual Paulista, Brasil
- Gosner KL (1960) A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* 16:183-190
- Grant A, Tyler PA (1983) The analysis of data in studies of invertebrate reproduction. I. Introduction and statistical analysis of gonad indices and maturity indices. *International Journal of Invertebrate Reproduction* 6:259-269

- Grossmann K, Kwiatkowski J (2000) The mechanism of Quinclorac selectivity in grasses. *Pesticide biochemistry and physiology* 66:83-91
- Guo H, Yin L, Zhang S, Feng W (2010) The toxic mechanism of high lethality of herbicide butachlor in marine Flatfish Flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Journal of ocean university of China* 9:257-264
- Guyton AC, Hall JE (2006) *Tratado de fisiologia médica*. Elsevier Editora, Rio de Janeiro
- Harris RN (1999) The anuran tadpole – Evolution and maintenance. In: McDiarmid RW, Altig R (ed) *Tadpoles – The Biology of anuran larvae*. University of Chicago Press, Chicago pp. 280-294
- Hartman EAH, Belden JB, Smith LM, McMurry ST (2014) Chronic effects of strobilurin fungicides on development, growth, and mortality of larval Great Plains toads (*Bufo cognatus*). *Ecotoxicology* 23:396-403
- Hayashi C, Soares CM, Galdioli EM, Furuya VRB, Boscolo WR (2004) Desenvolvimento de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*, Shaw, 1802) cultivadas em diferentes densidades de estocagem em tanques-rede. *Revista brasileira de zootecnia* 33:14-20
- Hermes-Lima M, Willmore WG, Storey KB (1995) Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III)Xylenol orange complex formation. *Free radical biology & medicine* 19:271-280
- Hermes-Lima M (2004) Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: Storey KB (ed) *Functional metabolism: Regulation and adaptation*. Hoboken, New Jersey, pp. 319-368
- Hontela A (2005) Adrenal toxicology: environmental pollutants and the HPI axis. *Biochemistry and molecular biology of fishes* 6:331-363
- Jaudet GJ, Hately JL (1984) Variations in aldosterone and corticosterone plasma levels during metamorphosis in *Xenopus laevis* tadpoles. *General and comparative endocrinology* 56:59-65
- Jaffe RC (1981) Plasma concentration of corticosterone during *Rana catesbeiana* tadpole metamorphosis. *General and comparative endocrinology* 44:314-318
- Johansson M, Piha H, Kylin H, Merila J (2006) Toxicity of six pesticides to common frog (*Rana temporaria*) tadpoles. *Environmental toxicology and chemistry* 25:3164-3170

- Jones L, Gossett RD, Banks SW, McCallum ML (2010) Antioxidant defense system in tadpoles of the American Bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) exposed to paraquat. *Journal of herpetology* 44:222-228
- Kloas W, Reinecke M, Hanke W (1997) Stage-dependent changes in adrenal steroids and catecholamines during development in *Xenopus laevis*. *General and comparative endocrinology* 108:416-426
- Lambropoulou DA, Sakkas VA, Hela GD, Albanis TA (2002) Application of solid-phase microextraction in the monitoring of priority pesticides in the kalamas river (N.W. Greece). *Journal of Chromatography* 963:107-116
- Landis WG, Yu MH (2004) *Introduction to environmental toxicology: impacts of chemicals upon ecological systems*. Crc press, Florida
- Lein W, Börnke F, Reindl A, Ehrhardt T, Stitt M, Sonnewald U. (2004) Target based discovery of novel herbicides. *Current opinion in Plant Biology* 2:219-225
- Lister A, Nero V, Farwell A, Dixon DG, van der Kraak G (2008) Reproductive and stress hormone levels in goldfish (*Carassius auratus*) exposed to oil sands process-affected water. *Aquatic toxicology* 87:170-177
- Llesuy SF, Milei J, Molina H, Boveris A, Milei S (1985) Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadrimicin in mice. *Tumor* 71:241-249
- Llesuy SF (2002) Introducción y especies activas de oxígeno. In: Marroni NP (ed) *Estresse oxidativo e antioxidantes*. Editora da Ulbra, Canoas, pp 21-32
- Lüdeking A, Köhler A (2002) Identification of six mRNA sequences of genes related to multixenobiotic resistance (MXR) and biotransformation in *Mytilus edulis*. *Marine ecology progress series* 238:115-124
- Lushchak VI (2010) Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology* 101:13-30
- MacCallum ML (2007) Amphibian decline or extinction? Current declines dwarf background extinction rate. *Journal of Herpetology* 41:483-491
- Mann RM, Hyne RV, Choung CB, Wilson SP (2009) Amphibians and agricultural chemicals: Review of the risks in a complex environment. *Environmental Pollution* 157:2903-2927
- Marchesan E, Zanella R, Avila LA, Camargo ER, Machado SLO, Macedo VRM (2007) Rice herbicide monitoring in two Brazilian rivers during the rice growing season. *Scientia Agricola* 64:131-137

- Marchi G, Marchi ECS, Guimarães TG (2008) Herbicidas: Mecanismos de ação e uso. Embrapa Cerrados, Planaltina
- Martin LB, Hopkins WA, Mydiarz LD, Rohr JR (2010) The effects of anthropogenic global changes on immune functions and disease resistance. *Annals of the New York academy of sciences* 1195:129-148
- McDiarmid RW, Altig R (1999) Tadpoles: The biology of anuran larvae. University of Chicago Press, Chicago
- McMahon TA, Halstead NT, Johnson S, Raffel TR, Romansic JM, Crumrine PW, Boughton RK, Martin LB, Rohr JR (2011) The fungicide chlorothalonil in nonlinearly associated with corticosterone levels, immunity, and mortality in amphibians. *Environmental health perspectives* 119:1098-1103
- Menezes CC, Pretto A, Moraes B, Fonseca MB, Raabe A, Gluszcak L, Dorneles AG, Loro VL (2007) Parâmetros oxidativos e atividade da aça 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
- Menezes CC, Leitemperger J, Santi A, Lopes T, Veiverberg CA, Peixoto S, Adaime MB, Zanella R, Barbosa NBV, Loro VL (2012) The effects of diphenyl diselenide on oxidative stress biomarkers in *Cyprinus carpio* exposed to herbicide quinclorac (Facet®). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 81:91-97
- Modesto KA, Martinez CBR (2010) Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere* 78:294-299
- Moreira JC, Jacob SC, Peres F, Lima JS, Meyer A, Oliveira-Silva JJ, Sarcinelli PN, Batista DF, Egler M, Faria MVC, Araújo AJ, Kubota AH, Soares MO, Alves SR, Moura CM, Curi R (2002) Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ. *Ciência e Saúde Coletiva* 7:299-311
- Morgan-Martins MI (2003) Replacement estrogen decreases oxidative damage, increase the activity of antioxidant enzymes and improves cardiac function in rats. Tese, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil
- Moura MAM, Franco DAS, Matallo MB (2008) Impacto de herbicidas sobre os recursos hídricos. *Revista tecnologia & inovação agropecuária* 1:142-153
- Moyes CD, Schulte PM (2010) Princípios de fisiologia animal. Editora Artmed, Porto Alegre

- Nelson DL, Cox MM (2014) *Princípios de bioquímica de Lehninger*. Editora Artmed, Porto Alegre
- Nordberg J, Arner ESJ (2001) Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free radical biology and medicine* 31:1287-1312
- Nunes A, Silva A, Soares E (2011) The use of hepatic and somatic indices and histological information to characterize the reproductive dynamics of atlantic sardine *Sardina pilchardus* from the portuguese coast. *Marine and coastal fisheries: management, and ecosystem science* 3: 127-144
- Nunes BS, Travasso R, Gonçalves F, Castro BB (2015) Biochemical and physiological modifications in tissues of *Sardina pilchardus*: spatial and temporal patterns as a baseline for biomonitoring studies. *Frontiers in environmental science* 3: 1-14
- Oga S (2003) *Fundamentos de toxicologia*. Atheneu Editora, São Paulo
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry* 95:351-358
- Oliveira Junior RS, Constantin J (2001) *Plantas daninhas e seu manejo*. Livraria e Editora Agropecuária, Guaíba
- Oruç EÖ, Usta D (2007) Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential of diazinon in different tissues of *Cyprinus carpio*. *Environmental toxicology and pharmacology* 23:45-55
- Pandey S, Parvez S, Sayeed I, Haque R, Bin-Hafeez B, Raisuddin S (2003) Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.). *The science of the total environment* 309:105-115
- Pareja L, Pérez-Parada A, Agüera A, Cesio V, Heinzen H, Fernández-Alba AR (2012) Photolytic and photocatalytic degradation of quinclorac in ultrapure and paddy field water: Identification of transformation products and pathways. *Chemosphere* 87:838-844
- Paulino MG, Sakuragui MM, Fernandes MN (2012) Effects of atrazine on the gill cells and ionic balance in a neotropical fish, *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere* 86:1-7
- Regoli F, Winston GW (1999) Quantification of total oxidant scavenging capacity of antioxidants for peroxyxynitrite, peroxy radicals, and hydroxyl radicals. *Toxicology and applied pharmacology* 156:96-105
- Resgalla CJ, Noldin JA, Tamanaha MS, Deschamps FC, Eberhardt DS, Rörig LR (2007) Risk analysis of herbicide quinclorac residues in irrigated rice areas, Santa Catarina, Brazil. *Ecotoxicology* 16:565-571

- Rodrigues PS (2014) 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, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brasil
- Romero LM (2004) Physiological stress in ecology: lessons from biomedical research. *Trends in ecology and evolution* 19:249-255
- Santos LFJ, Oliveira-Bahia VRL, Nakaghi LSO, Stefani MV, Gonçalves AM, Pizauro JM (2010) Hydrolases activities in *Lithobates catesbeianus* tadpoles digestive system during larval development *In: Reunião anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular* 39. Foz do Iguaçu
- Sies H, Stahl W (1995) Vitamins E and C,  $\beta$ -carotene, and other carotenoids as antioxidants. *American journal of clinical nutrition* 62:1315S-1321S
- Silva MD, Peralba MCR, Mattos MLT (2003) Determinação de Glifosato e ácido aminometilfosfônico em águas superficiais do arroio Passo do Pilão. *Pesticidas. Revista de ecotoxicologia e meio ambiente* 13:19-28
- Silva DRO, Avila LA, Agostinetto D, Dal Magro T, Oliveira E, Zanella R, Noldin JÁ (2009) Monitoramento de agrotóxicos em águas superficiais de regiões orizícolas no sul do Brasil. *Ciência Rural* 39:2383-2389
- Sol SY, Johnson LL, Boyd D, Olson OP, Lomax DP, Collier TK (2008) Relationships between anthropogenic chemical contaminant exposure and associated changes in reproductive parameters in male english sole (*Parophrys vetulus*) collected from Hylebos Waterway, Puget Sound, Washington. *Archives of environmental contamination and toxicology* 55:627-638
- Solé M, Antó M, Baena M, Carrasson M, Cartes JE, Maynou F (2010) Hepatic biomarkers of xenobiotic metabolism in eighteen marine fish from NW Mediterranean shelf and slope waters in relation to some of their biological and ecological variables. *Marine environmental research* 70:181-188
- Southorn PA, Powis G (1988) Free radicals in medicine I. Nature and biologic reactions. *Mayo Clinic Proceedings* 63:381-389
- Squadrito GL, Cueto R, Splenser AE, Valavanidis A, Zhang H, Uppu RM, Pryor WA (2000) Reaction of uric acid with peroxyxynitrite and implications for the mechanism of neuroprotection by uric acid. *Archives of biochemistry and biophysics* 376:333-337
- Tsahar E, Arad Z, Izhaki I, Guglielmo CG (2006) The relationship between uric acid and its oxidative product allantoin: a potential indicator for the evaluation of oxidative stress in birds. *Journal of comparative physiology B* 176:653-661

- Van der Oost, Beyer J, Vermeulen NPE (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental toxicology and pharmacology* 13:57-149
- Vazzoler AEAM (1996) *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: Teoria e prática*. Eduem, Maringá
- Vieira MI (1993) *Rã touro gigante: características e reprodução*. Infotec, São Paulo
- Vinagre C, Madeira D, Narciso L, Cabral HN, Diniz M (2012) Effect of temperature on oxidative stress in fish: Lipid peroxidation and catalase activity in the muscle of juvenile seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Ecological indicators* 23:274-279
- Warner HR (1994) Superoxide dismutase, aging, and degenerative disease. *Free radical biology & medicine* 17:249-258
- Webster NR, Nunn JF(1988) Molecular structure of free radicals and their importance in biological reactions. *British journal of anaesthesia* 60:98-108
- Wright ML, Guertin CJ, Duffy JL, Szatkowski MC, Visconti RF, Alves CD (2003) Developmental and diel profiles of plasma corticosteroids in bullfrog: *Rana catesbeiana*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 135:585-595
- Yang TH, Lai NC, Graham JB, Somero GN (1992) Respiratory, blood, and heart enzymatic adaptations of *Sebastes alascanus* (Scorpaenidae: Teleostei) in the oxygen minimum zone: a comparative study. *Biological bulletin* 183: 490-499
- Yin X, Jiang S, Yu J, Zhu G, Wu H, Mao C (2014) Effects of spirotetramat on the acute toxicity, oxidative stress, and lipid peroxidation in Chinese toad (*Bufo bufo gargarizans*) tadpoles. *Environmental toxicology and pharmacology* 37:1229-1235
- Yoshioka T, Kawamura T, Meyrick BO, Beckman JK, Hoover RL, Yoshida H, Ichikawa I (1994) Induction of manganese superoxide dismutase by glucocorticoids in glomerular cells. *Kidney International* 45:211-219
- Zanette J, Monserrat JM, Bianchini A (2015) Biochemical biomarkers in barnacles *Balanus improvisus*: pollution and seasonal effects. *Marine environmental research* 103:74-79
- Zhu L, Mu X, Wang K, Chai T, Yang Y, Qiu L, Wang C (2015) Cyhalofop-butyl has the potential to induce developmental toxicity, oxidative stress and apoptosis in early life stage of Zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental pollution* 203:40-49